Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(84): 35-46

The comparison of antimicrobial effects of Chevil (*Ferulago angulata*) extract with a variety of common therapeutic antibiotics in vitro

Tabatabaei Yazdi F[1*], Alizade Behbahani B[2], Heidari Sureshjani M[3]

1- Associate Professor, PhD of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Ph.D studentt of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- MSc Student of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran\

Received: 25 Dec 2013, Accepted: 9 Apr 2014

Abstract

Background: The overuse of therapeutic antibiotics results in the drug resistance. The excessive use of antibiotics causes the mutations in the microorganisms and the emergence of new microorganisms which are resistant against the common antibiotics. With regard to limitations and known side effects of antibiotics, the exploring of antimicrobial compounds seems necessary. The purpose of this study is to evaluate the antimicrobial effects of aqueous and ethanolic extracts of Chevil against *Staphylococcus epidermidis* PTCC 1435, *Yersinia enterocolitica* PTCC 1221 and *Enterobacter aeruginosa* PTCC 1151 and to compare them with the common therapeutic antibiotics.

Materials and Methods: In this experimental study, after collecting plants from the highlands of Chaharmahal va Bakhtiari province, the extraction was carried out by the maceration method. To evaluate the antimicrobial activity, Disc diffusion test with Kirby-Bauer method was used. The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined by using the dilution method.

Results: The highest inhibition zone diameter in 40 mg/ml was related to *Staphylococcus epidermidis* and the minimum diameter in this concentration was related to Gram-negative bacteria, *Enterobacter aeruginosa*. MIC of aqueous and ethanolic extracts for *Enterobacter aeruginosa* 64 and 32 mg/ml and MBC of ethanolic and aqueous extracts of *Enterobacter aeruginosa* were 128 and 64 mg/ml respectively.

Conclusion: The ethanolic extract of the Chevil compared with the common therapeutic antibiotics had more inhibitory effect on studied bacteria. Furthermore, Chevil extracts showed greater inhibitory effect on Gram-positive bacteria in comparison with Gram-negative bacteria.

Keywords: Antibiotic, Drug resistance, *Ferulago angulata*, Inhibition zone diameter

[*]Corresponding Author:
Address: Mashhad, Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Food Science and Technology
Email: farideh_tabatabaee@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 17، شماره 3 (شماره پیاپی 84)، خرداد 1393، 46-35

مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره گیاه چویل (*Ferulago angulata*) با انواع آنتی بیوتیک‌های رایج درمانی در شرایط آزمایشگاهی

فریده طباطبایی یزدی[1*]، بهروز علیزاده بهبهانی[2]، مریم حیدری سورشجانی[3]

1- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
2- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
3- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 92/10/4 تاریخ پذیرش: 93/1/20

چکیده

زمینه و هدف: مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌های درمانی باعث ایجاد مقاومت دارویی شده است. استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها عامل ایجاد جهش(موتاسیون) در میکروارگانیسم بوده و باعث ظهور میکروارگانیسم‌های جدید و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *انتروباکتر ائروژینوزا* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، بعد از جمع آوری گیاه چویل از ارتفاعات استان چهارمحال و بختیاری عصاره‌گیری با استفاده از روش ماسراسیون انجام شد. از آزمون انتشار دیسک به روش کربی- بوئر برای ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی استفاده گردید. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی با استفاده از روش رقت لوله‌ای تعیین گردید.

یافته‌ها: بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد در غلظت 40 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و کم‌ترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژینوزا* بود. حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره آبی و اتانولی برای *انتروباکتر آئروژینوزا به ترتیب* 64 و32 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی و اتانولی نیز در خصوص آن به *ترتیب* 128 و 64 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی چویل در مقایسه با آنتی بیوتک‌های رایج درمانی اثر بازدارندگی بیش‌تری روی برخی سویه‌های مورد مطالعه داشت. هم‌چنین عصاره‌های چویل بر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی اثر بازدارندگی بیشتری را نشان داد.

واژگان کلیدی: آنتی بیوتیک، مقاومت دارویی، چویل، قطر هاله عدم رشد

***نویسنده مسئول:** مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی
Email: farideh_tabatabaee@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

آنتی بیوتیک‌ها داروهایی قوی هستند که مانع تکثیر میکروارگانیسم‌ها شده و در نهایت آنها را از بین می‌برند. مقاومت دارویی به آنتی بیوتیک‌های رایج درمانی موضوعی است که از گذشته وجود داشت(1). به طور معمول مقاومت آنتی بیوتیکی به شکل یک موتاسیون رخ می‌دهد، از آنجا که جهش کروموزمی در باکتری‌ها بسیار بیشتر از موجودات دیگر می‌باشد، لذا میکروب‌ها مرتب تغییر می‌کنند، این تغییرات ممکن است به دلیل ظهور بیماری‌های عفونی نوپدید و بازپدیدی (emerging & reemerging) باشد(2) که در نتیجه پژوهش‌گران را مجبور به تولید آنتی بیوتیک‌های جدید با فعالیت ضد میکروبی مناسب نموده یا اقدام به تجویز تجربی آنتی بیوتیک‌ها بدون آزمایش‌های تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی، که به انتخاب نامناسب یا غیر ضروری آنتی بیوتیک‌ها منجر گردیده است و در نهایت میکروب‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند. با توجه به این که بیماری‌های عفونی و مسمومیت‌زا طیف وسیعی از بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند و از سویی شمار سوش‌های میکروبی مقام به آنتی بیوتیک‌ها هر روز بیشتر می‌شوند، لذا نیاز به مواد ضد میکروبی طبیعی جدید و کم خطر به شدت مورد نیاز می‌باشد. از این رو، بررسی اثر ضد میکروبی گیاهان طبیعی می‌تواند دریچه‌ای برای به دست آوردن آنتی بیوتیک‌های جدید را هموار سازد(3).

استافیلوکوکوس پیدرمیدیس (Staphylococcus epidermidis)، کوکسی گرم مثبت و کواگولاز منفی از جنس استافیلوکوک است. این باکتری، بخشی از فلور هم زیست پوست انسان بوده و در غشای مخاطی بسیاری از جانوران نیز دیده شده است. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* یکی از شایع‌ترین گونه‌های آلوده کننده محیط‌ها و تست‌های آزمایشگاهی است(4). اگرچه این باکتری به طور معمول بیماری‌زا نیست اما توانایی ایجاد عفونت در بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی را دارد. این عفونت‌ها می‌توانند بیمارستانی یا اکتسابی از جامعه باشند اما نوع بیمارستانی آن، خطر بیشتری برای بیماران دارد(5). *یرسینیا انتروکولیتیکا* (Yersinia enterocolitica) کوکوباسیل گرم منفی در خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. این باکتری عامل بیماری یرسینیوز بوده و می‌تواند به غدد لنفاوی مزانتریک گسترش یافته و ایجاد لنفادنوپاتی کند که این حالت خیلی شبیه آپاندیسیت است. از این رو، آپاندیسیت کاذب (pseudoappendicitis) نامیده می‌شود(6). در بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی باکتری ممکن است وارد طحال و کبد شود و در آنجا، آبسه تشکیل دهد. از آنجایی که جنس *یرسینیا انتروکولیتیکا*، باکتری‌هایی آهن دوست (siderophilic) هستند، بیماران مبتلا به هموکروماتوز ارثی(بیماران دارای میزان بالای آهن خون)، حساسیت بیشتری نسبت به عفونت با یرسینیا دارند. در واقع شاید بتوان گفت که یرسینیا انتروکولیتیکا، شایع‌ترین باکتری آلوده کننده فرآورده‌های خونی ذخیره شده است(6). *انتروباکتر ائروژینوزا* (Enterobacter aerogenes) باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که باعث بیماری‌های گوارشی می‌شود. *انتروباکتر ائروژینوزا* کپسول کوچکی داشته و ممکن است به صورت آزاد یا در داخل روده یافت شود و قادر به ایجاد عفونت‌های ادراری وسپسیس می‌باشد(7).

قرن‌های متمادی است که بشر از گیاهان برای درمان بیماری‌ها و سلامت خویش استفاده می‌کند. در گذر زمان، از گیاهان به عنوان غذا یا دارو جهت درمان یا پیش‌گیری از بیماری‌ها، استفاده شده است(8). متأسفانه با وجود تاریخی درخشان در کشور ما در زمینه طب سنتی و حضور دانشمندانی هم چون ابوعلی سینا، زکریای رازی، اسماعیل جرجانی و دیگران که خدمات شایانی به طب سنتی نموده‌اند، امروزه توجه کمی در این زمینه می‌شود(9). گیاه چویل با نام علمی *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss. متعلق به تیره چتریان (Apiaceae) یکی از گیاهان با ارزش و بومی غرب ایران می‌باشد که از زمان‌های گذشته به عنوان مسکن، هضم کننده و درمان کرم‌های روده و هموروئید مصرف می‌شده است. این گیاه علاوه بر ایران در کشورهای ترکیه، سوریه، لبنان و عراق پراکنش دارد(10).

با توجه به روند رو به رشد گیاهان دارویی، وجود ترکیبات فعال بیولوژیکی موجود در گیاه چویل و پراکندگی آن در ایران، به طور کلی اهداف این پژوهش

Archive of SID

www.SID.ir

شامل، تعیین قدرت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی چویل به صورت محلول، تعیین حساسیت سه گونه میکروبی استافیلوکوک اپیدمیدیس PTTC 1435، *انتروباکتر ائروژینوزا* PTTC 1221 و پرسینیا انتروکولیتیکا PTTC1151 نسبت به غلظت‌های مشخص عصاره‌های آبی و اتانولی، مقایسه اثر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های مشخص، بررسی رابطه بین حلال مورد استفاده در عصاره گیری و قدرت ضدمیکروبی عصاره‌های استخراج شده و در نهایت مقایسه بین اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی چویل با آنتی بیوتیک‌های رایج درمانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از 3 سویه استاندارد میکروبی استافیلوکوک اپیدرمیدیس PTTC 1435 ، *انتروباکتر ائروژینوزا* PTTC 1221 و پرسینیا انتروکولیتیکا PTTC1151 استفاده شد. محیط کشت‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث ساخت شرکت مرک آلمان بود. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده نیز شامل استرپتومایسین، کانامایسین، جنتامیسین، متی سیلین، سیپروفلوکساسین و وانکومایسین بود. جمع‌آوری گیاه چویل در ابتدای دوره رویشی(اردیبهشت ماه) از ارتفاعات استان چهارمحال و بختیاری انجام گردید، پس از تایید توسط منابع موجود و با همکاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی و تایید گونه شد. نمونه‌های برگ چویل به آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی و فناوری‌های نوین دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انتقال یافت. پس از تمیز کردن و شست و شو، گیاه چویل در شرایط مناسب(سایه) خشک و توسط آسیاب آزمایشگاهی مدل Waring پودر گردید.

آماده سازی عصاره و عمل عصاره گیری منطبق بر مصرف سنتی این گیاه در منطقه شهرکرد به روش خیساندن (Maceration) انجام گرفت و از حلال‌های آب مقطر و اتانول 96 درجه استفاده شد. برای این منظور 100گرم از برگ‌های پودر شده گیاه چویل به دقت توسط ترازوی دیجیتال وزن شد سپس جهت تهیه عصاره‌های آبی و اتانولی هرکدام را به طور جداگانه به ارلن حاوی 500 میلی‌لیتر آب مقطر و اتانول 96 درجه اضافه گردید، سر ارلن‌ها با پارافیلم بسته و به مدت 72 ساعت در دمای اتاق روی دستگاه هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت تا استخراج عصاره به طور کامل و مطلوب انجام گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط کاغذ صافی(واتمن) از هم جدا شد و تفاله‌ها را فشرده تا کاملا تخلیه شود و در نهایت عصاره‌های اولیه به دست آید. عصاره‌های اولیه حاصل به مدت 10 دقیقه در دور 3000 rpm سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی جمع‌آوری و به منظور تبخیر حلال‌ها عصاره‌ها حاصل وارد دستگاه تقطیر در خلاء(روتاری) شده و در دمای 80 درجه سانتی‌گراد حلال آنها به مدت یک ساعت تبخیر و عصاره‌های تغلیظ شده به دست آمد. پس از این که عصاره‌ها کاملا خشک شدند عصاره‌ها توسط کاردک آزمایشگاهی کاملا تراشیده شدند. جهت حذف هرگونه آلودگی میکروبی، عصاره‌های خشک شده توسط اشعه UV استریل و جهت اطمینان از استریل بودن، عصاره‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار(مرک آلمان) بررسی شد. عصاره‌های حاصل تا زمان انجام آزمایش‌ها در ظرف تیره استریل ریخته و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند(11، 12).

برای تعیین وزن خشک عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل ابتدا وزن یک لوله آزمایش تعیین و 1 میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل در آن ریخته شد. سپس محتوی لوله در دمای اتاق خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره، وزن لوله آزمایش مجددا تعیین گشت. اختلاف وزن لوله معادل 1 میلی‌لیتر از عصاره‌ها است. میانگین سه بار تکرار، به عنوان وزن خشک عصاره‌ها محاسبه شد(13).

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی 24 ساعت قبل از انجام آزمایش، به کمک آنس استریل از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار مولر هینتون آگار تلقیح انجام شد. سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر پس از رشد باکتری بر سطح شیب‌دار آگار تهیه گردید. سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج 530 نانومتر اندازه‌گیری شد و تا برابر شدن کدورت

Archive of SID

www.SID.ir

محلول با کدورت 0/5 محلول استاندارد مک فارلند $1/5\times10^8$ کلنی بر میلی‌لیتر، توسط محلول رینگر رقیق شد(14).

برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه مورد مطالعه از آزمون انتشار دیسک به روش کربی - بوئر و روش پخش عصاره در سطح محیط کشت(تمام ظرف) استفاده شد. در این بررسی از دیسک‌های کاغذی استفاده شد. این روش یکی از مفیدترین روش‌های آزمایشگاهی جهت تعیین حساسیت میکروب‌ها نسبت به مواد ضد میکروبی می‌باشد. در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا $1/5\times10^8$ کلنی بر میلی‌لیتر(معادل استاندارد نیم مک فارلند) از کشت استاندارد هر سوش روی سطح محیط آگار کشت داده شد و توسط اسپریدر شیشه‌ای استریل(کشت چمنی) بر سطح آگار پخش شد. دیسک‌هایی که قبلا در غلظت‌های مشخص عصاره(10، 20، 30 و 40 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) خیسانده شده بودند توسط پنس استریل با کمی فشار بر سطح محیط کشت ثابت گردید. پس از آن محیط ها در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت نگهداری شدند. اثر ضد میکروبی براساس هاله عدم رشد در مقیاس میلی‌متر اندازه گیری شد در ادامه با انجام آزمون آنتی بیوگرام آنتی بیوتیک‌های رایج به مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل با این آنتی بیوتیک‌ها پرداخته شد. تمامی آزمایشات با 3 بار تکرار انجام گرفت(15).

در روش تمام ظرف پس از افزودن 0/2 گرم از عصاره‌های آبی و اتانولی به 5 میلی‌لیتر آب مقطر استریل، مخلوط حاصل به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. سپس 1 میلی‌لیتر از این محلول به ظرف‌های پتری استریل اضافه گشت. پس از آن که محیط کشت استریل مولر هینتون آگار(مرک آلمان) به ظرف‌های پتری اضافه شد یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط‌ها کشت داده شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت(16).

برای تعیین تست حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (Minimum Inhibitory Concentfation-MIC) ابتدا از سوش‌های میکروبی کشت تازه تهیه شد سپس به روش Micro dilution broth و طبق استاندارد NCCLS انجام گرفت. رقت‌های متوالی از عصاره چویل(2، 4، 8، 16، 32، 64، 128 و 256 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرم خانه‌گذاری شد. کم‌ترین غلظتی از عصاره‌های آبی و اتانولی چویل که مانع از رشد باکتری شده و در آن کدورتی مشاهده نشد به عنوان MIC گزارش گردید(17، 18).

برای تعیین میزان دقیق حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bacteri cidal Concentration-MBC) عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل نیز از تمامی لوله‌هایی که در آن کدورتی مشاهده نشده بود نمونه‌برداری شد و جهت تعیین MBC به روش Pour Plate Method کشت داده شد. لوله‌ای که حاوی کم‌ترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ کلنی رشد نکرده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد(19).

داده‌ها، حاصل از تاثیر 4 سطح متفاوت غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل بر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی بود. هر یک از آزمون‌ها در سه تکرار انجام پذیرفت و میانگین آنها به روش تحلیل واریانس یک طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. هم‌چنین برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $p\leq0/05$ استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی چویل به روش پخش عصاره در سطح محیط کشت در جدول 1 نشان داده شده است. این نتایج نشان داد که عصاره آبی و اتانولی در غلظت 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* کاملا موثر بوده اما فاقد اثر ضد باکتریایی مشخصی روی *انتروباکتر ائروژینوزا* بود و از رشد این باکتری بر روی محیط کشت جلوگیری نکرد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1. اثر ضد میکروبی غلظت 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *انتروباکتر ائروژینوزا*(پخش عصاره در محیط کشت)

میکروارگانیسم	عصاره آبی گیاه چویل
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	+
یرسینیا انتروکولیتیکا	+
انتروباکتر ائروژینوزا	-
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	++
یرسینیا انتروکولیتیکا	+
انتروباکتر ائروژینوزا	-

علامت(++) نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم بر محیط کشت و وجود فعالیت ضد میکروبی قوی عصاره‌های اتانولی گیاه چویل می‌باشد.
علامت (+) نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم بر محیط کشت و وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل می‌باشد.
علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی واتانولی گیاه چویل می‌باشد.

نتایج حاصله از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل به روش انتشار در آگار(به کمک دیسک) در جدول 2 آورده شده است. نتایج نشان داد که بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد در غلظت 40 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و کم‌ترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژینوزا* بود. هم‌چنین نتایج نشان می‌دهد که عصاره اتانولی گیاه چویل در تمامی غلظت‌ها روی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* و در غلظت‌های 30 و 40 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی *انتروباکتر ائروژینوزا* دارای اثر بازدارندگی بود. هم‌چنین مشاهد شد به جز درغلظت‌های 10 با 20 و 20 با 30 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی بر روی *انتروباکتر ائروژینوزا* در بقیه موارد اختلاف میانگین قطر عدم رشد(به صورت دو به دو) با هم معنی‌دار می‌باشد. در مقایسه دو به دو میان غلظت‌های عصاره اتانولی بر *انتروباکتر ائروژینوزا* نیز اختلاف میانگین قطر بازدارندگی مشاهده شد.

جدول 2. میانگین قطر هاله عدم رشد بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *انتروباکتر ائروژینوزا* بر حسب میلی‌متر در حضور عصاره‌های اتانولی و آبی برگ گیاه چویل(کربی - بوئر)

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه چویل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
		10	20	30	40
اتانولی	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*	^{a}0/50±10/30	^{b}0/50±12/40	^{c}0/57±15/00	^{d}0/50±17/60
اتانولی	*یرسینیا انتروکولیتیکا*	^{a}0/57±8/00	^{b}0/50±10/00	^{c}0/53±12/00	^{d}0/57±13/80
اتانولی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	^{a}0/50±7/10	^{b}0/57±9/20
آبی	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*	-	^{a}0/57±8/50	^{b}0/57±10/40	^{c}0/28±14/00
آبی	*یرسینیا انتروکولیتیکا*	-	^{a}0/50±7/10	^{b}0/50±9/20	^{c}0/50±12/00
آبی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	^{a}0/57±7/30

علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد باکتری عصاره آبی و اتانولی گیاه چویل می‌باشد.
حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/05$) میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.
حروف مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/05$) میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.
نتایج حاصل از میانگین سه تکرار(آزمون آماری چند دامنه‌ای دانکن) در سطح معنی داری($p\leq0/05$) است و داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار آورده شده است.

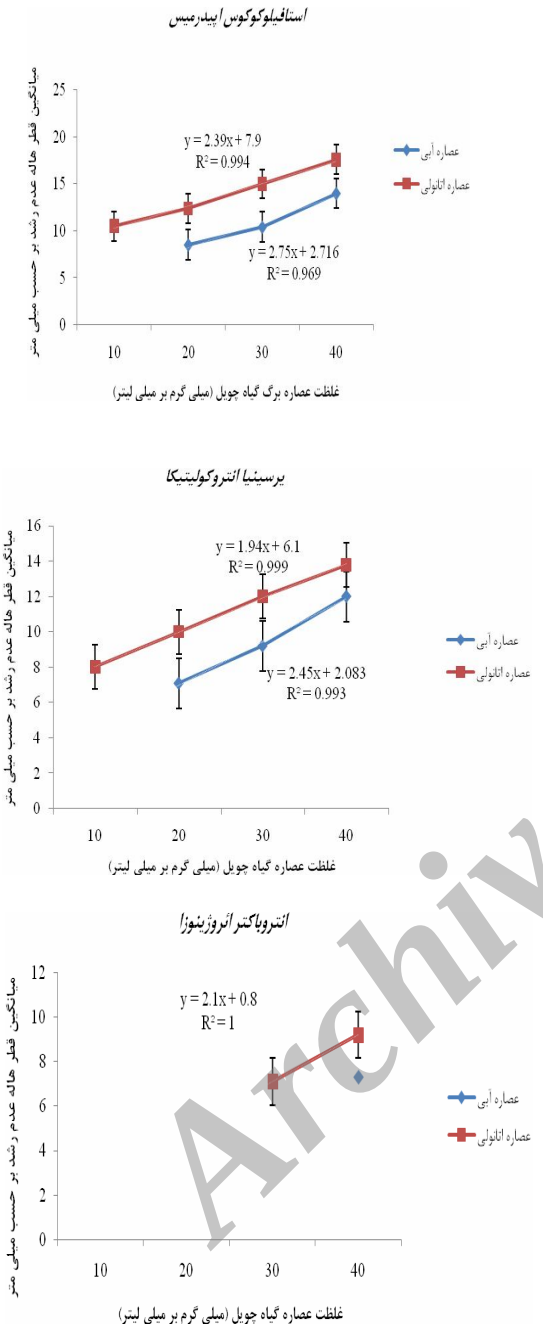
عصاره آبی روی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* تنها در غلظت 10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر بازدارندگی نشان نداد. در مورد اثر ضد میکروبی عصاره آبی روی *انتروباکتر ائروژینوزا* فقط غلظت 40 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر بازدارندگی مشاهده گردید. مقایسه دو به دو میانگین‌های قطر هاله عدم رشد در مورد عصاره اتانولی بر باکتری‌های مورد بررسی نشان داد که در تمامی غلظت‌ها، میانگین قطر عدم رشد اختلاف معنی‌دار دارند. غلظت مؤثر عصاره‌ها(غلظتی با بیش‌ترین اثر ضد باکتریایی) به کمک نتایج آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری 5 درصد تعیین شد. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون مشاهده شد هم در مورد عصاره اتانولی و هم در مورد عصاره آبی غلظت موثر 40 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ماده مؤثر موجود در عصاره‌ها نسبت داد. ولی به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می‌کند(شکل 1).

نتایج مربوط به تاثیر شش آنتی بیوتیک رایج بر میزان هاله عدم رشد بر دو باکتری گرم منفی و یک باکتری گرم مثبت در جدول 3 آورده شده است. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی(جدول 4) نشان می‌دهد MIC عصاره اتانولی گیاه چویل برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *انتروباکتر ائروژینوزا* به ترتیب 4، 16 و 32 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و MIC عصاره آبی برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *یرسینیا انتروکولیتیکاو انتروباکتر ائروژینوزا* به ترتیب 8، 32 و 64 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی MBC عصاره‌های آبی و اتانولی چویل در جدول 5 آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد MBC عصاره اتانولی گیاه چویل برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *انتروباکتر ائروژینوزا* و به ترتیب 8، 32 و 64 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و MBC عصاره آبی برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *انتروباکتر ائروژینوزا* و به ترتیب 16، 64 و 256 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.



شکل 1. اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و اتانولی بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *انتروباکتر ائروژینوزا*

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 3. میانگین قطر هاله عدم رشد شش آنتی بیوتیک رایج بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *انتروباکتر ائروژینوزا* بر حسب میلی‌متر(کربی - بوئر)

میکروارگانیسم	وانکومایسین	سیپروفلوکساسین	آنتی بیوتیک متی سیلین	جنتامیسین	کانامایسین	استرپتومایسین
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	7/2	25	7	17/2	7	7
یرسینیا انتروکولیتیکا	7	23/3	7/1	18	14/3	11
انتروباکتر ائروژینوزا	10	22	8	17	18	14

نتایج حاصل از میانگین سه تکرار(آزمون آماری چند دامنه‌ای دانکن) در سطح معنی داری($p\leq0/05$) است.

نتایج حاصل از میانگین سه تکرار(آزمون آماری چند دامنه‌ای دانکن) در سطح معنی داری($p\leq0/05$) است و داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار آورده شده است.

جدول 4. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد(MIC) عصاره‌های اتانولی و آبی عصاره گیاه چویل بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *انتروباکتر ائروژینوزا*

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه چویل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) کنترل	2	4	8	16	32	64	128	256
اتانولی	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*	-	-	+	+	+	+	+	+	+
اتانولی	*یرسینیا انتروکولیتیکا*	-	-	-	-	+	+	+	+	+
اتانولی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	+	+	+	+
آبی	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
آبی	*یرسینیا انتروکولیتیکا*	-	-	-	-	-	+	+	+	+
آبی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	+	+	+

(+): عدم رشد

(-): رشد

جدول 5. نتایج حداقل غلظت کشندگی(MBC) عصاره‌های اتانولی و آبی عصاره برگ گیاه چویل بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، یرسینیا انتروکولیتیکا و *انتروباکتر ائروژینوزا*

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه چویل (میلی گرم بر میلی لیتر) کنترل	2	4	8	16	32	64	128	256
اتانولی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	-	-	-	+	+	+	+	+	+
اتانولی	یرسینیا انتروکولیتیکا	-	-	-	-	-	+	+	+	+
اتانولی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	+	+	+
آبی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	-	-	-	-	+	+	+	+	+
آبی	یرسینیا انتروکولیتیکا	-	-	-	-	-	-	+	+	+
آبی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+): عدم رشد

(-): رشد

بحث

مقایسه نتایج بین اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی چویل در برابر هر شش آنتی‌بیوتیک رایج درمانی در این پژوهش نشان داد که اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در بالاترین غلظت حداکثر بود و این میزان 0/50±17/60 به دست آمد(جدول 2) و این میزان بازدارندگی از تمامی آنتی بیوتیک‌ها به جز آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشتر بود. هم‌چنین اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی چویل به روش کربی - بوئر بر

Archive of SID

www.SID.ir

یرسینیا انتروکولیتیکا از سه آنتی بیوتیک دیگر(کانامایسین، سیپروفلوکساسین و جنتامیسین) کم‌تر بود و در مقایسه با سه آنتی بیوتیک دیگر(استرپتومایسین، متی سیلین، و وانکومایسین) بیشتر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی بر روی باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژینوزا* در مقایسه با همه آنتی بیوتیک رایج به جز آنتی بیوتیک متی سیلین اثر ضد میکروبی کم‌تری داشت. استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها در سال‌های اخیر موجب شده است که باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف از گروه‌های مختلف مقاوم شوند، به طوری که در حال حاضر وجود سویه‌هایی با مقاومت چندگانه نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مشکل اصلی در درمان میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت می‌باشد(20، 21).

اولیاء و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره آویشن و آنتی بیوتیک اگزاسیلین بر *استافیلوکوکوس اورئوس* را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران بیان داشتند که با توجه به افزایش روز افزون مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی بیوتیک‌های متداول، استفاده از گیاهان دارویی می‌تواند یک روش جای‌گزین مناسب باشد(22).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل به خوبی از رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی جلوگیری کرد. نتایج این مطالعه حساسیت بیش‌تر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی در مقابل عوامل ضد میکروبی را نشان داد. با توجه به تعداد ترکیبات شیمیایی در عصاره گیاه چویل، نمی‌توان مکانیسم واحدی برای فعالیت ضد باکتریایی آن در نظر گرفت. از ویژگی‌های مهم عصاره چویل و اجزاء تشکیل دهنده آن خاصیت آب گریزی آنها می‌باشد که موجب نفوذ این مواد به لیپیدهای غشاء سلول باکتری و میتوکندری‌ها می‌شود و سبب اختلال در ساختمان‌های آنها و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می‌گردد. این مسئله موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی می‌شود. اگرچه خروج مقادیر محدود این مواد برای باکتری قابل تحمل است ولی در قابلیت زیستی آن اثر گذاشته و خروج مقادیر وسیع محتویات سلولی یا خروج یون‌ها و مولکول‌های حیاتی موجب مرگ سلول خواهد شد(23). گازیم و همکاران اثر ضد میکروبی همیشه بهار را بر روی تعدادی از سوش‌های گرم مثبت و گرم منفی به روش دیسک آگار مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که بیش‌ترین اثر عصاره همیشه بهار بر روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* می‌باشد(24). در پژوهشی دیگری که توسط ال یوسف بر روی انجیر انجام شده مشخص شد که انجیر دارای اثرات قابل توجهی بر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتلیس* و هم‌چنین بر روی باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کلی* و *پسودوموناس ایروژینوزا* و *پروتئوس ولگاریس* می‌باشد. هم‌چنین این تاثیر بر روی باکتری‌های گرم مثبت به مراتب بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود(25). نتایج ما نیز نشان داد که باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *انتروباکتر ائروژینوزا* حساسیت بیش‌تری داشت. در مطالعات دیگر نیز محققین بر افزایش اثر ضد میکروبی عصاره‌های گیاهان مختلف بر باکتری‌های گرم مثبت مهر تایید زده‌اند. علیزاده بهبهانی و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی اسطوخودوس و رزماری را بر روی باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس ارئوس* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره‌های اتانولی هر دو گونه گیاهی اثر ضد میکروبی بیشتری بر روی *استافیلوکوکوس ارئوس* داشت. این محققان علت این پدیده را به دلیل تفاوت دیواره باکتری‌های گرم مثبت در قیاس با باکتری‌های گرم منفی عنوان نمودند. زیرا باکتری‌های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ترکیب موکوپپتید بوده، در حالی که باکتری‌های گرم منفی فقط لایه نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آنها لیپوپروتئین و لیپوپلی ساکارید است، به همین علت در مقابل مواد ضد باکتریایی مقاوم‌ترند(26). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که

Archive of SID

www.SID.ir

عصاره اتانولی گیاه چویل در مقایسه با عصاره آبی گیاه چویل اثر بازدارندگی بیش‌تری روی سوش‌های مورد مطالعه دارد. علت آن درصد استحصال بیشتر عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی و در نتیجه استخراج بیشتر مواد موثر در گیاه چویل توسط حلال اتانول می‌باشد. طباطبایی و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه کلپوره را بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش‌گران نشان داد که هر دو عصاره آبی و اتانولی اثر بازدارندگی بر روی سوش‌های مورد مطالعه دارند و اثر بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. هم‌چنین این محققان اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه کلپوره را بیشتر از اثر ضد میکروبی عصاره آبی آن گزارش کردند که علت این پدیده را درصد استحصال بیشتر عصاره توسط حلال اتانول و در نتیجه بالاتر بودن وزن خشک عصاره اتانولی را دلیل این پدیده ذکر نمودند. این نتایج با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد(27).

وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ماده مؤثر موجود در عصاره‌ها نسبت داد. ولی به طوری کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه چویل میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می‌کند(شکل 1). براساس مطالعه‌ای که توسط جاوید نیا و همکاران صورت پذیرفت مشخص گردید که از مجموع 24 ترکیب شناسایی شده در اسانس گیاه چویل، سیس بتا-اوسمین با 41/35 درصد بیش‌ترین ترکیب را شامل می‌شود، بنابر این شاید بتوان عنوان نمود که بخش زیادی از اثر ضد میکروبی عصاره گیاه چویل مربوط به ترکیب سیس بتا-اوسمین می‌باشد. هم‌چنین این پژوهش‌گران بیان نمودند که بازده اسانس در گیاه چویل 0/5 درصد است(28).

از نتایج حاصل از MIC و MBC عصاره اتانولی گیاه چویل نیز می‌توان نتیجه گرفت، بیش‌ترین مقاومت مربوط به باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژینوزا* بود(جدول 3، 4). با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان بیان نمود که عصاره گیاه چویل دارای اثر ضد میکروبی مناسبی برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن و بیماری‌زا می‌باشد. امید است در آینده تحقیقات بیش‌تری در زمینه اثر ضدمیکروبی این گیاه بر گونه‌های مختلف میکروبی انجام گیرد تا با یافتن مواد موثره ضدمیکروبی گیاه چویل اقدام ارزنده‌ای جهت بهبود بیماری‌هایی عفونی ناشی از گونه‌های مختلف میکروبی، انجام گیرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به این که بیماری‌های عفونی و مسمومیت‌زا طیف وسیعی از بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند و از سویی شمار سوش‌های میکروبی مقام به آنتی بیوتیک‌ها هر روز بیشتر می‌شوند، لذا نیاز به مواد ضد میکروبی طبیعی جدید و کم خطر به شدت مورد نیاز می‌باشد. از این رو، بررسی اثر ضد میکروبی گیاهان طبیعی می‌تواند دریچه‌ای برای به دست آوردن آنتی بیوتیک‌های جدید را هموار سازد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد، به طور کلی عصاره گیاه چویل در شرایط برون تنی دارای قابلیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای روی سویه‌های مورد مطالعه بوده و در ادامه لازم است مطالعات بیش‌تری در شرایط داخل بدن انجام شود تا عواملی هم چون دوز موثر این عصاره بر باکتری‌های مورد نظر مورد ارزیابی قرار گیرد تا در نهایت از عصاره گیاه چویل برای کنترل بیماری عفونی و مسمویت زا استفاده شود و بتوان از این عصاره در تهیه آنتی بیوتیک‌های جدید بهره برد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از خانم دکتر عادله حیدری سورشجانی و خانم مهندس آزاده ظهوری که در فراهم نمودن مواد لازم و انجام آزمایش‌ها ما را یاری کردند، قدردانی می‌شود. مقاله علمی ـ پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد 26852 مصوب تاریخ 1392/2/1 در

Archive of SID

www.SID.ir

دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. Jama. 2003;289(7):885-8.
2. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. The Lancet infectious diseases. 2010; 10(9): 597-602.
3. Masomi J, Yadegari D, Mozoni Sh. More appropriate antimicrobial agents for antibiogram. Iranian Journal of Infectious Disease and Tropical Medicine. 2005; 10(29): 53-8.[Persian]
4. Queck SY, Otto M. Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative staphylococci. Staphylococcus: Molecular Genetics. 2008:227-55.
5. Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Infection and immunity. 2001; 69(6):4079-85.
6. Benvenga S, Santarpia L, Trimarchi F, Guarneri F. Human thyroid autoantigens and proteins of Yersinia and Borrelia share amino acid sequence homology that includes binding motifs to HLA-DR molecules and T-cell receptor. Thyroid. 2006;16(3):225-36.
7. Doyle MP, Buchanan RL. Food microbiology: fundamentals and frontiers: ASM Press; 2013.
8. Sadighi J, Maftoon F, Ziaei S. Herbal medicine: Knowledge, attitude and practice in Tehran. Journal of Medicinal Plants. 2005; 4(13): 11-8. [Persian]
9. Ayoobi F, Kamali B, Shamsizadeh A, Sajadi MA, Roohbakhsh A, Vazirinejad R, et al. Effect of Aqueous Extract of Descurainia Sophia on Castor Oil-Induced Diarrhea in Male Rat. Journal of Rafsanjan University Medical Science. 2013; 12(2): 149-56. [Persian]
10. Mozzafarian V. Encyclopedia of Plants. Farhange Moaser Publication. 2009.p.740-1.[Persian]
11. Behbahani BA, Shahidi F, Yazdi FT, Mohebbi M. Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus “in vitro”. International Journal of Agronomy and Plant Production. 2013; 4(7): 1652-8.
12. Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Shahidi F, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of Satureja bachtiarica extracts aqueous, ethanol, methanol and glycerin on streptococcus pyogenes, pseudomonas aeruginosa and staphylococcus epidermidis. Scientific Journal of Microbiology. 2013;2(2):53-60.
13. Mortazavi SA, Shahidi F. Antimicrobial effect of Satureja bachtiarica extracts aqueous and ethanolic on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Scientific Journal of Biological Sciences. 2013;2(2): 24-31.
14. Mortazavi SA. Effect of aqueous and ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis L. on food infection and intoxication microorganisms “in vitro”. Journal of Paramedical Sciences. 2013;4(3): 89-99.
15. Babayi H, Kolo I, Okogun J, Ijah U. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. 2004;16(2):106-11.
16. Awoyinka O, Balogun I, Ogunnowo A. Phytochemical screening and in vitro bioactivity of Cnidoscolus aconitifolius (Euphorbiaceae). Journal of Medicinal Plants Research. 2007;1(3):063-5.
17. Golshani Z, Davoodi V. In vitro antimicrobial effect of Rosmarinus officinalis leaf extract against some pathogens. Arak University of Medical Sciences Journal. 2013; 16(77): 82-9. [Persian]
18. Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G, et al. Antimicrobial

Archive of SID

www.SID.ir

and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of Salvia cryptantha(Montbret et Aucher ex Benth and Salvia multicaulis(Vahl). Food Chemistry. 2004;84(4):519-25.
19. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for Aspergillus spp.: NCCLS collaborative study. Journal of clinical microbiology. 2002;40(9):3204-8.
20. Tsukayama D, Van Loon H, Cartwright C, Chmielewski B, Fluit A, Werken Cvd, et al. The evolution of Pseudomonas aeruginosa during antibiotic rotation in a medical intensive care unit: the RADAR-trial. International journal of antimicrobial agents. 2004;24(4):339-45.
21. Mirsalehian A, Feyzabadi M, Akbari Nakhjavani F, Jabal Ameli F. Prevalence of Extended Spectrum Beta Lactamaces among Strains of Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Burn Patients. Tehran University Medical of Journal. 2008; 66(5): 333-7. [Persian]
22. Owlia P, Sadari H, Niyazmand F, Rezaei MB. Antimicrobial effect of extract Zataria Multiflora Boiss and oxacillin on Staphylococcus aureus. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants. 2007; 22(1): 22-6.[Persian]
23. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International journal of food microbiology. 2004;94(3):223-53.
24. Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Svidzinski TIE, Cortez DAG. Antifungal activity of the essential oil from Calendula officinalis L.(Asteraceae) growing in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 2008;39(1):61-3.
25. Al-Yousuf HHH. Antibacterial activity of Ficus carica L. extract against six bacterial strains. IJDDR. 2012;4:307-10.
26. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mortazavi A. Antimicrobial effects of Lavandula stoechas L. and Rosmarinus officinalis L. extracts on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Scientific Journal of Microbiology. 2013;2(1):15-22.
27. Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria “in vitro”. Journal of Paramedical Sciences. 2013; 4(4): 55-61.
28. Javidnia K, Miri R, Edraki N, Khoshneviszadeh M, Javidnia A. Constituents of the volatile oil of Ferulago angulata (Schlecht.) Boiss. from Iran. Journal of essential oil research. 2006;18(5):548-50.

Archive of SID

www.SID.ir