مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۶، صفحات ۹-۱۴

اثر اسانس بابونه بر تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا

حوریه صادری [۱]، پرویز اولیاء* [۱]، سید رضا هاشمی [۲]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده‌پزشکی، دانشگاه شاهد

۲) دانش آموخته رشتهٔ پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

نویسنده رابط: پرویز اولیاء، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌پزشکی، دانشگاه شاهد تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲ owlia@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۶/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۷/۲

چکیده:

زمینه و اهداف: سودوموناس آئروژینوزا یکی از باکتری های بیماریزای فرصت طلب بسیار مهم می باشد. سویه‌های موکوئیدی سودوموناس آئروژینوزا تولید مواد بسیار موکوئیدی می کنند که از آلژینات تشکیل شده است و مهمترین نقش را در تشکیل بیوفیلم دارد. در این مطالعه اثر اسانس بابونه بر تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: از سودوموناس آئروژینوزا ۸۸۲۱M به عنوان سویه استاندارد در تشکیل بیوفیلم استفاده شد. برای بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس بابونه با غلظت ۵۰٪ درDMSO از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. اثر اسانس بر تشکیل بیوفیلم در محیط L.B حاوی غلظت های ۰/۲، ۰/۳۵ و ۰/۵ میکرو گرم از اسانس در میلی لیتر و بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ^{oC} ۳۷ به روش Fonseca اندازه گیری شد. از محیط کشت تلقیح شده بدون اسانس به عنوان شاهد مثبت و از محیط کشت تلقیح نشده بدون اسانس به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

یافته ها: اسانس بر باکتری فاقد خاصیت ضد میکروبی بود، و در حضور اسانس با غلظت های µg/ml ۰/۲ و ۰/۳۵µg/ml تولید بیوفیلم اختلاف معناداری با شاهد مثبت نداشت، اما تولید بیوفیلم در حضور ۰/۵µg/ml اسانس، کاهش معناداری نسبت به شاهد مثبت داشت.

نتیجه گیری: هر چند اسانس بابونه اثر ضد میکروبی بر روی سودوموناس آئروژینوزا ندارد، اما باعث کاهش تولید بیوفیلم می گردد. از آنجا که تشکیل بیوفیلم یکی از فاکتورهای بیماریزایی در سویه های موکوئیدی می باشد، لذا احتمالا با مطالعات بیشتر امکان کنترل عفونت های مربوطه با استفاده از این نتایج نیز وجود دارد.

کلید واژه ها: سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم، بابونه

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

سودوموناس آئروژینوزا یک باسیل گرم منفی هوازی اجباری است، که فلور طبیعی پوست و دستگاه گوارش انسان است و در آب و خاک نیز یافت می‌شود (۱). سودوموناس‌آئروژینوزا یک بیماریزای فرصت‌طلب و یکی از مهمترین عوامل عفونت های بیمارستانی درطیف وسیعی از بیماران دارای نقص سیستم ایمنی شامل مبتلایان به بدخیمی‌ها، سیستیک فیبروزیس، سوختگی‌ها و ... است. این باکتری دارای عوامل بیماریزای متعدد می‌باشد و مقاومت زیادی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های متداول دارد. حضور گلیکوکالیکس در این باکتری سبب می‌شود که اتصال باکتری به سلول میزبان و تشکیل میکرو کلنی به سهولت صورت پذیرد. همچنین سبب تشکیل بیوفیلم شده، از این طریق باکتری دربرابر سیستم بیگانه‌خواری و نفوذ مواد ضدمیکروبی محافظت می‌شود (۲،۳). مقاومت این باکتری که به صورت مقاومت‌های چندگانه درآمده، روبه افزایش است و این روند رو به افزایش در مراکز مختلف درمانی و همچنین در ایران به اثبات رسیده است (۴).

با توجه به مقاومت زیاد باکتری به آنتی‌بیوتیک های متداول و هزینهٔ نسبتاً بالا و عوارض این داروها، استفاده از گیاهان دارویی در دو دهه اخیر رواج زیادی یافته است. در بین این گیاهان، بابونه به صورت های مختلف به بازار عرضه شده است. بابونه دارای اثرات متفاوتی است و بیشترین اثر آن خاصیت آرام‌بخشی وضدالتهابی است و بر روی اثر ضدمیکروبی آن بر سودوموناس آئروژینوزا کمتر کار شده است. از آنجا که بابونه یکی از گیاهان بومی ایران است و مطالعات گسترده‌ای بر روی آن صورت گرفته است، لذا بررسی اثرات ضدمیکروبی آن می‌تواند منجر به دستیابی اطلاعات مفیدی شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر اسانس بابونه در تولید بیوفیلم در سودوموناس‌آئروژینوزا ۸۸۲۱M که سویه استاندارد برای مطالعات بیوفیلم است می‌باشد.

مواد و روش ها:

تهیه باکتری و اسانس: میکروارگانیسم بکار رفته در این تحقیق سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ۸۸۲۱M بود که توسط ایزابل‌سا ـ کوریه (لیسبون ـ پرتقال) دراختیار گذاشته شده است. این باکتری به صورت لیوفیلیزه نگهداری شده و درهنگام نیاز بر روی محیط مناسب تلقیح می‌شد (۵،۶). اسانس مورد نظر از گل بابونه (*Matricaria chamomilla* L.) واریته Sorokasri به روش هیدرو دیستیلیشن توسط شرکت زردبند (تهران- ایران) تهیه شد.

بررسی اثر ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن: سه عدد پلیت حاوی محیط مولرـ هینتون آگار تهیه شد. سپس از کشت ۲۴ ساعته باکتری سودوموناس آئروژینوزا ۸۸۲۱M سوسپانسیونی با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد و از آن با استفاده از سواپ استریل روی ۳ پلیت تلقیح شد. سپس روی ۹ عدد دیسک بلانک استریل مقدار ۱۰µl محلول استوک اسانس (حاوی ۵۰٪ اسانس و ۵۰٪ DMSO) اضافه گردید، سپس روی هریک از ۳ پلیت تلقیح شده ۳ عدد دیسک قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ $^{\circ}C$ ، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد (۶). از دیسک بلانک حاوی ۱۰µl دی متیل سولفوکساید (DMSO) نیز به عنوان شاهد استفاده گردید.

روش اندازه گیری تشکیل بیوفیلم: از باکتری تازه که ۲۴ ساعت کشت داده شده بود توسط اسپکتوفتومتری سوسپانسیون باکتری با غلظت $OD_{620} = 0.01$ تهیه شد و مقدار ۱۹۰µl از محیط کشت مولر- هینتون براث در چاهک پلیت ۹۶ چاهکی ریخته شد و سپس به مقدار ۱۰µl از سوسپانسیون باکتری ($OD_{620} = 0.01$) به آن اضافه شد. بعد پلیت را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ $^{\circ}c$ گذاشتیم. بعد از ۲۴ ساعت پلیت را درآورده و محتویات آن را خالی کرده و سه بار با آب مقطر شستشو دادیم. سپس ۲۰۰µl از محلول سافرانین ۰/۰۲۵٪ به آن اضافه کرده (۰/۰۲۵ gr از پودر سافرانین در ۱۰۰cc آب مقطر)، پس از ۲ دقیقه با آب مقطر شستشو داده و سپس ۲۰۰µl محلول اتانول-استون (v/v ۵۰/۵۰) به هر چاهک اضافه کرده و بعد از ۱۵ دقیقه با دستگاه الایزا در طول موج ۴۹۲ nm، مقدار OD خوانده شد(۷).

روش بررسی اثر اسانس در تولید بیوفیلم: برای انجام این کار مقدار ۱۹۰ µl از هر یک از محیط کشت های تهیه شده به شرح ذیل در چاهک های پلیت ۹۶ چاهکی از جنس پلی استایرن ریخته می شد:

در چاهک اول محیط کشت بدون اسانس که همان شاهد مثبت بود، ریخته شد. در چاهک دوم از محیط کشت با غلظت ۰/۲ µg/ml ریخته شد. در چاهک سوم از محیط کشت با غلظت ۰/۳۵ µg/ml ریخته شد. در چاهک چهارم از محیط کشت با غلظت ۰/۵ µg/ml ریخته شد و در چاهک پنجم از محیط کشت بدون اسانس و بدون سوسپانسیون باکتری که شاهد منفی بود ریخته شد. سپس مقدار ۱۰µl از سوسپانسیون تازه باکتری با غلظت OD_{620}=0.01 به چاهک های یک تا چهارم اضافه و در چاهک

Archive of SID

www.SID.ir

پنجم بجای سوسپانسیون باکتری، آب مقطر استریل اضافه شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37^{oC} انکوباسیون گردید. بعد از ۲۴ ساعت پلیت را از انکوباتور برداشته و کار را زیر هود استریل ادامه داده، بدین صورت که محتویات داخل چاهک را خالی کرده و سه بار چاهک هایی که محتوی سوسپانسیون و محیط کشت و حتی محیط کشت بدون سوسپانسیون بوده اند با آب مقطر شسته شدند. در این مرحله باکتری در دیواره پلیت می توانست بیوفیلم تشکیل داده باشد، به جز در چاهک پنجم که سوسپانسیون باکتری نداشت. سپس مقدار ۲۰۰ µl از محلول ۰/۰۲۵ درصد سافرانین به مدت دو دقیقه به هر چاهک ها اضافه شد. در این مرحله بیوفیلم های تشکیل شده به خود رنگ می گیرند و بعد از ۲ دقیقه سافرانین را خالی کرده و سه بار با آب مقطر شسته شدند. سپس به مقدار ۲۰۰ µl از محلول اتانول-استون (۵۰/۵۰) به مدت ۱۵ دقیقه به هر چاهک اضافه شد. در این مرحله رنگ های سافرانین که وارد بیوفیلم شده بودند آزاد می شدند و بعد در دستگاه الایزا با طول موج ۴۹۲ nm خوانده می شد. بدین صورت هر چه بیوفیلم بیشتر تشکیل شده بود، مقدار بیشتری رنگ به خود جذب کرده و پس از اضافه کردن الکل- استون، رنگ بیشتری نیز تولید می کرد و نهایتا جذب بیشتری در دستگاه الایزا ثبت می گردید(۷).

محاسبه آماری: هر آزمایش ۶ بار تکرار شد و از روش Paired *t*- test با α=۰/۰۵، اختلاف بدست آمده مقایسه و بررسی شد (۷).

یافته ها:

نتایج حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن: نتایج حاصل نشان داد که این اسانس به روش یاد شده فاقد اثر ضد میکروبی بوده و حلال نیز فاقد اثر ضد میکروبی بر باکتری مورد مطالعه می باشد.

نتایج حاصل از آزمایش اندازه گیری تشکیل بیوفیلم در نمونه شاهد مثبت در مقایسه با شاهد منفی: همانطور که گفته شد از محیط کشت تلقیح شده بدون اسانس به عنوان شاهد مثبت و از محیط کشت تلقیح نشده بدون اسانس به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. نتایج نشان می دهد که مقدار OD در شاهد مثبت بیشتر از شاهد منفی است. این اختلاف از نظر آماری معنادار بود (جدول ۱).

نتایج حاصل از آزمایش سنجش میزان تشکیل بیوفیلم باکتری: در این روش مقادیر تولید بیوفیلم تولید شده توسط باکتری در محیط کشت های حاوی ۳ غلظت متفاوت اسانس(۰/۵µg/ml ، ۰/۳۵µg/ml و ۰/۲µg/ml) به طور جداگانه اندازه‌گیری شد. دراین روش مقادیر جذب بدست آمده با مقادیر شاهد مثبت مقایسه شد و مقادیر بیوفیلم هر نمونه بدست آمد. نتایج نشان داد که در غلظت ۰/۵µg/ml اسانس، مقدار بیوفیلم تولید شده درنمونه تست درمقایسه با نمونه شاهد مثبت (بدون اسانس) کاهش داشته و این کاهش از نظر آماری معنادار می باشد (جدول ۲) اما درغلظت های ۰/۳۵µg/ml و ۰/۲µg/ml اسانس بابونه، مقدار OD به دست آمده تفاوت معناداری با نمونه شاهد مثبت نداشت.

جدول ۱: مقادیر OD در شاهد مثبت و شاهد منفی در محیط کشت بدون اسانس بابونه در طول موج ۴۹۲nm

تکرار	مقدار OD در نمونه شاهد مثبت بدون اسانس	مقدار OD در نمونه شاهد منفی بدون اسانس*
۱	۰/۰۷۶	۰/۰۴۳
۲	۰/۰۷۳	۰/۰۴۴
۳	۰/۰۷۲	۰/۰۴۴
٤	۰/۰۷۰	۰/۰۴۳
٥	۰/۰۶۳	۰/۰۴۱
۶	۰/۰۷۹	۰/۰۴۲

*مقدار OD به صورت بارز نسبت به نمونه شاهد مثبت کاهش داشت

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: مقادیر OD بدست آمده در نمونه های تست و شاهد مثبت با تعداد باکتری برابر درمحیط کشت حاوی ۰/۵µg/ml اسانس بابونه

تکرار	مقدار OD درنمونه حاوی اسانس (تست) *	مقدار OD در نمونه بدون اسانس (شاهد مثبت)
۱	۰/۰۶۵	۰/۰۷۶
۲	۰/۰۶۷	۰/۰۷۳
۳	۰/۰۶۵	۰/۰۷۲
٤	۰/۰۶۵	۰/۰۷۰
٥	۰/۰۶۳	۰/۰۶۳
۶	۰/۰۶۵	۰/۰۷۹

*مقدار OD به صورت بارز نسبت به نمونه شاهد مثبت کاهش داشت

بحث:

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک بیماریزای فرصت‌طلب یکی از عوامل مهم ایجاد عفونت در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف می باشد. این باکتری با داشتن عوامل بیماریزای متعدد و مقاوم بودن به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های متداول، درمان این بیماری ها را با مشکلات متعددی مواجه ساخته است (۸،۹).

افزایش روزافزون این مقاومت به شکل مقاومت های چندگانه درآمده، به طوری که روند رو به افزایش مقاومت این باکتری در مراکز مختلف درمانی و همچنین در ایران به اثبات رسیده است (۴). درخصوص این باکتری شاید مهمترین نقش کپسول (آلژینات) اتصال باکتری به میزبان و ایجاد بیوفیلم در سطوح آسیب‌دیده مانند نواحی سوخته و در افراد مبتلاء به سیستیک فیبروزیس می‌باشد (۱، ۸،۹).

مطالعات مختلف نشان داده است که غلظت‌های پائین‌تر از مهارکنندگی رشد باکتری (Sub-MIC) می‌تواند بر روی تولید بیوفیلم موثر باشد. برای مثال درمطالعهٔ fonseca و همکاران مشاهده شده است که غلظت های Sub-MIC پیپراسیلین/تیکارسیلین باعث کاهش تولید بیوفیلم می‌شود. این موضوع برای سایر فاکتورهای بیماریزایی نیز به اثبات رسیده است(۷).

در مطالعه‌ای Warren و همکاران، نشان داده شده است که توبرامایسین و جنتامیسین در غلظت‌های Sub-MIC می‌تواند باعث کاهش سطح تولید پروتئازها در سودوموناس گردد(۱۰). همچنین درمطالعات دیگر نیز مشخص شده است که اریترومایسین، کلاریترومایسین و آزیترومایسین می‌توانند باعث کاهش تولید و اثر الاستاز و پروتئازها در غلظت‌های Sub-MIC شوند (۱۲). درواقع این بررسی‌ها بدین لحاظ صورت گرفته است که در صورت اثر آنتی‌بیوتیک درغلظت‌های پائین، بتوانند از آن به عنوان یک عامل پیش‌گیرنده و کنترل‌کنندهٔ عفونت استفاده نمایند. امروزه توجه ویژه‌ای به اثرات ضدمیکروبی گیاهان دارویی شده است و مشخص گردیده که بسیاری از این گیاهان دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشند. مطالعات متعددی نشان داده است که اکثر این گیاهان فاقد اثرضدمیکروبی بر روی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشند (۱۲،۱۳).

دربین گیاهان مختلف، گیاه بابونه آلمانی با نام علمی *Matricaria chamomilla* L. به عنوان یک گیاه با اثرات مختلف یاد شده است. از جمله این اثرات می توان به اثرات ضدالتهابی، مقوی معده (ضداسپاسم)، التیام دهندهٔ زخم و سوختگی، دیورتیک، معرق، ضداسهال، ضدقارچ، میکروب‌کش، بادشکن، اشتهاآور، هضم‌کننده غذا، صفرابر، قاعده آور، درمان دمل و جوش، درمان تب، درمان ناراحتی مفاصل، دفع سنگ‌کلیه، درمان ناراحتی چشمی، درمان یرقان، خواب‌آور و آرام بخش، خلط‌آور، درمان آفت، درمان کولیت کودکان، ضدتشنج، درمان انواع دردها، ضدعفونی کننده و ... اشاره کرد (۱۲).

در بین اثرات، اثر ضدالتهابی و ضدمیکروبی گیاه حائز اهمیت می‌باشد. دربرخی مطالعات و از جمله همین مطالعه نشان داده است که اسانس این گیاه برروی سودوموناس آئروژینوزا فاقد اثر ضدمیکروبی است. در طراحی این تحقیق این سؤال مطرح گردید که هرچند که این اسانس فاقد اثر ضدمیکروبی می‌باشد، اما آیا بر روی فاکتورهای بیماریزایی باکتری نیز اثر دارد. در بررسی‌های صورت گرفته مشخص گردید که این موضوع مورد تحقیق سایرین قرار نگرفته است. از آنجا که هدف اصلی در این سری از مطالعات،

Archive of SID

www.SID.ir

یافتن داروهای مناسب در کنترل عفونت سوختگی می‌باشد، لذا این فرضیه شکل گرفت که چنانچه اسانس بابونه بتواند تولید بیوفیلم را کاهش دهد، لذا می‌توان از آن به عنوان یک افزودنی در پمادهای سوختگی استفاده کرد. در این صورت طراحی‌های مختلف صورت گرفت و نهایتاً بعد از آزمایش‌هایی که مشروح آنها آورده شده است، مشخص گردید که سویه‌های موکوئیدی سودوموناس آئروژینوزای ۸۸۲۱M که یک سویهٔ استاندارد برای مطالعات درمورد بیوفیلم می‌باشد، چنانچه درمعرض اسانس بابونه قرار بگیرد، در غلظت ۰/۵µg/ml نسبت به شاهد مثبت باعث کاهش تولید بیوفیلم می شود. نتایج حاصل از بررسی آماری در شاهد مثبت و منفی نشان دهنده تشکیل بیوفیلم در شاهد مثبت است. با آنالیز GC/MS اسانس در مطالعه قبلی مشخص گردید که ترکیبات متفاوتی با غلظت‌های متفاوت درآن وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به (E)-β-Farnesene (۲۰/۱٪)، Guaiazulene (۲۵/۶٪)، α–Bisabolol oxide (۷/۳٪)، α–Bisabolol (۷/۳٪)، Chamazulene (۱۲/۴٪) و Hexadecanole (۵/۶٪) اشاره کرد (۱۳). برای نگارندگان مشخص نمی‌باشد که کدام یک از این اجزاء چنین اثری را در کاهش تولید بیوفیلم اعمال می‌کند، اما مطالعات نشان می‌دهد که بیشترین اثرات بیولوژیکی اسانس بابونه از این قسم مربوط به ترکیباتی همچون کامازولن و بیزابولول می‌باشد. برای حصول به این نکته که واقعاً کدام یک از این ترکیبات به تنهایی و یا در کنار هم‌چنین اثری را اعمال می‌کند، نیاز به مطالعات بیشتری دارد. همچنین برای رسیدن به هدف نهایی که همانا تولید داروی گیاهی ضد سودوموناس می‌باشد، مطالعات دیگری نیز چه از دیدگاه ایمونولوژیکی و چه از نظر کلینیکی باید بر روی این گیاه صورت گیرد.

نتیجه گیری:

هرچند یافته‌های این تحقیق نشان داده است که اسانس این گیاه در غلظت ۰/۵µg/mlبر روی تولید بیوفیلم اثرگذار می‌باشد، اما این سؤال همچنان باقی مانده است که آیا اسانس بر روی فاکتورهای ویرولانس دیگر باکتری از جمله اگزوتوکسین A و S و پروتئازها و لیپاز و غیره نیز اثر دارد یا خیر. لذا برای حصول به نتیجهٔ نهایی که همان تولید داروی گیاهی می‌باشد نیازمند طراحی‌های آزمایش‌های *In vivo* و *In vitro* متعدد دیگر می‌باشیم.

فهرست مراجع:

1. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Medical Microbiology*, 22nd ed. New York; Mc Graw Hill. 2001; pp: 229- 237.
2. Anwar H, Biesen TV, Dasgupta M, Lam K, Costerton JW. Itroduction of biofilm bacteria with antibiotics in a noven in vitro chemostat system. *Antimicrob Agents Chemother*1989; 60: 539-574.
3. Rusell NJ, Gacesa P. Chemistry and biology of the alginate of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Mol Aspects Med* 1988; 10:1- 91.
4. Rastegar Lari A, Alaghebandan R. Nosocomial infections in in an Iranian Burn Center. *Burnns* 2000; 26: 737- 740.
5. Alzoreky NS, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Inter J Food Microbiol* 2003; 20: 223- 230.
6. Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haohtela K. Vuorela P. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J Ethnopharmacol* 2000; 73: 299- 305.
7. Fonseca AP, Extermina C, Fonseca AF, Sousa JC. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2004; 53: 903-910.
8. ادیب فر پ. میکروب‌شناسی پزشکی ، تهران ، موسسهٔ فرهنگی نوردانش ، ۱۳۷۹ ، صص،۵۸۵ .
9. کاسپر د. اصول طب داخلی هاریسون ۲۰۰۵ ، بیماریهای عفونی (باکتریال) ، ترجمه محقق منتظری س. تهران ، انتشارات تیمورزاده ، ۱۳۸۴، صص،۳۸۰ ـ۳۶۸.
10. Warren RL, Baker NR, Johnson J, Stapleton MJ. Selective inhibition of the accumulation of extracellular proteases of Pseudomonas aeruginosaby gentamicin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 468-472.
11. Molinari G, Guzman CA, Pesce A, Schito GC. Inhibition of Pseudomonas aeruginosa

Archive of SID

www.SID.ir

13. Owlia P, Rasooli I, Saderi H. Antistreptococcal and antioxidant activity of essential oil from Matricaria chamomilla L. *Res J Biol Sci* 2007; 2 (2): 155- 160.

virulence factors by sub inhibitory concentrations of azithromycin and other macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 681- 688.

۱۲. میرحیدر ح. معارف گیاهی ،کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماریها ، دفتر نشر فرهنگ اسلامی ، ۱۳۷۵ ، صص، ۹۴-۱۰۸ .

Archive of SID

www.SID.ir