Archive of SID

مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

بررسی اثر ضد باکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از توتیای دریایی *Echinometra mathaei*

حامد عبداله اصلیان*، احسان کامرانی، مرتضی یوسف زادی، موسی کشاورز

گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان

نوع مقاله:
مقاله کوتاه

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۳/۰۳/۲۴
اصلاح: ۹۴/۰۶/۲۰
پذیرش: ۹۴/۰۶/۲۵

کلمات کلیدی:
انتشار دیسک
توتیای دریایی
MIC

چکیده

در این مطالعه اثر ضدباکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر باکتری‌های بیماریزای انسانی بررسی شد. اندامهای مختلف توتیای دریایی شامل خار، پوسته، گناد و فانوس ارسطو به طور جداگانه با استفاده از حلال‌های ان- هگزان، اتیل استات و متانول عصاره گیری و اثر آنها بر باکتری‌های بیماریزای انسانی شامل *Vibrio alginolyticus*،*Escherichia coli*، *Enterococcus faecalis*،*Staphylococcus aureus*، *Shigella flexneri*، *Vibri* به دو روش انتشار دیسک و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بررسی گردید. نتایج نشان داد اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها بر باکتری‌های مورد مطالعه و همچنین عصاره اندام‌های مختلف از نظر اثر ضد باکتریایی دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($p<0/05$). همچنین بیشترین اثر ضدباکتریایی مربوط به عصاره اتیل استاتی پوسته بود.

مقدمــه

به دلیل تکامل مداوم میکروب‌های بیماریزا و مقاومت آن‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، همیشه تقاضا برای توسعه ترکیبات جدید و مؤثر ضدمیکروبی وجود داشته است. ارگانیسم‌های دریایی منبعی بسیار عالی برای ترکیبات فعال زیستی هستند و تاکنون فعالیت ضدمیکروبی در چندین گونه از خارپوستان گزارش شده است (Haug *et al*., 2002). علاوه بر این، انواع مختلفی از فاکتورهای ضدمیکروبی از جمله گلیکوزید استروئیدال (Andersson *et al*., 1989)، استرول‌های پلی هیدروکسی‌لات (Lorizzi *et al*., 1995)، رنگدانه فانتوکوناون (Service and Wardlaw, 1984)، لیزوزوم‌ها (Canicatti and Roch, 1989)، پپتیدهای ضدمیکروبی (Beauregard *et al*., 2001) از خارپوستان جدا شده اند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که خارپوستان دریایی منبعی بالقوه از آنتی‌بیوتیک‌های جدید برای توسعه دارویی هستند. بررسی‌ها نشان می دهد تفاوت گسترده‌ای در فعالیت ضدباکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از ارگان‌های متفاوت و همچنین میان گونه‌های مختلف خارپوستان وجود دارد (Haug *et al*., 2002).

با توجه به اینکه مطالعه بر روی خارپوستان و اثرات ضدباکتریایی آنها در خلیج فارس و دریای عمان بسیار کم صورت گرفته، امید است این تحقیق بر روی توتیای دریایی *Echinometra mathaei* راه را برای مطالعات بیشتر در این زمینه هموارتر کند.

مواد و روش‌ها

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: hamed.aslian@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌های توتیای دریایی از ساحل جزیره ابوموسی (پلاژ ساحلی) در آذر ماه سال ۱۳۹۱جمع آوری و به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل گردید. ابتدا نمونه‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند تا آب دریا و نمک اضافی آن جدا شود، سپس قسمت‌های خار، پوسته، گناد و فانوس ارسطو به دقت جدا و هرکدام از اندام‌ها به طور جداگانه در ظروف استریل قرار گرفت و برای انجام مراحل بعدی شامل فریز درایر و عصاره‌گیری در فریزر قرار گرفتند و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد فریز شدند (Haug *et al*., 2002; Mohammadizade *et al*., 2013).

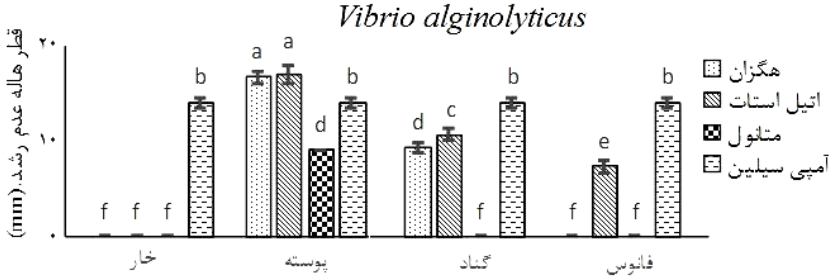
عصاره‌گیری با استفاده از حلال‌های آلی n- هگزان، اتیل استات و متانول و به ترتیب افزایش قطبیت انجام گرفت (Ismail *et al*., 2008). عصاره به دست آمده را با کمک دستگاه روتاری تغلیظ نموده تا حلال آن جدا گردید (Mohammadizadeh *et al*., 2013). سه نوع عصاره به دست آمده از هر اندام پس از خشک کردن و توزین، برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

در مدت ۱۵ دقیقه از زمان تنظیم کدورت سوسپانسیون باکتری با استاندارد ۰/۵ مک فارلند عمل تلقیح باکتری به محیط کشت انجام شد. عصاره تزریقی بر روی دیسک، حاوی ۲۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر عصاره بود. (امیری و همکاران، ۱۳۹۰). به منظور کنترل نتایج آزمون حساسیت ضدباکتریایی و مقایسه نتایج آنها از آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین به عنوان کنترل مثبت در این پژوهش استفاده گردید. در نهایت نتایج آزمون انتشار دیسک با نتایج آنتی بیوتیک کنترل مقایسه شدند.در این پژوهش جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده از روش رقت‌های متوالی در لوله آزمایش برای عصاره‌های توتیا در دامنه بین ۰/۲۵-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه گیری شد. برای تهیه عصاره طوری عمل شد که غلظت عصاره ۲۰۰۰ ماکروگرم در میلی‌لیتر بود (Yousefzadi *et al*., 2013).

برای ترسیم نمودار از نرم افزار Excell 2013 استفاده گردید و تجزیه و تحلیل داده های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 19 انجام شد. بررسی اختلاف معنی‌داری بین اندام‌های مختلف توتیای دریایی توسط آنالیز واریانس یک طرفه (One Way Anova) انجام گرفت و مقایسه داده‌ها در سطح معنی داری ($P<۰/۰۵$) بررسی شد.

نتایــج

عصاره اتیل استاتی پوسته استخراج شده از توتیای *Echinometra mathaei* بیشترین اثر ضد باکتریایی را بر باکتری گرم منفی *Vibrio alginolyticus* نسبت به سایر عصاره‌ها نشان داد. عصاره‌های اتیل استات و هگزانی پوسته، اثر ضد باکتریایی بیشتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نشان دادند. اثر عصاره اندام‌ها بر باکتری مورد مطالعه اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد ($P<۰/۰۵$) (شکل ۱).

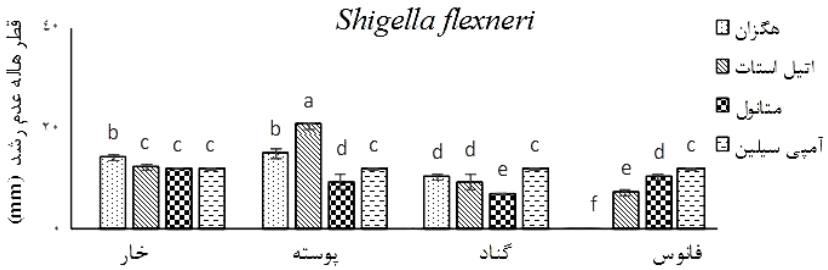


شکل ۱. اثر ضدباکتری عصاره‌های استخراج شده از ۴ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر روی باکتری *Vibrio alginolyticus*.

نتایج مطالعات نشان داد که عصاره اتیل استات پوسته توتیای دریایی گونه *E. mathaei* بیشترین اثر ضد باکتری را بر باکتری گرم منفی *Shigella flexneri* داشته است. همچنین عصاره هگزانی پوسته نسبت به عصاره متانولی دارای اثر ضد باکتری بیشتری بود. عصاره اتیل استاتی و هگزانی پوسته و خار نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین خاصیت ضد باکتریایی بیشتری را بر باکتری *Shigella flexneri* از خود نشان دادند. اثر عصاره های اتیل استاتی، هگزانی و متانولی در قیاس با هم دارای اختلاف معنی داری بودند ($P<۰/۰۵$) (شکل۲).

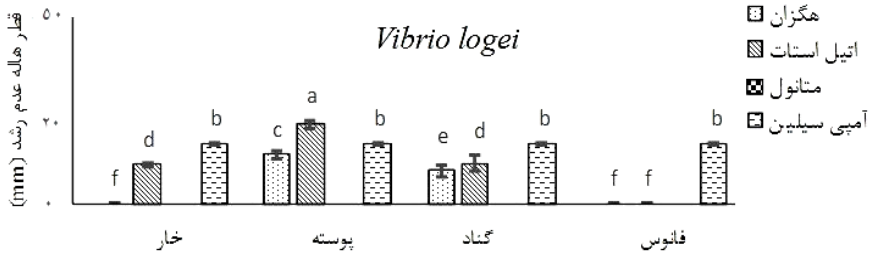
www.SID.ir

Archive of SID



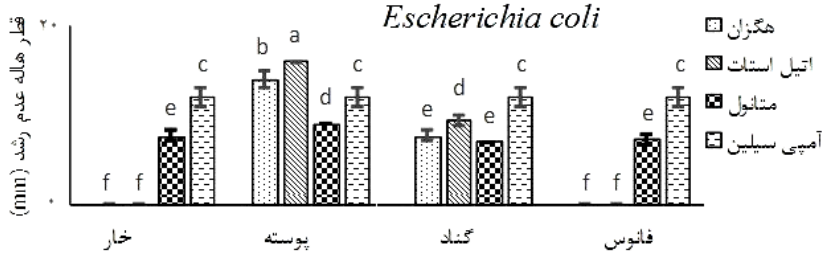
شکل ۲ . اثر ضد باکتری عصاره‌های استخراج شده از ۴ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر روی باکتری *Shigella flexneri*

عصاره اتیل استاتی پوسته استخراج شده از توتیای دریایی *E. mathae* بیشترین خاصیت ضد باکتری را بر باکتری گرم منفی *Vibrio logei* به نسبت سایر عصاره‌ها نشان داد. عصاره اتیل استاتی پوسته نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین خاصیت ضد باکتریایی بیشتری را نشان داد. اثر عصاره اندام‌ها بر باکتری مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$) (شکل۳).



شکل ۳ . اثر ضدباکتری عصاره‌های استخراج شده از ۴ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر روی باکتری *Vibrio logei*

عصاره اتیل استات و هگزانی پوسته توتیای دریای *E. mathaei* بر باکتری گرم منفی *Scherichia coli* دارای اثر ضد باکتری قابل ملاحظه‌ای بودند، به طوری که نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین اثر ضدباکتریایی بیشتری از خود نشان دادند. اثر عصاره اندام‌ها بر باکتری مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P<0/05$) (شکل۴).



شکل ۴. اثر ضدباکتری عصاره‌های استخراج شده از ۴ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر روی باکتری *Scherichia coli*

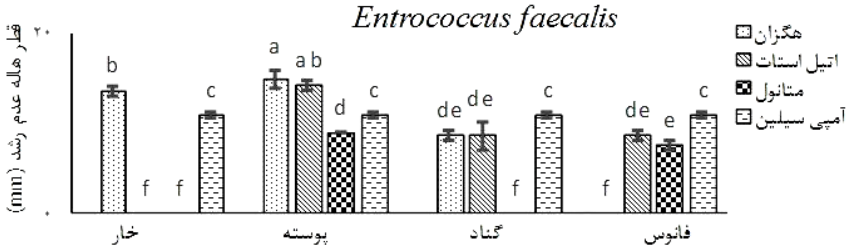
طبق آزمایشات صورت گرفته مشخص شد که عصاره هگزانی و اتیل استاتی پوسته و عصاره هگزانی خار بر باکتری گرم مثبت *Entrococcus faecalis* اثر ضد باکتری بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها دارد. همچنین عصاره هگزانی و اتیل استات به دست آمده از پوسته و عصاره هگزانی خار نسبت به آنتی بیوتیک صنعتی آمپی سیلین خاصیت ضد باکتری بیشتری از خود نشان داد. اثر عصاره اندام‌های مختلف بر باکتری *E. faecalis* دارای اختلاف معناداری بود ($P<0/05$) (شکل ۵).

عصاره اتیل استاتی پوسته توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* بیشترین اثر ضد باکتری را نسبت به سایر عصاره ها نشان داد. از بین تمام عصاره ها، عصاره اتیل استات پوسته نسبت به آمپی‌سیلین اثر

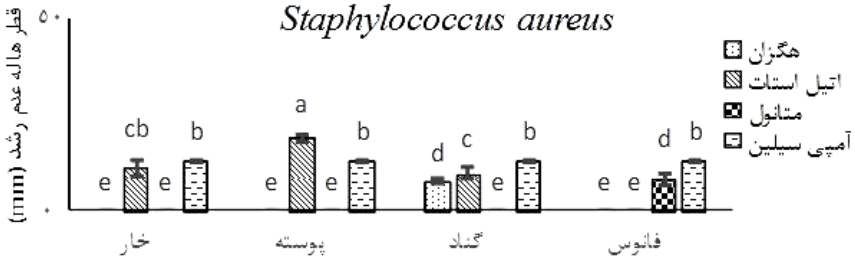
www.SID.ir

Archive of SID

ضد باکتری بیشتری را نشان داد. بین اثر عصاره‌های اندام‌های مختلف بر باکتری مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$) (شکل۶).



شکل ۵ . اثر ضد باکتری عصاره‌های استخراج شده از ۴ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر باکتری *Entrococcus faecalis*



شکل ۶ . اثر ضد باکتری عصاره های استخراج شده از ۴ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر روی باکتری *Staphylococcus aureus*

نتایج آزمون انتشار دیسک نشان داد که بین اثر عصاره قسمت‌های مختلف توتیای دریایی بر باکتری‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$) و بین اندام‌های مورد مطالعه در این پژوهش، پوسته خاصیت ضدباکتری بیشتری نسبت به دیگر اندام ها دارد و اندام‌ها از نظر خاصیت ضد باکتری دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P<۰/۰۵$).

همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد حداقل غلظت بازدارندگی عصاره های مورد مطالعه، مربوط به عصاره اتیل استات پوسته بر باکتری گرم منفی *Shigella flexneri* و *Vibrio logei* به مقدار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر ملاحظه گردید. در صورتی که عصاره هگزانی و عصاره اتیل استاتی پوسته بر باکتری *Vibrio alginolyticus* دارای اثر ضد باکتری ضعیف تری می باشد و حداقل غلظت بازدارندگی ۲ میلی گرم در لیتر می‌باشد. در غلظت ۰/۲۵میلی گرم بر لیتر که حداقل غلظت در این مطالعه بود، هیچ کدام از عصاره ها اثر بازدارندگی رشد بر باکتری های مورد مطالعه نداشتند.

جدول ۱. حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره‌های مورد استفاده بر باکتری‌های بیماریزای انسانی

عصاره پوسته	باکتری	غلظت mg/ml ۲	۱	۰/۵	۰/۲۵
ان- هگزان	*Vibrio alginolyticus*	MIC	+	+	+
اتیل استات	*Vibrio alginolyticus*	MIC	+	+	+
	Escherichia coli	-	MIC	+	+
	Staphylococcus aureus	-	MIC	+	+
	Shigella flexneri	-	-	MIC	+
	Vibrio logei	-	-	MIC	+

+ رشد باکتری در محیط کشت – عدم رشد باکتری در محیط کش

بحث

در این مطالعه اثر ضدباکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از *Echinometra mathaei* بر روی باکتری‌های پاتوژن انسانی بررسی شد. در بررسی و سنجش اثر ضد باکتریایی در اکثر آزمایشات صورت گرفته از دو روش انتشار از دیسک و رقیق سازی محیط کشت استفاده می‌شود که به عنوان دو روش مناسب در این راستا کاربرد دارند (Haug *et al*., 2002).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اندام‌های مختلف توتیای دریایی (خار، پوسته، گناد، فانوس ارسطو) دارای خاصیت ضد باکتریایی می‌باشند و بین اثر ضدباکتری اندام‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<0/05$) (شکل ۱تا ۶) که این یافته‌ها مشابه نتایجی است که Abubakar و همکاران در سال ۲۰۱۲ به دست آوردند. به این صورت که اثر ضد باکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از توتیای دریایی *Tripneustes gratilla* را بر باکتری‌های *Escherichia coli*، *Salmonella typhi*، *Shigella sonnei*، *Pseudomonas aeroginosa*، *Penicillium spp* مورد بررسی قرار دادند. طبق مطالعات ایشان فعالیت ضد باکتریایی در اندام‌های مختلف متفاوت بود؛ اثر ضد باکتریایی به طور عمده در عصاره گنادی و روده و به مقدار بسیار کم و بدون اثر در خار و محوطه دهانی دیده شد. اثر ضد باکتریایی هم در عصاره متانولی و هم در عصاره کلروفورمی در اندام‌های گناد و روده مشاهده شد.

در این مطالعه اثر عصاره هگزانی، اتیل استاتی و متانولی با یکدیگر متفاوت و از نظر اثر ضد باکتریایی بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P<0/05$). طبق نتایج حاصل، عصاره اتیل استات و هگزانی اثر ضد باکتریایی به مراتب بهتری نسبت به عصاره متانولی داشتند، در صورتی که در مطالعه Abubakar و همکاران در سال ۲۰۱۲، عصاره متانولی دارای اثر ضد باکتریایی هتری بود. در مطالعه‌ای که Uma و Parvathavarthini در سال ۲۰۱۰ انجام دادند عصاره هگزانی توتیای دریایی گونه *Temnoplearus alexandri* را از نظر خاصیت ضد باکتری بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار دادند و نتایج آن‌ها مشخص کرد که عصاره هگزانی این گونه دارای خاصیت ضد باکتریایی است.

در بین اندام‌های مورد مطالعه در این تحقیق، اندام پوسته دارای خاصیت ضد باکتریایی قابل توجهی بود (شکل ۱ تا ۶). این یافته مشابه نتایجی است که Shankarlal و همکاران در سال ۲۰۱۱ به دست آوردند، به این صورت که فعالیت ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی پوسته توتیای دریایی *Salmacis virgulata* را مورد بررسی قرار داده و دریافتند که عصاره پوسته گونه مورد مطالعه دارای خواص ضد باکتریایی می باشد. عصاره متانولی پوسته خاصیت ضد باکتری را در برابر باکتری*Proteus vulgaris* نشان داد که در مقایسه با باکتری *Proteus mirabiliS* اثر بیشتر بود. در حالی که عصاره متانولی در این تحقیق در غلظت کم هیچ گونه اثری بر باکتری های *Salmonella typhi* و *Vibrio cholera* نداشت.

Uma و همکاران در سال ۲۰۱۴ خاصیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکی توتیای دریایی *Temnopleurus Alexandri* را بر باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Entrococcus faecalis* و باکتری‌های گرم منفی *Eschrichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumonia* و *proteus vulgaris* مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج مطالعات ایشان عصاره هیدروالکلی گونه مورد مطالعه اثر ضد باکتریایی مناسبی را بر باکتری های مورد مطالعه به خصوص باکتری گرم منفی *E.coli* داشته است که در حداکثر غلظت تزریقی عصاره هیدروالکلی اثری همتراز با اثر آنتی بیوتیک صنعتی آمپی‌سیلین داشت.

با توجه به اینکه در مطالعه حاضر عصاره هگزانی (غیر قطبی) دارای خاصیت ضدباکتریایی قابل توجهی بود و در مطالعات Uma و Parvathavarthini در سال ۲۰۱۴ نیز عصاره هیدروالکی (غیر قطبی) دارای خاصیت ضد باکتریایی قابل توجهی بود و آنالیز شیمیایی آنها حضور استرول‌ها را تأیید کرده بود، این احتمال وجود دارد که در توتیای دریایی *Echinometra mathaei*، نیز استرول‌ها نقش تأیین کننده‌ای در خاصیت ضد باکتریایی گونه مورد مطالعه داشته باشند.

فعالیت ضدباکتری تشخیص داده شده ممکن است به دلیل مکانیسم ایمنی ذاتی باشد. همچنین ممکن است به علت همزیستی باکتریایی در محیط زیست موجود زنده بوده باشد (Strahl *et al*., 2002). همچنین ممکن است فعالیت ضدباکتریایی با رژیم غذایی در ارتباط باشد (Haug *et al*., 2002). همان طور که گفته شد اندام پوسته نسبت به سایر اندام‌ها دارای خاصیت آنتی باکتریایی قابل توجهی بود، به طوری که عصاره هگزانی و اتیل استاتی پوسته بر روی باکتری‌های مورد مطالعه، اثر به مراتب بهتری نسبت به آنتی‌بیوتیک صنعتی آمپی‌سیلین داشت (شکل ۶-۱). Service و همکاران در سال ۱۹۸۴ طی تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که پوسته توتیای دریایی *Echinus esculentus* حاوی رنگدانه *Echinochrome* A می باشد که این رنگدانه دارای خواص ضد باکتریایی هم بر باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی است.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره اتیل استاتی پوسته توتیا بر باکتری‌های پاتوژن انسانی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که عصاره اتیل استاتی پوسته توتیا بر باکتری *V.Logei* و *S. flexneri* با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر اثر بازدارندگی

www.SID.ir

Archive of SID

به مراتب بهتری نسبت به بقیه عصاره‌ها بر باکتری‌های مورد آزمایش داشتند (جدول۱). از عوامل موثر در فعالیتهای ضدمیکروبی، لیزوزوم‌ها نیز ممکن است نقش مهمی را در مکانیسم دفاعی در خارپوستان ایفا کنند. فعالیت بالای شبه لیزوزومی در عصاره طبیعی مایع سلومی با داشتن خاصیت آنتی‌باکتریایی در چندین گونه از خارپوستان گزارش شده است (Canicatti and Roch, 1989; Stabili and Pagliara, 1994)

با توجه به اینکه عصاره‌های اتیل استاتی و هگزانی پوسته در این آزمایش اثر ضد باکتریایی بهتری نسبت به آنتی بیوتیک صنعتی آمپی‌سیلین نشان دادند نیاز به خالص سازی برای شناسایی ترکیب یا ترکیبات شیمیایی موجود در آن وجود دارد.

منابـع

امیری، ت.، جوانبخت، م. ج. ۱۳۹۰. استاندارد آزمایش حساسیت میکروبی به روش انتشار دیسک در آگار. فصلنامه دامپزشکی. سال اول، شماره ۲، صفحات ۴۴-۲۲.

Abubakar, L., Mwangi, C., Uku, J., Ndirangu, S. 2012. Antimicrobial activity of various extract of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). African Journal of Pharmacology and Therapeutics. 1(1): 19-23.

Andersson, L., Bohlin, L., Iorizzi, M., Riccio, R., Minale, L., Moreno-Lopez, W. 1989. Biological activity of some saponins and saponin-like compounds from starfish and brittle-stars. Toxicon. 27: 179-188.

Beauregard, K.A., Truong, N.T., Zhang, H.Y., Lin, W.Y., Beck, G. 2001. The detection and isolation of novel antimicrobial peptide from echinoderm *cucumaria frondosa*. Advances in Experimental Medicine and Biology. 484: 55-62.

Haug, T., kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, O.M., Stensvag, K. 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea) and Asterias rubens (Asteroidea). Journal of Invertebrate Pathology. 81: 94-102.

Lorizzi, M., Bryan, P., McClintock, J., Minale, L., Palagiano, E., Maurelli S., Riccio, R., Zollo, F. 1995. Chemical and biological investigation of the polar constituents of the starfish *Luidia clathrata*, collected in the Gulf of Mexico. Journal of Natural Products. 58: 653-671.

Ismail, H., Lemriss, S., Ben Aoun, Z., Mhadhebi, L., Dellai, A., Kacem, Y., Boiron, P., Bouraoui, A. 2008. Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean Sea cucumber, *Holothuria polii*. Mycologie Médicale. 18: 23-26.

Mohammadizadeh, F., Ehsanpor, M., Afkhami, M., Mokhlesi, A., Khazzali, S. 2013. Evalution of antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of *Holothuria scabra* from the North Coast of the Persian Gulf. Jornal de Mycologie Medicale. 23: 225-229.

Service, M., Wardlaw, A.C. 1984. Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.). Comparative biochemistry and physiology. B 79: 161-165.

Shankarlal, S., Prabu, k., Natarajan, E. 2011. Antimicrobial and antioxidant activity of purple sea urchin shell (*Salmacis virgulata*). American-Eurasian Journal of Scientific Research. 3: 178-181.

Stabili, L., Pagiliara, P. 1994. Antibacterial protection in Marthasterias glacialis eggs-characterization of lysozyme-like activity. Comparative biochemistry and physiology. B 109: 709-713.

Strahl, E.D., Dobson, W.E., Lundie, J.R. 2002. Isolation and Screening of brittle star- associated bacteria for antibacterial activity. Current Microbiology. 44: 450-459.

Uma, B., Paravathavarthini, R. 2010. Antibacterial effect of hexane extract of sea urchin, *Temnopleurus alexandri*. International Journal of PharmTech Research. 3: 1677-1680.

Uma, B., Parvathavarthini, R. 2014. Antibacterial activity of hydroalcohil extract of sea urchin *Temnopleurus Alexandri*. Journal of Applied Research. 4(1) :1-4

Yousefzadi, M., Riahi-Madvar, A., Hadian, J., Rezaee, F., Rafiee, R., Biniaz, M. 2013. Toxicity of essential oil *Satureja khuzistanica*: In vitro cytotoxicity and anti-microbial activity. Journal of Immunotoxicology.10(3): 1-6.

www.SID.ir