

## مطالعه اثرات ضد باکتریایی و فیتوشیمیایی عصاره تام ۱۲ گونه از گیاهان بومی ایران بر سوش‌های بیماری‌زای نوکاردیا

### • سید سعید اشراقی

دانشیار گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران (نویسنده مسئول)

### • غلامرضا امین

دانشیار گروه فارماکوتکنولوژی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

### • سوسن فخری

داروساز، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی

تاریخ دریافت: مهر ماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: تیر ماه ۱۳۸۷

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۲۱-۸۸۹۷۳۶۶۰

Email: eshraghs@sina.tums.ac

### چکیده

تنوع آب و هوایی و وجود فصول چهارگانه در ایران، پوشش گیاهی متنوع و بسیار غنی را در کشور ما بوجود آورده است. به طوریکه گاهی در یک پهنه رویشی محدود، انواع گوناگونی از گیاهان را می‌توان مشاهده کرد. این پدیده زمینه مساعدی را برای تحقیق و بررسی در مورد خواص مختلف این گیاهان از جمله خواص دارویی و شیمیایی آنها فراهم می‌سازد. در سال‌های اخیر به دلیل مصرف غیراصولی و نابه‌جای داروهای شیمیایی به خصوص آنتی‌بیوتیک‌ها مانند خود درمانی دارویی، استفاده طولانی از داروهای شیمیایی در عفونت‌های مزمن، دگرگونی در ژنوم میکروارگانیسم‌ها موارد متعددی از دشواری در درمان و نیز مقاومت میکروبی در دنیا بوجود آمده و شرایط برای رشد میکروب‌های فرصت طلب نظیر نوکاردیا فراهم گردیده است. لذا تحقیق برای یافتن مواد ضد میکروبی از گیاهان دارویی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته تا از فرآورده‌های گیاهی، جایگزین‌های مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی به دست آورند. هدف اصلی در این مطالعه بررسی فیتوشیمیایی و اثرات ضد باکتریایی چند گونه گیاهی بومی ایران بر علیه باکتری‌های عامل بیماری نوکاردیوز. مقایسه اثر ضد میکروبی این گیاهان با آنتی‌بیوتیک‌های رایج بر باکتری فوق و معرفی آن به عنوان جایگزین مناسب برای داروهای انتخابی علیه این باکتری بوده است. اگر چه نوکاردیاهای از قدرت تهاجمی زیادی برخوردار نیستند، لیکن قادرند در میزبانان با ضعف ایمنی، بیماری عفونی و خطرناک نوکاردیوز را ایجاد نمایند. ابتدا گیاهان مورد نظر جمع‌آوری و تعیین نام علمی گردیدند و پس از تهیه عصاره متانولی با رقت‌های ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد (w/v) و با استفاده از روش‌های انتشار در آگار، تأثیر آنها در مهار رشد نوکاردیاهای مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات فیتوشیمیایی بر روی عصاره‌های تهیه شده نیز به منظور بررسی وجود فلاونوئید، آلکالوئید، تانن و ساپونین و غیره انجام گرفت. نتایج حاصله حاکی از آن است که عصاره الکلی شش گونه گیاهی مورد مطالعه شامل مامیران، شقایق کوهی، شیرین بیان، گلپر، پونه بینالود و گل مورو اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر نوکاردیاهای نشان می‌دهند. از آنجا که *Nocardia asteroides* و *N. brasiliensis* به رقت‌های مختلف گیاهان مورد مطالعه حساسیت قابل توجهی نشان دادند و در محیط کشت‌هاله عدم رشد تشکیل شد، تأثیر کامل گیاهان فوق بر گونه‌های نوکاردیاهای محرز می‌باشد. با مقایسه قطر هاله‌های شفاف تشکیل شده با رقت‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد (w/v) و نیز ۶ گونه گیاهی از مجموع ۱۲ گونه و قطر هاله ایجاد شد با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد علیه نوکاردیا در شرایط کاملاً یکسان، به این نتیجه می‌رسیم که غلظت مورد استفاده این آنتی‌بیوتیک‌ها، متناسب با غلظت گیاهان مورد مطالعه در محیط *in-vitro* بوده و تأثیر ضد میکروبی این گیاهان تقریباً مشابه آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** گیاهان دارویی، فیتوشیمیایی، ضد باکتریایی، نوکاردیا، فلاونوئید، ساپونین، تانن

Veterinary Researches in Pajouhesh &amp; Sazandegi No 82 pp: 62-73

**Study of antibacterial and phytochemical properties of 12 herb extracts against pathogenic nocardia strains**

By: S.S Eshraghi, Department of Pathobiology, School of Public Health, University of Tehran / Medical Sciences, Tehran, Iran (Corresponding Author, Tel: +982188973660)

Gh. Amin, Department of Pathobiology, School of Public Health, University of Tehran / Medical Sciences, Tehran, Iran. S. Fakhri, Pharmacognosy Department, Faculty of Pharmacy: Research Center of Medicinal Plants, University of Tehran / Medical Sciences, Tehran, Iran.

The four full seasons & the various climates in our country Iran, have certainly contributed to the variety of flora in Iran, some of which demonstrate wonderful therapeutic effects. This is of particular interest when one considers such problems as antibiotic resistance and other side effects of synthetic drugs which have caused global interest in the growth of new disciplines such as pharmacognosy. In regard to important role of infectious disease in treating the life of people, and also inaccessibility to useful drugs with minor side effects, we decided to consider the ability of methanolic extract of 12 herbs in preventing the growth of bacteria. For this purpose, we chose 2 strains of nocardia (*N. asteroides* and *N. brasiliensis*) as original bacteria. After performing phytochemical tests to determine the quality of flavonoids, alkaloids, tannin and saponin, nine concentrations of methanolic extract of 12 different herbal species were prepared. The organisms were cultured in their specific media and tempted the antibacterial properties of the extracts by means of distribution method in agar (Drop - Plate, Disk plate, and Well - plate). After the distribution of herbal extracts in agar, the diameter of the clear zone formed has been measured, this is related to the ability of extract to prevent the growth of bacteria. According to the results, *N. asteroides* and *N. brasiliensis*, has nearly shown the same susceptibility to various concentrations of herbal extract (2.5, 5, 7.5 & 10 percent), and the complete clear zones proved that the extracts have significantly effective in controlling Nocardia strains. Due to the results, that were found the highly susceptible of Nocardia strains to the herbal extracts, it is evident that these extracts contain antibacterial effects. It was found that the 6 medicinal plants out of the 12 herbs have potent antibacterial property. We came to this conclusion formed by 10% concentration of the above herbal extracts in appropriate distribution routs, were similar to that of the clear zones formed by specific antibiotic against Nocardia species, e.g. Amikacin, Amoxicillin, Cefotaxime, Ceftriaxone/Cefotaxime, Cephalothin, Cotrimoxazol. The antibacterial activity of the above herbs is probably associated to the potency of strong antibacterial properties of alkaloids, flavonoids, saponins and tanans presents in the methanolic extraction of those six medicinal plants.

**Keywords:** Medicinal plants, Antibacterial phytochemical, Nocardia, Flavonoids**مقدمه**

کبد و مغز استخوان نیز دیده می‌شود (۱۹، ۲۹، ۴۲) به طور کلی اغلب کسانی که به هر دلیل سیستم دفاع سلولی آنها تضعیف شده باشد در معرض خطر ابتلا به نوکاردیوز ریوی هستند. از میان گونه‌های مختلف این باکتری، *N. asteroides* کمپلکس (استروئیدس، فارسینیکا و نووا) شایع‌ترین و خطرناکترین گونه پاتوژن انسانی محسوب می‌شود (۱۰، ۱۱، ۳۳) و عامل اصلی عفونت در جهاز تنفسی است که معمولاً با ایجاد آبسه‌های متاستاتیک موجبات سیستمیک شدن بیماری را فراهم می‌کند (۱۴، ۲۸) گونه‌های دیگر نوکاردیا مانند برازیلینسس و کاویه نیز در ایجاد عفونت‌های انسانی دخیل می‌باشند ولی نیاز به ضعف سیستم ایمنی میزبان نداشته و عفونت اولیه ایجاد می‌نمایند (۴۷، ۵۱، ۵۶). استفاده از آنتی بیوتیک‌های مناسب مانند سولفانامیدها، سولفامتوکسازول به همراه تریمتوپریم (باکتریم)، گاهی عمل جراحی، درناژ چرک و حذف بافت نکروزه روش‌های متداول درمان عفونت‌های نوکاردیائی می‌باشد (۳۰)

استفاده از گیاهان دارویی از گذشته‌های دور برای درمان انواع بیماری‌ها مورد توجه مردم بوده است و از این میان بیماری‌های عفونی اهمیت قابل ملاحظه‌ای داشته است. در طول سال‌های گذشته مطالعات بسیاری بر روی عوامل ایجاد عفونت یعنی میکروارگانیسم‌ها و تاثیر عصاره گیاهان مختلف برای کنترل رشد آنها صورت گرفته است. سرکوب دستگاه ایمنی، علی‌الخصوص عملکرد ناپه‌نجر ایمنی سلولی، زمینه را برای تهاجم میکروارگانیسم‌های فرصت طلب نظیر نوکاردیا فراهم می‌نماید (۴، ۱۲، ۲۳). عفونت‌های مزمن و پیشرفته ریه مانند سل و سیلیکوز، برونشکتازی، آمفیژم ریوی، گرانولوماتوز مزمن، بیماری‌های بافت کلژن رگ‌ها، لوپوس اریتماتوز، دیابت ملیتوس و غیره باعث افزایش حساسیت فرد نسبت به نوکاردیا می‌شود (۲۰، ۲۸، ۳۱)، این فرآیند در مبتلایان به ایدز، لوسمی، لنفوم، هوچکین و گیرندگان پیوند عضو مثل کلیه، قلب،

۴۴، ۶۰.

بهار می‌روید و به دلیل اهمیت داروئی و اقتصادی که دارد مورد توجه می‌باشد. از جمله مصارف درمانی این گیاه می‌توان به درمان آبسه دندان، آئزین، آسم، برونشیت، سیاه سرفه و بی خوابی اشاره کرد (۳۴). به طور کلی گونه‌های مختلف تیره خشخاش در طب سنتی ایران با کاربردهای مختلف از جمله در درمان درماتیت مورد استفاده قرار می‌گرفته است (۵۴). با توجه به اهمیت آلکالوئیدهای خانواده خشخاش، مطالعه فیتوشیمیائی عصاره این تیره بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۵۳).

۵- پاپاور با نام علمی (*Papaver fugax*) مانند مامیران و شقایق کوهی، گیاهی است علفی و زیبا از تیره خشخاش (*Papaveraceae*). میوه آن گرز مانند و دارای صفحه مسطح کلاله است. جوشانده کپسول‌ها جهت رفع بی خوابی مصرف دارد. گل‌های آن اثر آرام بخش، معرق، خلط آور، ضد برونشیت، سرفه آسم و غیره و دانه‌های آن نیز اثر ملین ملایم دارد (۶۳).

۶- شیرین بیان با نام علمی (*Glycyrrhiza glabra*) گیاهی است علفی، پایا از تیره نخود (*Fabaceae*)، زیر تیره پروانه واران (*Papilionaceae*). ریشه خشک شده و ریزوم این گیاه به عنوان یک داروی گیاهی و نیز بر طرف کننده طعم ناپسند بعضی از داروها به کار می‌رود. با مسهل‌های قوی که مصرف آن‌ها معمولاً پیچش و ناراحتی روده بوجود می‌آورد، مخلوط می‌گردد، زیرا مصرف خوراکی شیرین بیان موجب کم شدن انقباضات روده می‌شود. این دارو به عنوان خلط آور، ضد برونشیت و التهاب نای، برطرف کننده ناراحتی‌های گوارشی مانند التهاب و زخم معده و اثنی عشر و غیره مصرف داروئی دارد (۶، ۴۱، ۴۵).

۷- اسپرس گیاهی است یکساله با نام علمی (*Onobrychis sativa*) از تیره نخود (*Fabaceae*)، وعلوفه بسیار خوب دام است. از گل‌های آن عسل مرغوب فراهم می‌شود. دانه اش به عنوان معرق گیاهی مصرف سنتی دارد (۶۳).

۸- پونه با نام علمی (*Nepeta*) گیاهی است پایا و معطر از تیره نعنا که گونه‌های متعددی از این گیاه در ایران شناخته و مورد مطالعه قرار گرفته است (۳، ۵۹). پونه بینالود یکی از گونه‌های این تیره است که با نام علمی (*Nepeta binaludensis*) شناخته می‌شود، خواص درمانی زیادی دارد ولی در ایران بسیار کمیاب بوده و محل رویش آن در ارتفاعات باران خیز حدود ۲۴۰۰ متر بالا تر از سطح دریا و دمای ۶-۷ درجه سانتیگراد می‌باشد. بنابراین جمع‌آوری از رویشگاه‌های مرتفع طبیعی و نیز نگهداری آن در هرباریوم بسیار دشوار است (۳۵). تاکنون مطالعات زیادی در خصوص محتوای شیمیائی آن انجام شده است (۴۹).

۹- یکی دیگر از گونه‌های این تیره، گل مورو با نام علمی (*Nepeta racemosa*) می‌باشد. این گیاه بومی ایران بوده، دارای برگ‌های کشیده و قلمی‌شکل و گل‌های مجتمع می‌باشد. گل مورو که بوئی بسیار معطر دارد، به طور سنتی به عنوان التیام دهنده دردهای معده، ضد نفخ و ضد عفونی کننده مصرف داروئی دارد (۶).

۱۰- گلپر با نام علمی (*Heracleum persicum*)، گیاهی است علفی، پایا از تیره چتریان (*Umbelliferae*)، و دارای اعضاء معطر، برگ‌های منقسم و دندانه دار. از مشخصات ظاهری آن گل‌های سفید و مجتمع به شکل چتری بزرگ در انتهای شاخه‌هاست. گلپر به عنوان ضد عفونی کننده، ضد نفخ، هضم کننده، طعم دهنده و خوش بو کننده غذا مصرف

گیاه درمانی به عنوان شاخه‌ای از طب سنتی در یکصد سال گذشته نقش تعیین کننده در درمان بیماری‌ها ایفا می‌کرد. با پیدایش داروهای شیمیایی و صنایع و جایگزینی آنها با داروهای گیاهی بتدریج نقش این داروها کم رنگ شد و داروهای شیمیائی و آنتی بیوتیک‌ها به طور وسیعی در درمان بیماری‌های مختلف کاربرد پیدا کرد. در سال‌های اخیر به دلیل توجه و اقبال مردم دنیا از مصرف داروهای گیاهی و فزونی استفاده از گیاه برای درمان بیماران، بنظر می‌رسد تعادل مصرف به نفع داروهای گیاهی در حال رقم خوردن است. به طوریکه حدود نیم تا یک سوم از فرآورده‌های داروئی موجود در آمریکا منشأ گیاهی دارند (۱۶). از طرفی مقاومت داروئی تهدیدی جدی برای سلامتی انسان می‌باشد، ضمن اینکه افراد واجد ضعف ایمنی از آسیب‌پذیری بیشتری برخوردارند. در سال‌های اخیر تحقیقات انجام شده در زمینه اثرات باز دارندگی مواد طبیعی در برابر میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهد که فرآورده‌های گیاهی می‌توانند جایگزین‌های مناسبی برای داروهای صنایع باشند و اثرات درمانی قابل توجهی داشته باشند (۱۳، ۱۸، ۳۶، ۵۵). به علاوه فرآورده‌ها و مکمل‌های غذائی و داروئی بسیاری در دنیا تولید و مصرف می‌گردد که منشأ گیاهی دارند (۱۷). با وجود پیشرفت‌های بسیار سریع در زمینه گیاهان داروئی و ورود پر شتاب آن به صحنه درمان، معذالک کمبود اطلاعات دارو درمانی در مورد فرآورده‌های گیاهی و عدم توفیق در درمان بعضی از بیماران در مقایسه با داروهای شیمیائی از جمله معضلات در امر جایگزینی آنها به جای داروهای صنایع می‌باشد (۲۴). در مطالعه حاضر اثرات ضد باکتریائی و فیتوشیمیائی عصاره ۱۲ گونه گیاهی، بر علیه چند سویه نوکاردیای بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مقایسه اثر ضد میکروبی این گیاهان با آنتی بیوتیک‌های رایج بر باکتری‌های فوق مورد مطالعه قرار گرفت. گیاهان مورد مطالعه عبارت بودند از:

۱- ختمی با نام علمی (*Althaea officinalis* L.) گیاهی است علفی و پایا از تیره پنیرک (*Malvaceae*)، با ساقه‌ای پوشیده از کرک‌های نرم و ریشه‌ای دراز و دوکی شکل. تمام قسمت‌های گیاه دارای مقدار زیادی موسیلاژ می‌باشد. گل و ریشه آن به عنوان ملین و مدر، التیام بخش و ضد عفونی کننده زخم‌های پوستی مصرف سنتی فراوانی دارد (۶، ۶۵).

۲- پنیرک با نام علمی (*Malva silvestris* L.) گیاهی است علفی و پایا از همین تیره (*Malvaceae*) که مخصوص نواحی پر آب می‌باشد. گل پنیرک که برخی آنرا به غلط ختمی می‌نامند، به عنوان ملین و مدر، ضد سرفه و همچنین به عنوان شستشو دهنده و نرم کننده پوست مصرف سنتی دارد (۶). تمام قسمت‌های گیاه حتی گیاه کامل استفاده درمانی دارد (۶۵).

۳- مامی‌ران با نام علمی (*Chelidonium majus*) گیاهی است علفی و پایا از تیره خشخاش (*Papaveraceae*) که بومی نواحی شمال ایران می‌باشد. گیاه مامیران دارای برگ‌های ظریف و نازک، گل‌هائی زرد طلائی و ساقه‌ای ترد و شکننده به رنگ سبز می‌باشد. سر شاخه‌های هوئی آن در رفع بیماری‌های کبدی و سینه و جلوگیری از اسهال و بر ظرف کردن ناراحتی‌های پوست مصرف سنتی دارد (۶، ۱۵).

۴- شقایق کوهی و یا سرده شقایق با نام علمی (*Glaucium*) مانند مامیران گیاهی است از تیره خشخاش (*Papaveraceae*) که در فصل

سننتی دارد (۵۵، ۶). مطالعات نشان می‌دهد گلپر اثرات ضد باکتریایی زیادی نیز دارد (۲۶، ۳۷).

۱۱- زنبق با نام علمی (*Iris germanica*) گیاهی است پایا از تیره (Iridaceae) با ساقه زبرزمینی بسیار ضخیم بنام ریزوم که محتوی نشاسته و اسانس، با بوئی ملایم و مطبوع. ریشه زنبق به عنوان مدر، خلط آور، ضد انگل‌های روده ای و نیز اثرات مسهلی مصرف سنتی دارد (۶).

۱۲- گوشیل با نام علمی (*Aristolochia bottae*) گیاهی است پایا از تیره (Aristolochiaceae) و دارای اسانس و ترکیباتی مانند اسید آریستولوشیک با طعم تلخ و معطر می‌باشد. ریشه این گیاه سمی بوده و مصرف درمانی چندانی ندارد فقط جوشانده آن اثر ضد تشنج دارد (۶۴).

**مواد و روش‌ها**

۱- مواد مصرفی: محیط‌های کشت آزمایشگاهی، معرف‌ها، مواد شیمیائی و دیسک‌های آنتی بیوتیک به ترتیب از نمایندگی شرکت‌های

جدول شماره ۱: مشخصات گیاه شناسی و فیتوشیمیائی گیاهان مورد مطالعه

نام فارسی یا محلی	نام علمی Genus /species	تیره Family	بخش مورد استفاده	نتایج آزمایش فیتوشیمیائی		
				آلکالوئید	تانن	ساپونین
ختمی	<i>Althaea officinalis</i> L.	Malvaceae پنیرک	ریشه، گل و برگ	-	-	+
پنیرک	<i>Malva silvestris</i> L.	Malvaceae پنیرک	ریشه، گل و برگ	-	-	+
مامیران	<i>Chelidonium Majus</i> L.	Papaveraceae خشخاش	ریشه، گل و برگ	+++	-	+
شقایق کوهی (سرد شقایق)	<i>Glaucium fimbriigerum</i> Boiss.	Papaveraceae خشخاش	سرشاخه هوائی	+++	-	+
پاپاور	<i>Papaver fugax</i> Poiret.	Papaveraceae خشخاش	سرشاخه هوائی	+	-	+++
شیرین بیان	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Fabaceae نخود	ریشه و ریزوم	-	-	+++
اسپرس	<i>Onobrychis sativa</i> Lam.	Fabaceae نخود	گل و دانه	-	+	+
پونه بینالود	<i>Nepeta binaludensis</i> Jamzad.	Labiatae نعنا	بخش هوائی	+	+	+
گل مورو	<i>Nepeta racemosa</i> Lam.	Labiatae نعنا	بخش هوائی	+	+	++
گلپر	<i>Heracleum persicum</i> Desf.	Umbelliferae چتریان	میوه	-	+	++
زنبق	<i>Iris germanica</i> L.	Iridaceae	ریزوم	-	+	-
گوشیل	<i>Aristolochia bottae</i> Jaub.	Aristolochiaceae	بخش هوائی	+	-	-

شد (۱، ۲۷). نتایج پس از گرمخانه گذاری در دمای مناسب به صورت هاله عدم رشد نمایان گردید و قطر هاله عدم رشد مشاهده و با کولیس اندازه گیری شد. قطر هاله‌ها عکس عملی از غلظت ماده مؤثره ماده مورد آزمایش می‌باشد. این پدیده یک ارتباط خطی بین اندازه هاله و لگاریتم غلظت ماده مورد آزمایش می‌باشد که با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه آن با استاندارد مشخص، قدرت ضد میکروبی ماده مورد آزمایش معین می‌گردد (۳۸). از بین روش‌های انتشار در آگار سه روش قطره پلیت (Drop Plate Method)، چاهک پلیت (Cup Plate Method) و دیسک پلیت (Paper Disk Method) مورد استفاده قرار گرفت. اثر مهار کنندگی عصاره‌های به دست آمده بر علیه ۲ سویه *N. asteriodes* و ۲ سویه *N. brasiliensis* به صورت هاله عدم رشد بر روی محیط کشت جامد مشاهده و ثبت گردید. لازم به ذکر است سوسپانسیون میکروبی به کار رفته در تمامی مراحل آزمایش دارای کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلین که به نسبت ۰/۰۱ رقیق شده بود تعیین گردیده و تست‌های میکروبی حداقل با سه تکرار انجام شد. در این مطالعه روش قطره پلیت به منظور بررسی کیفی و دو روش چاهک و دیسک پلیت به منظور بررسی کمی اثرات ضد میکروبی گیاهان به کار گرفته شد. در روش کیفی (قطره پلیت) یک قطره (۱۰ µL) از هر رقت بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد مولر هینتون که قبلاً با سوسپانسیون حاوی سویه نوکارد کاملاً آغشته شده بود چکانده شد. در حالیکه در روش چاهک پلیت (کمی) (۱۰۰ µL) از عصاره متانولی با رقت‌های مورد نظر در چاهک یکنواختی به قطر ۶ میلی متر و عمق ۵ میلی متر که در سطح آگار پلیت آغشته به باکتری تعبیه شده بود، ریخته شد. در روش دیسک پلیت ابتدا دیسک‌های کاغذی در عصاره متانولی گیاهان مورد مطالعه از رقت ۲/۵ تا ۱۰ در صد که مناسب ترین رقت‌ها بود به مدت نیم ساعت قرار داده شد. سپس هوادهی و خشک گردانیده شد.

مقدار عصاره جذب شده توسط یک دیسک کاغذی برای رقت ۱۰ درصد به مقدار ۲۰ میلی گرم، رقت ۷/۵ درصد به مقدار ۱۵ میلی گرم، رقت ۵ درصد به مقدار ۱۰ میلی گرم و رقت ۲/۵ درصد به مقدار ۵ میلی گرم محاسبه گردید.

بر روی هر محیط کشت آغشته به باکتری یک دیسک حاوی ۲۰ میلی گرم عصاره متانولی، یک دیسک آنتی بیوتیک استاندارد آمیکاسین به عنوان شاهد مثبت و در تکرارهای بعد به ترتیب آموکسی سیلین، سفنازیدیم، سفتری زوکسیم (برای *N. asteriodes*) و سفوتاکسیم (برای *N. brasiliensis*)، سفالوتین و کوتریموکسازول و در کنار آنها یک دیسک حاوی اتانول ۸۰ درصد به عنوان شاهد منفی با فاصله مناسب قرار داده شد.

پس از قراردادن کلیه پلیت‌ها در حرارت مناسب و زمان مشخص برای رشد باکتری، هاله‌های شفاف عدم رشد مشاهده و به کمک کولیس اندازه گیری شد.

برای اطمینان از عدم تاثیر ضد میکروبی متانول بر میزان مهار کنندگی گیاهان مورد مطالعه بر نوکاردیاه‌ها، در رقت‌های انتخابی ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۲ در صد (حجم در حجم) از متانول تهیه و بر کشت باکتری‌ها اضافه گردید، لیکن هیچ اثر مهار کنندگی مشاهده نگردید (۱۸).

آزمایش نگهداری گردید. رقت‌های انتخابی شامل ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۵ درصد (w/v) یا (g/۱۰۰mL) به ترتیب با افزودن ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱۰، ۰/۱۵، ۰/۲۰ و ۰/۳۰ گرم از عصاره تغلیظ شده فوق که توسط دستگاه تقطیر در خلاء آماده شده بود، به ۲ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد جهت انتقال به پلیت‌ها تهیه گردید.

۵- بررسی فیتوشیمیایی: برای انجام این آزمایشات مقدار معینی از عصاره خشک گیاهان مورد مطالعه به منظور بررسی وجود آلکالوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها و فلاونوئیدها بشرح ذیل به کار گرفته شد (۵، ۷، ۸، ۴۰، ۴۶، ۵۰).

الف- آزمایش وجود آلکالوئید از طریق استخراج آب و اسید و سپس استخراج کلروفرمی از محلول قلیائی شده مرحله قبل و به کارگیری معرف‌های میر و درژاندرف صورت پذیرفته است.

ب- آزمایش تشخیص وجود تانن با استفاده از نتایج حاصل از واکنش محلول عصاره تام هر گیاه در مجاورت محلول ژلاتین و نیز تغییر رنگ محلول در مجاورت با معرف کلروفریک صورت گرفته است

ج- آزمایش تشخیص وجود ساپونین از طریق ثبت ارتفاع کف پایدار حاصل از حرکت شدید لوله محتوی عصاره تام گیاه در مجاورت با آب، تعیین گردید.

د- آزمایش تشخیص وجود فلاونوئید بوسیله قرائت شدت رنگ قرمز تا قرمز پررنگ حاصل از واکنش سیانیدین و انتقال رنگ ایجاد شده به محلول استخراج شده با آمیل الکل صورت پذیرفته است.

۶- بررسی میکروبیولوژیک: با استفاده از روش انتشار در آگار و طی مراحل ذیل صورت گرفت (۱، ۲۱، ۲۲، ۲۷).

الف- انتخاب محیط‌های کشت غنی آزمایشگاهی مناسب. سویه‌های نوکاردیا بر روی محیط‌های غنی آزمایشگاهی شامل ژلوز خوندار (Blood A)، ژلوز گلوکز عصاره قارچ (GYEA)، ژلوز عصاره قلب و مغز گوساله (BHIA)، ژلوز ساپورو دکستروز، ژلوز مولر هینتون (MHA)، ژلوز استارچ کازئین (StCA)، ژلوز پپتون عصاره قارچ (PYEA)، ژلوز پارافین (Paraffin A)، ژلوز بنتس (Bennett's A) کشت داده شد. لازم به ذکر است که باکتری در محیط‌های کشت فوق به خوبی رشد نمود، لیکن در موارد مقایسه قطر هاله عدم رشد عصاره گیاهان مورد آزمایش و دیسک‌های آنتی بیوتیک استاندارد، از محیط کشت‌های (GYEA، BHIA، SDA، MHA) که برتری نسبی بر سایر محیط‌های کشت نشان دادند، استفاده گردید. یک لیتر محیط کشت GYEA حاوی ۱۰۰ گرم گلوکز، ۱۵ گرم آگار (Oxoid) و ۲۰ میلی لیتر از محلول ۵۰٪ عصاره قارچ و با اسیدیته نهائی ۷-۷/۲ می‌باشد.

ب- تعیین هویت و کنترل مجدد سویه‌های نوکاردیا با استفاده از تست‌های باکتریولوژیک، فیریولوژیک و بیوشیمیایی. برای حصول اطمینان از خالص بودن باکتری‌های مورد مطالعه تمامی آنها مجدداً در محیط‌های اختصاصی کشت داده شد و با استفاده از سوبستراهای زانتین، هیپوزانتین، تیروزین و کازئین مورد شناسائی مجدد قرار گرفتند (۲۲، ۵۷).

ج- بررسی اثرات ضد باکتریایی گیاهان مورد مطالعه. با استفاده از روش انتشار در آگار عصاره گیاهی مورد آزمایش روی محیط کشت جامد که با ضخامت یکنواخت و اسیدیته (pH) ثابت تهیه شده بود، قرار داده





### نتایج

بررسی نتایج غربالگری اثر ضد باکتریایی نشان داد که مناسبترین رقت‌های عصاره گیاهان به ترتیب ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد بر علیه گونه‌های نوکاردیا به روش دیسک پلیت می‌باشد (جدول شماره ۲). همانگونه که ملاحظه می‌گردد، شش گونه از گیاهان مورد مطالعه شامل مامیران (*Chelidonium majus*)، شقایق کوهی (*Glaucium*)، شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*)، پونه (*Nepeta binaludensis*)، گل مورو (*Nepeta racemosa*) و گلپر (*Heracleum persicum*)، تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر مهار رشد نوکاردیاهای نشان می‌دهد. سایر گیاهان شامل ختمی (*Althaea officinalis*)، پاپاور (*Papaver fugax*) و پنیرک (*Malva silvestris*)، به ترتیب تاثیر کمتر و ۳ گیاه اسپرس (*Onobrychis sativa*)، زنبق (*Iris germanica*) و گوشیل (*Aristolochia bottae*) کمترین آثار ضد میکروبی را بر باکتری‌های مورد مطالعه نشان دادند. نتایج به دست آمده از تاثیر ۱۲ نوع دیسک آنتی بیوتیکی استاندارد بر *N. brasiliensis* و *N. asteroides* در جدول شماره ۳ درج گردیده است. همچنین آزمایشات فیتوشیمیایی وجود آلکالوئید را به طور جالب توجه در مامیران و شقایق کوهی و نیز تانن را به طور بسیار کم در اسپرس، پونه بینالود، گل مورو، گلپر و زنبق و همچنین فلاونوئید را به مقدار قابل توجه در پاپاور، گل مورو و گلپر و ساپونین را در شیرین بیان و گل مورو نشان داد که نتایج آن به همراه مشخصات گیاه شناسی گیاهان مورد مطالعه در جدول شماره ۱ آمده است. در نمودار شماره ۱ مقایسه ای بین تاثیر گیاهان مورد مطالعه بر سویه‌های نوکاردیا مانند استروئیدس و برازیلینسس که بیماری‌های متفاوتی ایجاد می‌نماید را نشان می‌دهد.

### بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از گیاهان دارویی از گذشته‌های دور برای درمان انواع بیماری‌ها مورد توجه مردم بوده است و از این میان بیماری‌های عفونی اهمیت قابل ملاحظه‌ای داشته است. ضمن اینکه گیاهان دارویی علاوه بر مصارف درمانی، به عنوان طعم دهند و معطر کننده و تقویت کننده نیز مصرف سنتی داشته است (۶، ۶۴). در تجربه حاضر اثرات ضد باکتریایی و فیتوشیمیایی ۱۲ گونه گیاهی بر ۴ سویه از نوکاردیاهای بیماری‌زا با استفاده از سه روش قطره، چاهک و دیسک پلیت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از روش قطره پلیت که یک روش کیفی قابل قبول است و اثرات مهار کنندگی عصاره گیاهان مورد نظر بر باکتری‌ها را نشان داد، به طوریکه در تکرارهای بعدی و استفاده از روش‌های دیگر بسیار راه گشا بود. اگر چه روش کیفی قطره پلیت در این مطالعه یک بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاهان دارویی بود، لیکن این تجربه و نتایج حاصل از آن برای تجربیات مراحل بعد یک بررسی غربالگری بحساب می‌آید. در ادامه بررسی، از دو روش چاهک و دیسک پلیت به عنوان بررسی‌های کمی بهره گیری شد. نتایج به دست آمده از این دو روش، تفاوت معنی داری را نشان نداد و لذا نتایج مربوط به روش دیسک پلیت را که همانگی بیشتری جهت مقایسه با دیسک‌های آنتی بیوتیک استاندارد داشت انتخاب و در جدول شماره ۲ ارائه گردید. در این بررسی مناسب ترین رقت‌های عصاره گیاهان از بین ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۵ درصد

انجام شده در سراسر دنیا بر روی عصاره گیاه مامیران نشان می‌دهد، این گیاه اثرات مهار کنندگی قابل توجهی بر بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مانند *Streptococcus mutans*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و نیز قارچ‌های *Candida albicans* و حتی بر ویروس‌ها نظیر ویروس آنفولانزا از خود نشان داده است که با نتایج حاصل از تجربه حاضر هماهنگی را نشان می‌دهد (۱۳، ۱۵، ۳۲، ۴۳، ۶۱).

شیرین بیان تجاری از چند وارسته مختلف شامل وارسته‌های اسپانیایی، ایتالیایی، روسی، فارسی و چینی تشکیل شده است. این گیاه محتوی ساپونین‌های تری ترینوئید است که مهم ترین آن اسید گلیسیریزیک یا گلیسیریزین می‌باشد که ۵۰ بار شیرین تر از شکر است (۶۲). گلیسیریزین مهم ترین ماده موثره شیرین بیان می‌باشد که خواص درمانی و بیولوژیکی فراوانی دارد. شیرین بیان پس از ورود به دستگاه گوارش، گلیسیریزین آن توسط باکتری‌های روده به اسید گلیسیریتینیک متابولیزه شده و باعث التیام درد، بر طرف شدن التهاب و زخم معده و اثنی عشر می‌شود (۴۱، ۴۵، ۶۶). این ماده پر ارزش علاوه بر خواص درمانی قابل توجه، آثار ضد میکروبی و ضد ویروسی، آلفا اینترفرون از خود نشان داده است (۲۵، ۳۶، ۴۸، ۵۸). تاکنون مطالعات بسیاری بر روی خواص ضد باکتریایی گلیسیریزین موجود در شیرین بیان بر *Helicobacter pylori* به عنوان یکی از باکتری‌های دستگاه گوارش انجام شده است که همگی دلالت بر تاثیر قابل توجه این ماده بر این باکتری می‌باشد (۲۵، ۳۹، ۵۸). همانگونه نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد، وجود گلیسیریزین به عنوان ساپونین مهم شیرین بیان که قادر به کنترل میکروارگانیزم‌های مختلف می‌باشد، در بررسی فیتوشیمیایی حاصل شد (جدول شماره ۱)، و ظهور هاله عدم رشد در اطراف دیسک محتوی عصاره الکلی شیرین بیان (جدول شماره ۲)، اولاً حاکی از اثر مهار کنندگی شیرین بیان بر سویه‌های نوکاردیا به واسطه وجود ساپونین، و ثانیاً هماهنگی مناسبی با نتایج به دست آمده از مطالعات دیگر محققان را نشان می‌دهد.

گلپر: مطالعات انجام شده محققین مختلف بر عصاره گیاه گلپر، اثرات مهار کنندگی آنرا بر تعدادی از باکتری گرم منفی و قارچ‌های بیماری‌زا مانند *Candida utilis* و *Candida albicans* به اثبات رسانده است (۹، ۳۷، ۵۲، ۵۵). وجود فلاونوئید به همراه مقادیری از تانن و ساپونین در بررسی فیتوشیمیایی عصاره گلپر و اثرات مهار کنندگی آن بر سویه‌های نوکاردیا در مطالعه حاضر نشان می‌دهد این ماده گیاهی علاوه بر مصارف سنتی می‌تواند به عنوان یک گیاه ضد میکروبی نیز مورد توجه خاص قرار گیرد.

پونه: بررسی فیتوشیمیایی عصاره دو گونه از جنس پونه (*Nepeta*) بنام پونه بینالود و گل مور، وجود آلکالوئید تانن، فلاونوئید و ساپونین را در مطالعه حاضر نشان می‌دهد. ضمن اینکه اثرات مهار کنندگی آنها بر سویه‌های نوکاردیا در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. این دو گیاه به طور سنتی به عنوان التیام دهنده دردهای معده، ضد نفخ و ضد عفونی کننده مصرف دارویی داشته اند و تا کنون مطالعاتی روی گونه‌های مختلف آن به خصوص محتوای شیمیایی آن انجام شده است (۳، ۵۹).

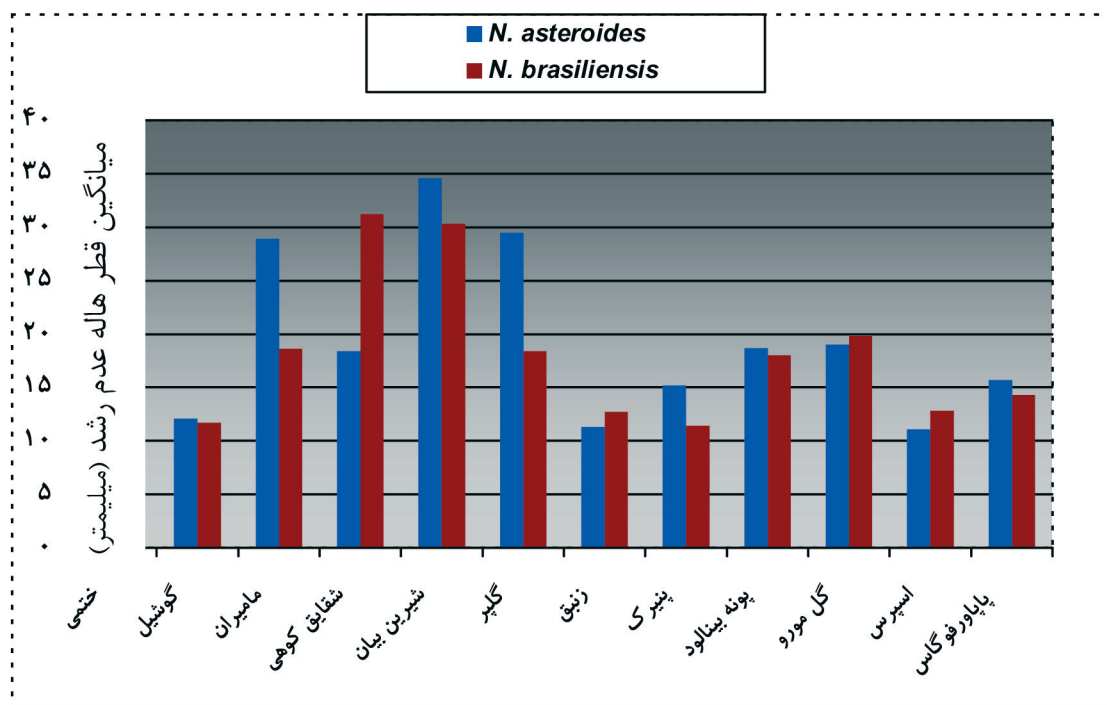
جدول شماره ۳: مقایسه اثر مهار کنندگی دیسک های آنتی بیوتیک استاندارد بر چهار سوش بیماریزای نوکاردیا

قطر هاله عدم رشد		نوع محیط کشت	نام آنتی بیوتیک	شماره
<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>			
++++	++++	GYEA, BHIA	آمیکاسین (Amikacin)	۱
++++	++++	GYEA, BHIA	آموکسی سیلین (Amoxicillin)	۲
++++	++++	GYEA, BHIA, Blood A	سفتازیدیم (Ceftazidime)	۳
++++	++++	GYEA, BHIA, SDA	سفتی زوکسیم / سفوتاکسیم (Ceftizoxime Cefotaxime)	۴
++++	++++	GYEA, Blood A	سفالوتین (Cephalothin)	۵
++	++	GYEA, BHIA	کلرامفنیکل (Chloramphenicol)	۶
++++	++++	MHA, SDA	کوتریموکسازول (Cotrimoxazole)	۷
-	-	GYEA, BHIA Blood A	جنتامایسین/نالیدکسیک اسید (Gentamic Nalidixic acid)	۸
-	-	BHIA	کانامایسین (Kanamycin)	۹
+++++	+++	GYEA, BHIA Blood A	نئومایسین (Neomycin)	۱۰
+++++	+++	GYEA	استرپتومایسین (Streptomycin)	۱۱
+++	+++	GYEA, BHIA, MHA	تتراسیکلین (Tetracycline)	۱۲
+ = ۱۳/۹ - ۱۱ میلی متر	++ = ۱۶/۹ - ۱۴ میلی متر	+++ = ۱۹/۹ - ۱۷ میلی متر	++++ = > ۲۰ میلی متر	

می‌دهد، آلکالوئید موجود در گونه‌های مامیران و شقایق کوهی از تیره خشخاش بسیار قابل توجه است. در حالیکه *Papaver fugax* که گونه دیگری از همین تیره است، واجد آلکالوئید بسیار کمی می‌باشد (جدول شماره ۱). از طرفی آثار مهار کنندگی فوق العاده عصاره الکلی گیاهان مامیران و شقایق کوهی بر هر دو سویه نوکاردیا به عنوان باکتری‌های گرم مثبت و تاثیر کمتر اثر ضد باکتریائی *P. fugax* بر همین باکتری‌ها (جدول شماره ۲)، رابطه بین آثار ضد باکتریائی گیاهان مورد مطالعه و وجود آلکالوئیدهای موجود در عصاره گیاهی را نشان می‌دهد. مطالعات

(w/v) عبارت بود از رقت ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ در صد (w/v) و روش دیسک پلیت برای مقایسه منطقی تر بنظر رسید. نتایج مطالعه حاکی است که از بین ۱۲ عصاره گیاهی مورد بررسی، عصاره ۶ گونه شامل گیاهان مامیران (*Chelidonium majus*)، شقایق کوهی (*Glaucium*)، شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*)، پونه (*Nepeta binaludensis*)، گل مرو (*Nepeta racemosa*) و گلپر (*Heracleum persicum*) با ایجاد هاله عدم رشد تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر مهار رشد نوکاردیایها نشان می‌دهد. تیره خشخاش - تجزیه فیتوشیمیائی گیاهان مورد مطالعه نشان





نمودار شماره ۱- مقایسه مهار رشد نوکاردیا استروئیدس و برازیلینسوس بوسیله عصاره متانولی ۱۲ گیاه دارویی (با رقت ۱۰ درصد) بروش دیسک پلیت

دلیل نتایج قاطع به دست آمده به نظر می‌رسد این یافته‌ها زمینه بسیار مناسبی برای بررسی‌های بیشتر به صورت *(in-vitro)* بر روی حیوانات آزمایشگاهی و همچنین جهت تاثیر ضد میکروبی فراکشن‌های این گیاهان بر نوکاردیها باشد.

### منابع مورد استفاده

- ۱- کمال، فاطمه. ۱۳۷۱؛ کنترل کیفیت میکروبی فرآورده‌های دارویی جلد ۱، انتشارات و چاپ دانشگاه تهران شماره ۲۱۴۴.
- ۲- ص. ش. ۱۳۷۱؛ عصاره گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی و روش شناسایی آنها انتشارات کافی، اصفهان.
- 3-Abdolhossein, R., and N. Kobra. 1999; Composition of the essential oils of *Nepeta ispanica* Boiss. and *Nepeta binaludensis* Jamzad from Iran. *Flavour and Fragrance Journal* 14:35-37.
- 4-Agerof M. J., T. van der Bruggen, M. Tersmette, E. J. ter Borg, J. M. van den Bosch, and D. H. Biesma. 2007; Nocardiosis: A case series and a mini review of clinical and microbiological features. *Neth J Med* 65:199-202.
- 5-Ajali, U., and B. K. C. Chukwurah. 2004; Antimicrobial activity of *Securidaca longipedunculata*. *Phytomedicine* 11:701-703.
- 6-Amin Gh. 2005. Popular medicinal plants of Iran. In G. Amin (ed.), *Medicinal plants of Iran*. Vice-chancellorship of Research, TUMS, Tehran.

سایر گیاهان مورد مطالعه شامل ختمی، *P. fugax* و پنیرک از نظر اثرات مهار کنندگی بر سویه‌های نوکاردیا به ترتیب در رده بعد با تاثیر کمتر و ۳ گیاه زنبق، اسپرس و گوشیل در رده آخر، کمترین آثار ضد میکروبی را بر باکتری‌های مورد مطالعه نشان دادند. مقایسه اثر دیسک‌های آنتی بیوتیکی استاندارد بر باکتری‌های مورد بررسی نیز نشان داد که از بین ۱۲ نوع آنتی بیوتیک به کار رفته، ۶ نوع آنها شامل آمیکاسین، آموکسی سیلین، سفنازیدیم، سفتی زوکسیم (برای *N. asteroides*) و سفوتاکسیم (برای *N. brasiliensis*)، سفالوتین و کوتریموکسازول حداکثر اثر مهار کنندگی را بر باکتری‌ها دارند. سایر آنتی بیوتیک‌ها اثرات مهار کنندگی کمتری بر نوکاردیها نشان دادند (جدول شماره ۳). مقایسه نتایج مندرج در جدول‌های شماره ۲ و ۳، تناسب تاثیر گیاهان مورد مطالعه و آنتی بیوتیک‌های استاندارد را به خوبی نشان می‌دهد. با مقایسه هاله عدم رشد عصاره گیاهان دارویی مورد مطالعه با رقت ۱۰ درصد به روش دیسک پلیت (جدول شماره ۲)، با هاله عدم رشد دیسک‌های آنتی بیوتیک استاندارد (جدول شماره ۳)، به این نتیجه می‌رسیم که اثرات مهار کنندگی عصاره این گیاهان، شبیه آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین، آموکسی سیلین، سفنازیدیم، سفتی زوکسیم (برای *N. asteroides*) و سفوتاکسیم (برای *N. brasiliensis*)، سفالوتین و کوتریموکسازول بر باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد. با توجه به این نتایج بنظر می‌رسد اثرات ضد باکتریایی گیاهان دارویی فوق مربوط به وجود مواد مؤثره‌ای مانند آلکالوئید، ساپونین و فلاونوئید به همراه تانن موجود در عصاره متانولی گیاهان مورد مطالعه باشد. اگر چه تجربه حاضر در محیط غیر زنده *(in-vitro)* و بر روی محیط‌های کشت جامد انجام شده، لیکن به

- 7-Aynehchi, Y., M. H. S. Sormaghi, G. H. Amin, and A. Ghahreman. 1981; Survey of Iranian plants for saponins, alkaloids, flavonoids and Tannins. I. Pharmaceutical Biology 19: 53-63.
- 8-Aynehchi, Y., M. H. S. Sormaghi, G. H. Amin, A. Soltani, and N. Qumehr. 1981; Survey of Iranian plants for saponins, alkaloids, flavonoids and tannins. II. Quarterly Journal of Crude Drug Research: Vierteljährliche Zietschrift Für Drogen-Forschung. Revue Trimestrielle Des Recherches Sur Les Matières Premières 20:61-70.
- 9-Bonjar, G. H. S., S. Aghighi, and A. K. Nik. 2004; Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal-medicine of south east regions of Iran. Journal of Biological Sciences 4:405-412.
- 10-Brown, J. M., K. D. Cowley, K. I. Manninen, and M. M. McNeil. 2007; Phenotypic and molecular epidemiologic evaluation of a *Nocardia farcinica* mastitis epizootic. Veterinary Microbiology 125:66-72.
- 11.Brown, J. M., K. N. Pham, M. M. McNeil, and B. A. Lasker. 2004; Rapid Identification of *Nocardia farcinica* Clinical Isolates by a PCR Assay Targeting a 314-Base-Pair Species-Specific DNA Fragment. Journal of Clinical Microbiology 42:3655-3660.
- 12-Chatelus, E., R.-M. Javier, J. Sibilia, J.-L. Kuntz, E. Forestier, and J. Gaudias. 2007; *Nocardia discitis* in an immunocompetent patient. Joint Bone Spine 74:207-209.
- 13-Cheng, R. B., X. Chen, S. J. Liu, X. F. Zhang, and G. H. Zhang. 2006; Experimental study of the inhibitory effects of *Chelidonium majus* L. extractive on *Streptococcus mutans* *in vitro*. Shanghai Kou Qiang Yi Xue 15:318-20.
- 14-Chow, E., T. Moore, J. Deville, and K. Nielsen. 2005; *Nocardia asteroides* brain abscesses and meningitis in an immunocompromized 10-year-old child. Scand J Infect Dis 37: 511-3.
- 15-Ciebiada, I., E. Korczak, J. W. Nowicky, and A. Denys. 1996; Estimation of direct influence of Ukrain preparation on influenza viruses and the bacteria *E. coli* and *S. aureus*. Drugs Exp Clin Res 22:219-23.
- 16-Clark, A. M. 1996; Natural products as a resource for new drugs. Pharm Res 13:1133-44.
- 17-Corns, C. M. 2003; Herbal remedies and clinical biochemistry. Annals of Clinical Biochemistry 40:489-507.
- 18-Dakhili M, Z. S. T., Torabi Goodarzi M. 2006; Evaluation of antimicrobial effects of 4 medicinal plants against *Salmonella typhimurium* and comparison them with common antibiotics in veterinary medicine. Pharmaceutical Biology 5:21-26.
- 19-Enomoto M., H. Yamasawa, T. Sawai, M. Bando, S. Ohno, and Y. Sugiyama. 2002; Pulmonary nocardiosis with bilateral diffuse granular lung shadows in a patient with subcutaneous panniculitic T-cell lymphoma. Intern Med 41:986-9.
- 20-Eshraghi S, and Amin M. 2004; Pulmonary nocardiosis associated with Cushing's syndrome. Pak J Med Sci. 20:18-23.
- 21-Eshraghi S. 2005; An evaluation of the potent inhibitory effects of royal jelly fractions against streptomyces bacteria. Pakistan Journal of Medical Sciences 21:63-68.
- 22-Eshraghi S., and S. Valafar. 2008; Evaluation of inhibitory effects of iranian propolis against filamentous bacteria. Pak J Med Sci January-March 24:56-60.
- 23-Everett, C. M., H. Dhillon, D. Samarasinghe, L. Berry, S. Warwick, and B. Turner; 2006. A case of cerebral nocardiosis following brief immunosuppression. Eur J Neurol 13:431-2.
- 24-Fong, H. H. S. 2002; Integration of herbal medicine into modern medical Practices: Issues and Prospects. Integrative Cancer Therapies 1:287.
- 25-Gupta, V. K., A. Fatima, U. Faridi, A. S. Negi, K. Shanker, J. K. Kumar, N. Rahuja, S. Luqman, B. S. Sisodia, and D. Saikia. 2007; Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra roots*. Journal of Ethnopharmacology.
- 26.Haghighati F, J. S., Momen Beitollahi J 2003; Comparison of antimicrobial effects of ten herbal extracts with Chlorhexidine on three different oral pathogens: An *in vitro* study Hakim Research Journal 3:71-76.
- 27-Hindler J.F., and J. J.H. 2007; Antimicrobial susceptibility testing. , p. 319-363. In C. R. Mahon, D. C. Lehman, and G. Manuselis (ed.), Textbook of diagnostic microbiology, Third Edition ed. Saunders.
- 28-Huang, H.-C., W.-L. Yu, C.-C. Shieh, K.-C. Cheng, and H.-H. Cheng. 2007; Unusual mixed infection of thoracic empyema caused by *Mycobacteria tuberculosis*, Nontuberculosis mycobacteria and *Nocardia asteroides* in a woman with systemic lupus erythematosus. Journal of Infection 54:e25-e28.
- 29.Jinno, S., T. Jirakulaporn, M. J. Bankowski, W. Kim, and R. Wong. 2007; Rare case of *Nocardia asteroides* pericarditis in a human immunodeficiency virus-infected patient. J Clin Microbiol 45:2330-3.
- 30.Jodlowski, T. Z., I. Melnychuk, and J. Conry. 2007; Linezolid for the treatment of *Nocardia* spp. Infections. The Annals of Pharmacotherapy n 41:1694-1699.
- 31.Kilincer, C., M. K. Hamamcioglu, O. Simsek, T. Hicdonmez, B. Aydoslu, O. Tansel, M. Tiryaki, M. Soy, M. Tatman-Otkun,

- and S. Cobanoglu. 2006; Nocardial brain abscess: Review of clinical management. *Journal of Clinical Neuroscience* 13:481-485.
- 32-Kokoska, L., Z. Polesny, V. Rada, A. Nepovim, and T. Vanek. 2002; Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 82:51-3.
- 33-Liff, D. A., C. Kraft, K. Pohlel, J. Wade, C. Franco-Paredes, E. P. Chen, S. Clements, Jr., and L. Sperling. 2007; *Nocardia nova* aortitis after coronary artery bypass surgery. *J Am Soc Echocardiogr* 20:537 e7-8.
- 34-Majd A., M. S., Khanafari A. 1996; Antimicrobial effect of four species of *Glaucium* on mouth microflora *Journal of Dentistry Tehran University of Medical Sciences* 4:57-66.
- 35-Nadjafi, F., A. Koocheki, P. R. Moghaddam, B. Honermeier, and J. Asili. 2007; Autecology, ethnomedicinal and phytochemical studies of *Nepeta binaludensis* Jamzad, a highly endangered medicinal plant of Iran. *Planta Med*:73.
- 36-Nassiri Asl, M., Hosseinzadeh H. 2007; Review of Antiviral Effects of *Glycyrrhiza glabra* L. and its active component, Glycyrrhizin. *J. Medicinal Plants* 6:1-12.
- 37-Nazemi A, H. M., Khataminejad MR, Pourshamsian K 2005; Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Heracleum persicum*. *Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Unite* 2:91-94.
- 38-Neef, H., P. Declercq, and G. Laekeman. 1995; Hypoglycaemic activity of selected European plants. *Phytother Res* 9:45-48.
- 39-Nouri Zadeh E, M. P. T., Ghasemi K, Razavi SM, Latifi S Daneshvar, . 2004; Survey of anti-bacterial effects of Spearmint, Liquorice, Perennial weed, Mayweed and Thyme on *Helicobacter Pylori* Scientific-Research *Journal of Shahed University* 52:71-67.
- 40-Okwu, D. E., and C. Josiah. 2006; Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 5:357-361.
- 41-Ozaki, Y., and K. Ono. 2002; Antiinflammatory Effect of glycyrrhizin topically applied to the cotton pellet by granuloma porch method in Rats. *Natural Medicines* 56:261-263.
- 42-Ozturk, S., F. Tufan, S. Alisir, S. Gorcin, D. Guven, A. Cagatay, and A. Turkmen. 2006; A case of isolated *Nocardia asteroides* brain abscess in a kidney transplant recipient. *Transplant Proc* 38:3121-4.
- 43-Parvu, M., A. E. Parvu, C. Craciun, L. Barbu-Tudoran, and M. Tamas. 2008; Antifungal Activities of *Chelidonium majus* Extract on *Botrytis cinerea* *in vitro* and ultrastructural changes in its conidia. *Journal of Phytopathology*.
- 44-Password, F. 2007; Pulmonary nocardiosis: Risk factors and outcomes. *Respirology* 12:394-400.
- 45.Petrikova, M. 2007; Mechanism of anti-inflammatory action of liquorice extract and glycyrrhizin. *Natural Product Research* 21:1234-1241.
- 46-Reginatto, F. H., G. Gosmann, J. Schripsema, and E. P. Schenkel. 2004; Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. *Phytochemical Analysis* 15:195-197.
- 47-Revol, A., M. Espinoza-Ruiz, I. Medina-Villanueva, and M. C. Salinas-Carmona. 2006; Expression of *Nocardia brasiliensis* superoxide dismutase during the early infection of murine peritoneal macrophages. *Can J Microbiol* 52:1255-60.
- 48-Rossum, T. G. V., A. G. Vulto, W. C. Hop, J. T. Brouwer, H. G. Niesters, and S. W. Schalm. 1999; Intravenous glycyrrhizin for the treatment of chronic hepatitis C: A double-blind, randomized, placebo-controlled phase I/II trial. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 14:1093-1099.
- 49-Rustaiyan, A., and K. Nadji. 1999; Composition of the essential oils of *Nepeta ispanica* Boiss. and *Nepeta binaludensis* Jamzad from Iran.
- 50-Sabahi, M., M. Ramezani, G. Jaffari, G. Heravi, F. Bahaeddini, and Y. Aynehchi. 1985; Survey of Iranian plants for saponins, Alkaloids, Flavonoids, and Tannins. IV. The Plants of Kerman Province. *Pharmaceutical Biology* 23:165-175.
- 51-Salinas-Carmona, M. C., and I. Perez-Rivera. 2004; Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun* 72:5597-604.
- 52-Sayyah, M., S. Moaied, and M. Kamalinejad. 2005; Anticonvulsant activity of *Heracleum persicum* seed. *Journal of Ethnopharmacology* 98:209-211.
- 53-Semnani KM, S. M. 2001; Alkaloids of the aerial parts of *Glaucium grandiflorum* Boiss & Huet population Sorkhe Hesar. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 30:31-37.
- 54-Semnani KM, S. M., Hamidian M, Vafamehr H, Dehpour AR 2002; Anti inflammatory and analgesic activity of *Glaucium grandiflorum* extract. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 36:15-17.
- 55-Shahrani M, N. Z. F., Shir Zadeh H, Yousefi H, Moradi MT, Moghaddasi J. 2006; Effect of *Heracleum Persicum* extract on acid and pepsin secretion level in both basic and stimulated conditions with Pentagastrin in rat Shahrekord University of Medical Sciences *Journal* 4:41-35.

- 56-Sharma, M., B. C. Gilbert, R. L. Benz, and J. Santoro. 2007; Disseminated *Nocardia otitidiscaviarum* infection in a woman with sickle cell anemia and end-stage renal disease. *Am J Med Sci* 333:372-5.
- 57-Shawar, R. 2007; Aerobes gram-positive bacilli. , p. 425-437. In C. R. Mahon, D. C. Lehman, and G. Manuselis (ed.), *Textbook of diagnostic microbiology*, Third Edition ed. Saunders.
- 58-Shirazi MH, F. M., Sultan Dallal MM, Eshraghi S, Jamalifar H, Alamulhoda E. 2003; A comparative study on the antimicrobial effect of some medicinal herbal extracts and selective antibiotics against the clinical isolates of *Helicobacter Pylori* *Journal of Medicinal Plants* 7:60-53.
- 59-Sonboli, A., P. Salehi, and M. Yousefzadi. 2004; Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. from Iran. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C, Biosciences* 59:653-656.
- 60-Sorrell TC, Mitchell DH, and Iredell JR. 2005. Nocardiosis p. P. 2916-2924. In Mandell GL, Bennett JE, and Dolin R (ed.), *Principles and practice of infectious diseases*. 6th ed, Uol. 2. Churchill Livingstone, New York.
- 61-Stickel, F., G. Pöschl, H. K. Seitz, R. Waldherr, E. G. Hahn, and D. Schuppan. 2003. Acute hepatitis induced by greater celandine (*Chelidonium majus*). *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 38:565-568.
- 62-Tyler, V. E., L. R. Brady, and J. E. Robbers. 1988; *Pharmacognosy*. , p. 68-69, *Pharmacognosy*. Lea & Febiger. 9th ed., Philadelphia.
- 63-Zargary A. 1992; *Medicinal plants*. 5th Edition, 1801/2, 5th Edition ed, vol. 2. Tehran University Publications.
- 64-Zargary A. 1993; *Medicinal plants*. 5th Edition, 1801/4, 5th Edition ed, vol. 4. Tehran University Publications.
- 65-Zargary A. 1991; *Medicinal plants*. 6th Edition, 1801/1, 6th Edition ed, vol. 1. Tehran University Publications.
- 66-Zhao, Y., D. Zhai, X. Chen, H. He, Q. Lu, and Q. Yu. 2007; Protective effect of glycyrrhizin and matrine on acute vanishing bile duct syndrome induced by alpha-naphthylisothiocyanate in rats. *Hepatology Research* 37:143-151.

