اثر ضد میکروبی آلوئه ورا و کیتوزان در شرایط آزمایشگاهی

محبت محبی*[۱]، بهروز علیزاده بهبهانی[۲]، الهام انصاری فر[۲]، محمد نوشاد[۲]

۱ دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲ دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* **نشانی برای مکاتبه:** مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده کشاورزی، گروه صنایع غذایی، تلفن ۰۵۱۱-۸۷۶۳۸۴۲، mohebbatm@gmail.com
دریافت مقاله: فروردین نود و سه پذیرش برای چاپ: خرداد نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به این که بیماری‌های عفونی و مسمومیت زا طیف وسیعی از بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند و از سویی شمار سوش‌های میکروبی مقام به آنتی بیوتیک‌ها هر روز بیش تر می‌شوند، لذا نیاز به مواد ضد میکروبی طبیعی جدید و کم خطر به شدت مورد نیاز می‌باشد. هدف از این پژوهش تعیین اثر ضد میکروبی آلوئه ورا و کیتوزان بر باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز PTCC 1447، کلبسیلا پنومونیه PTCC 1053، استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1337 و اشرشیا کلی PTCC 1330 و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی می‌باشد.*

روش‌کار: *از آزمون انتشار دیسک به روش کربی - بوئر برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی استفاده گردید. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش Serial Dilution Method و طبق استاندارد NCCLS تعیین گردید. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد.*

یافته‌ها: *بیش ترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۰mg/ml مربوط به باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز و کم ترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی کلبسیلا پنومونیه بود. MIC آلوئه ورا برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب ۲، ۸، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MBC نیز در خصوص آن‌ها به ترتیب ۴، ۱۶، ۸ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. MIC کیتوزان برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب ۲، ۴، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MBC نیز در خصوص آن‌ها به ترتیب ۲، ۸، ۸ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود*

نتیجه‌گیری: *آلوئه ورا و کیتوزان در مقایسه با آنتی بیوتک‌های رایج درمانی در شرایط آزمایشگاهی اثر بازدارندگی بیش‌تری روی برخی سویه‌های مورد مطالعه داشت.*

واژگان کلیدی: آلوئه ورا، کیتوزان، بیماری‌های عفونی، مقاومت آنتی بیوتیکی، هاله عدم رشد

مقدمه

سابقه استفاده از آنتی بیوتیک ها رایج در درمان سریع و موثر عفونت های ناشی از میکروارگانیسم های بیماری زا بیش از پنجاه سال می باشد. در طول این مدت، تغییرات زیادی در نوع آنتی بیوتیک های مصرفی و نیز حساسیت و مقاومت باکتری ها نسبت به آن ها ایجاد شده است(۱). آنتی بیوتیک ها از جایگاه ویژه ای در درمان بیماری های عفونی برخوردار هستند. مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های رایج درمانی در باکتری ها، یک پدیده جهانی و فراگیر است و دامنه آن بسیار وسیع و شامل تمام عوامل بیماری زای انسانی و تمامی گروه های آنتی بیوتیکی می باشد. برخی از میکروارگانیسم‌ها به طور ذاتی و طبیعی به تعدادی از عوامل ضد میکروبی مقاوم هستند، اما برخی از میکروارگانیسم ها مقاومت به عوامل ضد میکروبی را با مکانیسم های موتاسیون و انتقال ژن های مقاومت دریافت می کنند(۲). معمولاً مقاومت آنتی بیوتیکی به شکل یک موتاسیون(جهش) رخ می‌دهد، از آنجا که جهش کروموزمی در باکتری‌ها که دارای ساختار ژنتیکی ساده تری هستند بسیار بیش تر از موجودات دیگر می‌باشد، لذا باکتری ها مرتب تغییر می‌کنند، این تغییرات ممکن است به دلیل ظهور بیماری‌های عفونی نوپدید و بازپدیدی (emerging & reemerging) باشد(۳).

آلوئه ورا (*Aloe barbadensis Miller*) عضوی از خانواده لیلیاسه و تیره آلوئیده است که در ایران صبر زرد یا صبر تلخ نیز نامیده می شود. یک گیاه زیست کننده در نواحی خشک، آب دار و مقاوم است که بافت ذخیره سازی آب را در برگ ها و به منظور زنده ماندن در مناطق خشک کم باران و یا با باران نامنظم توسعه داده است. برگ آلوئه ورا می‌تواند به دو بخش عمده تقسیم شود: پوسته سبز بیرونی که شامل دسته های آوندی است و پارانشیم بی رنگ داخلی (پالپ) که شامل ژل آلوئه ورا است(۴).

کیتوزان یک کوپلیمر از گلوکز آمین و N- استیل گلوکز آمین است که به وسیله N- دی استیلاسیون کیتین تهیه می گردد و ماده ای بی رنگ و بی بو می باشد. کیتوزان از ضایعات خرچنگ و میگو تولید می شود و دارای ویژگی های منحصر به فردی است و از آن می توان به عنوان یک ماده ضد میکروبی در ترکیب پوشش و فیلم استفاده نمود(۵).

استافیلوکوکوس اورئوس، یکی از مهم ترین پاتوژن های فرصت طلب می باشد که در آبسه های بافت نرم، اندوکاردیت و باکتریمی دیده شده است(۶). منابع اصلی عفونت استافیلوکوکوس اورئوس، انتشار ارگانیسم ها از زخم و ضایعات انسانی، ترشحات آلوده زخم ها، سیستم تنفسی و پوست هستند. بعضی از استافیلوکوک ها، فلور طبیعی پوست و غشاهای مخاطی انسان بوده و برخی دیگر عامل بروز عفونت های چرکی، تشکیل آبسه و حتی سپتی سمی کشنده می‌باشند(۶).

کلبسیلا پنومونیه، باسیل گرم منفی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه و دارای رابطه ژنتیکی نسبتا نزدیکی با سایر جنس های این خانواده نظیر اشریشیاکلی، سالمونلا، یرسینیا و شیگلا می باشند، این ارگانیسم جزیی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می دهند و حدود ۳۰ درصد افراد، ناقل روده ای این میکروب هستند(۷).

استرپتوکوکوس پیوژنز متعلق به خانواده استرپتوکوکاسه می باشد و از جمله گونه هایی می باشد که برای انسان و حیوانات بیماری زاست. این باکتری از نظر نیاز حرارتی مزوفیل هستند و در حرارت پایین تر از ۱۰ درجه سانتی گراد و یا بیش تر از ۴۵ درجه سانتی گراد رشد و تکثیر نمی کنند. استرپتوکوکوس پیوژنز در مواد غذایی از جمله شیر خام یافت می شود و می توانند عامل بیماری های عفونی باشد(۸).

اشرشیا کلی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه، و مهم ترین عضو کلی فرم ها می باشد. این باکتری متحرک، فاقد هاگ، معمولا بدون کپسول می باشد . رشد بهینه باکتری *اشرشیا کلی* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است اما تا دمای ۴۹ درجه را نیز تحمل کرده و به رشد خود ادامه می‌دهد و می‌تواند عامل بیماری‌های عفونی در انسان باشد (۹).

در این پژوهش اثر ضد میکروبی آلوئه ورا و کیتوزان علیه باکتری‌های *Klebsiella pneumoniae* PTCC 1053 ،*Streptococcus Pyogenes* PTTC 1447 و *Staphylococcus aureus* PTCC 1337، *Escherichia coli* PTCC 1330 بررسی شد.

روش کار

در این مطالعه تجربی که از اردیبهشت ماه ۱۳۹۲ تا بهمن ماه ۱۳۹۲ طول کشید از چهار گونه استاندارد میکروبی شامل دو گونه گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* PTCC 1337 و *Streptococcus Pyogenes* PTTC 1447) و دو گونه گرم منفی (*Klebsiella pneumoniae* PTCC 1053 و *Escherichia coli* PTCC 1330) استفاده شد. از محیط کشت‌های مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث، همگی ساخت شرکت مرک آلمان، جهت تلقیح، رشد و بررسی فعالیت ضد میکروبی سوش ها استفاده گردید. دیسک‌های آنتی بیوتیک مورد استفاده در این مطالعه شامل استرپتومایسین، کانامایسین، جنتامیسین، متی سیلین، سیپروفلوکساسین و وانکومایسین، همگی ساخت شرکت DIFCO BACTO U.S.A ، استفاده شد.

برگ های آلوئه ورا (*Aloe barbadensis Miller*) به صورت تازه از بازارهای محلی مشهد (خراسان رضوی) خریداری شد. برگ های خریداری شده از نظر ظاهری سبز رنگ، گوشتی، با لبه های دندانه دار و دارای تیغ بودند. به منظور بالا بردن شرایط بهداشتی کار و عمل ضدعفونی ابتدا برگ های آلوئه ورا، با محلول کلرین ملایم ۲۵٪ شسته و پس از خشک شدن برگ ها، مرحله استخراج ژل آغاز گردید. قسمت بالایی نوک (که حاوی مقدار بسیار جزئی ژل است) و انتهایی هر برگ بریده شده و کنار گذاشته شد. در ادامه، پوسته خارجی موجود بر روی برگ به وسیله تیغه استریل برش و جدا گردید و ژل میانی متصل به لایه زیرین موجود در برگ، مشخص گردید. سپس پالپ به همراه ژل موسیلاژ بی رنگ موجود در آن، توسط تیغه استریل و همچنین قاشق تمیز و استریل، از پوسته زیرینی که به آن متصل بود، جدا شد، سپس در یک مخلوط کن ساخت شرکت Nikai ژاپن، بصورت همگن و یکنواخت در آمد و برای جلوگیری از اکسیداسیون و فساد، سریعاً در شیشه های تیره رنگ که قبلا استریل شده بود ریخته و تا زمان استفاده در دمای یخچال (۴ درجه سانتی گراد) نگه داری شد.

برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی کیتوزان ابتدا محلول هایی با غلظت های مورد نظر (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) تهیه شد. و سپس جهت حذف آلودگی های میکروبی و اطمینان از استریل بودن از اشعه UV استفاده گردید(۱۰).

برای تعیین وزن خشک آلوئه ورا و کیتوزان از روش علیزاده بهبهانی و هم کاران(۲۰۱۳) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا یک لوله آزمایش توسط ترازوی دیجیتال به دقت توزین سپس ۱ ml از آلوئه ورا و کیتوزان در آن ریخته شد. محتوی لوله که حاوی ۱ ml از آلوئه ورا و کیتوزان در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی گراد) خشک گردید (جهت کنترل دما از دماسنج نصب شده در آزمایشگاه استفاده گردید). بعد از خشک شدن آلوئه ورا و کیتوزان، وزن لوله آزمایش مجددا توسط ترازوی دیجتال تعیین گردید. اختلاف وزن لوله معادل ۱ ml از آلوئه ورا و کیتوزان، است. این روش سه بار تکرار گردید و میانگین سه بار تکرار، به عنوان وزن خشک آلوئه ورا و کیتوزان گزارش شد(۱۱).

جهت فعال سازی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ابتدا سوسپانسیون میکروبی به صورت تازه از هر سوش میکروبی تهیه گردید. ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، به کمک آنس استریل از کشت ذخیره (مادر) به محیط کشت شیب‌دار Muller Hinton Agar تلقیح انجام شد. سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر پس از رشد باکتری بر سطح شیب‌دار آگار آن تهیه گردید. سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شد، و تا برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند که در این حالت سوسپانسیون میکروبی حاوی $۱/۵\times ۱۰^{۸}$ (CFU) /ml)، توسط محلول رینگر رقیق شد(۱۲).

برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به آلوئه ورا و کیتوزان از آزمون انتشار دیسک به روش کربی - بوئر و روش آمیخته (Pour Plate) استفاده شد. در این بررسی از دیسک‌های کاغذی استفاده شد. در روش

انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا CFU /ml ۱۰^۸ ×۱/۵ (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 (۲mg/ml، ۴، ۶، ۸ و ۱۰) خیسانده شده بودند توسط پنس استریل با کمی فشار بر سطح محیط کشت ثابت گردید. پس از آن پتری‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت شدند. اثر ضد میکروبی براساس هاله عدم رشد در مقیاس میلی متر اندازه گیری شد در ادامه با انجام آزمون آنتی بیوگرام آنتی‌بیوتیک‌های رایج به مقایسه اثر ضد میکروبی آلوئه ورا و کیتوزان با این آنتی بیوتیک‌ها پرداخته شد. تمامی آزمایشات با ۳ تکرار انجام گرفت(۱۳، ۱۴).

در روش آمیخته پس از افزودن ۰/۲ گرم از آلوئه ورا و کیتوزان به ۵ میلی-لیتر آب مقطر استریل، مخلوط حاصل به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول به ظرف های پتری استریل اضافه گشت. پس از آنکه 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 ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت(۱۵) .

از روش Micro dilution broth و طبق استاندارد NCCLS جهت تعیین و ارزیابی حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC)، استفاده شد. بدین منظور از یکسری لوله های آزمایشگاهی که قبلا توسط اتوکلاو استریل شده بود رقت های متوالی از آلوئه ورا و کیتوزان (mg/ml ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶) تهیه شد. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرم خانه قرار داده شد. کم‌ترین غلظتی از آلوئه ورا و کیتوزان که مانع از رشد باکتری شده و در آن کدورتی مشاهده نشد به عنوان MIC گزارش گردید(۱۶، ۱۷).

برای تعیین میزان دقیق حداقل غلظت کشندگی (MBC) آلوئه ورا و کیتوزان نیز از تمامی لوله‌هایی که در آن کدورتی مشاهده نشده بود نمونه برداری شد و جهت تعیین MBC کشت داده شد. لوله‌ای که حاوی کم-ترین غلظت بود و در پلیت مربوط به آن هیچ کلنی رشد نکرده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد(۱۸).

داده‌های حاصل از تاثیر ۵ سطح متفاوت غلظت آلوئه ورا و کیتوزان بر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی با سه تکرار، به روش تجزیه واریانس یک طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS Ver 16 تجزیه و تحلیل آماری شد. برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

یافته‌ها

عصاره آلوئه ورا درغلظت mg/ml ۲ بر باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس کاملا موثر بوده اما فاقد اثر ضد باکتریایی مشخصی روی کلبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلی بود و از رشد این باکتری بر روی محیط کشت جلوگیری نکرد. نتایج از بررسی اثر ضد میکروبی کیتوزان به روش آمیخته نشان داد که کیتوزان درغلظت mg/ml ۲ بر باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی کاملا موثر بوده اما فاقد اثر ضد باکتریایی مشخصی روی کلبسیلا پنومونیه بود و از رشد این باکتری بر روی محیط کشت جلوگیری نکرد.

بیش ترین قطر هاله عدم رشد آلوئه ورا و کیتوزان در غلظت ۱۰mg/ml مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کم ترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی کلبسیلا پنومونیه بود. آلوئه ورا در تمامی غلظت‌ها روی استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس موثر بوده اما در غلظت mg/ml ۲ روی کلبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلی اثر بازدارندگی نشان نداد. به جز درغلظت‌های ۸ با ۱۰ آلوئه ورا بر روی کلبسیلا پنومونیه و استرپتوکوکوس پیوژنز در بقیه موارد اختلاف میانگین قطر عدم رشد (به صورت دو به دو) با هم معنی‌دار بود. در مقایسه دو به دو میان غلظت‌های آلوئه ورا بر کلبسیلا پنومونیه نیز اختلاف میانگین قطر بازدارندگی مشاهده شد. کیتوزان در تمامی غلظت‌ها روی استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی موثر بوده اما در غلظت mg/ml ۲ روی کلبسیلا پنومونیه اثر بازدارندگی نشان نداد. به جز درغلظت‌های ۸ با ۱۰ و ۶ با ۸ کیتوزان بر روی کلبسیلا پنومونیه و همچنین غلظت ۸ با ۱۰ بر استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی در بقیه موارد اختلاف میانگین قطر عدم رشد (به صورت دو به دو) با هم معنی‌دار بود. مقایسه دو به دو میانگین‌های قطر هاله عدم رشد در مورد آلوئه ورا و کیتوزان بر باکتری‌های مورد بررسی نشان داد که با افزایش غلظت‌ها، میانگین قطر عدم رشد افزایش می یابد. غلظت مؤثر (غلظتی با بیش‌ترین اثر ضد باکتریایی) به کمک نتایج آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد تعیین شد. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون مشاهده شد هم در مورد آلوئه ورا و کیتوزان غلظت موثر ۱۰mg/ml بود. وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ماده مؤثر موجود در آلوئه ورا و کیتوزان نسبت داد. ولی به طوری کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می‌کند (جدول ۱).

جدول۱- میانگین قطر هاله عدم رشد بر *استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* بر حسب میلی‌متر (کربی - بوئر)

میکروارگانیسم		غلظت (mg/ml) ۲	۴	۶	۸	۱۰
آلوئه ورا	استرپتوکوکوس پیوژنز	۸/۱۰±۰/۴۵^{a}	۱۰/۴۰±۰/۵۰^{b}	۱۳/۲۰±۰/۵۰^{c}	۱۵/۶۰±۰/۵۰^{d}	۱۶/۹۰±۰/۵۰^{d}
آلوئه ورا	استافیلوکوکوس اورئوس	۸/۰۰±۰/۵۷^{a}	۱۰/۰۰±۰/۵۰^{b}	۱۲/۰۰±۰/۴۵^{c}	۱۳/۸۰±۰/۵۷^{d}	۱۵/۹۰±۰/۵۰^{e}
آلوئه ورا	اشرشیا کلی	-	۷/۱۰±۰/۵۰^{a}	۸/۹۰±۰/۵۷^{b}	۱۰/۷۰±۰/۵۷^{c}	۱۲/۳۰±۰/۵۰^{d}
آلوئه ورا	کلبسیلا پنومونیه	-	۶/۷۰±۰/۵۰^{a}	۸/۳۰±۰/۵۴^{b}	۹/۳۰±۰/۵۰^{c}	۱۰/۴۰±۰/۵۰^{c}
کیتوزان	استرپتوکوکوس پیوژنز	۸/۸۰±۰/۴۵^{a}	۱۱/۱۰±۰/۵۰^{b}	۱۴/۲۰±۰/۵۰^{c}	۱۷/۵۰±۰/۵۰^{d}	۱۷/۹۰±۰/۵۰^{d}
کیتوزان	استافیلوکوکوس اورئوس	۸/۶۰±۰/۵۷^{a}	۱۱/۰۰±۰/۵۰^{b}	۱۳/۱۰±۰/۴۵^{c}	۱۶/۸۰±۰/۵۷^{d}	۱۷/۰۰±۰/۵۰^{d}
کیتوزان	اشرشیا کلی	۷/۰۰±۰/۵۰^{a}	۸/۸۰±۰/۵۷^{b}	۱۰/۸۰±۰/۵۷^{c}	۱۳/۱۰±۰/۵۰^{d}	۱۴/۲۰±۰/۵۰^{d}
کیتوزان	کلبسیلا پنومونیه	-	۷/۳۰±۰/۵۰^{a}	۹/۹۰±۰/۵۷^{b}	۱۱/۱۰±۰/۵۷^{b}	۱۲/۳۰±۰/۵۰^{b}

- علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد باکتری آلوئه ورا و کیتوزان می‌باشد.
- حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.
- حروف مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.

نتایج مربوط به تاثیر شش آنتی بیوتیک رایج بر میزان هاله عدم رشد بر دو باکتری گرم منفی و دو باکتری گرم مثبت در (جدول ۲) آورده شده است. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی آلوئه ورا و کیتوزان در (جدول ۳) آورده شده است. نتایج نشان می دهد که MIC آلوئه ورا برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب ۲، ۸، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MIC کیتوزان برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب ۲، ۴، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی MBC آلوئه ورا و کیتوزان در (جدول ۴) آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد MBC آلوئه ورا برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب ۴، ۱۶، ۸ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MBC کیتوزان برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب ۲، ۸، ۸ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود(شکل ۲و۱).

جدول۲- میانگین قطر هاله عدم رشد شش آنتی بیوتیک رایج بر استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه بر حسب میلی‌متر (کربی - بوئر)

میکروارگانیسم	وانکومایسین	سیپروفلوکساسین	متی سیلین	جنتامیسین	کانامایسین	آنتی بیوتیک استرپتومایسین
استرپتوکوکوس پیوژنز	۷/۹	۲۵	۸	۱۶/۲	۷	۷
استافیلوکوکوس اورئوس	۷	۲۳/۳	۷	۱۷	۱۳/۸	۱۰/۵
اشرشیا کلی	۹	۲۱	۷	۱۶	۱۷	۱۴/۵
کلبسیلا پنومونیه	۸	۱۹	۷	۱۵	۱۵	۱۰/۲

جدول۳- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد(MIC) آلوئه ورا و کیتوزان بر استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه

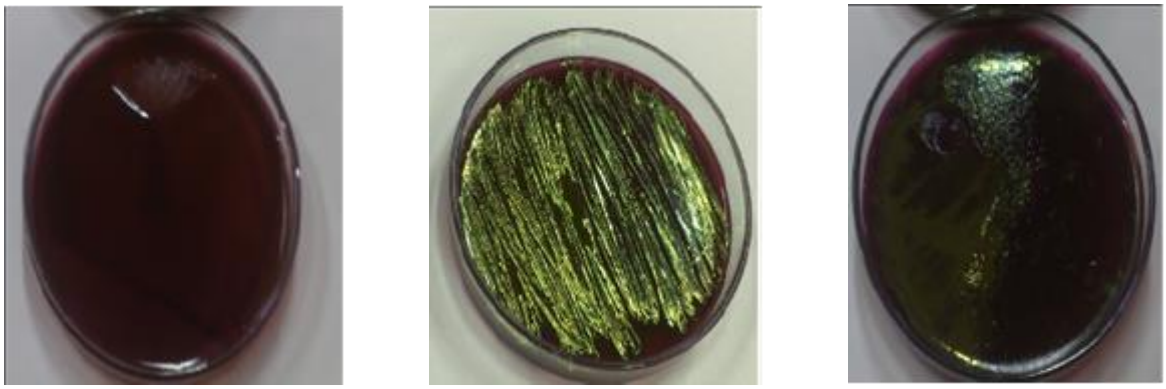
نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت (mg/ml) ۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
آلوئه ورا	*استرپتوکوکوس پیوژنز*	+	+	+	+	+	+	+	+	–
آلوئه ورا	*استافیلوکوکوس اورئوس*	–	+	+	+	+	+	+	+	–
آلوئه ورا	*اشرشیا کلی*	–	–	+	+	+	+	+	+	–
آلوئه ورا	*کلبسیلا پنومونیه*	–	–	+	+	+	+	+	+	–
کیتوزان	*استرپتوکوکوس پیوژنز*	+	+	+	+	+	+	+	+	–
کیتوزان	*استافیلوکوکوس اورئوس*	–	+	+	+	+	+	+	+	–
کیتوزان	*اشرشیا کلی*	–	+	+	+	+	+	+	+	–
کیتوزان	*کلبسیلا پنومونیه*	–	–	+	+	+	+	+	+	–

+: عدم رشد -: رشد

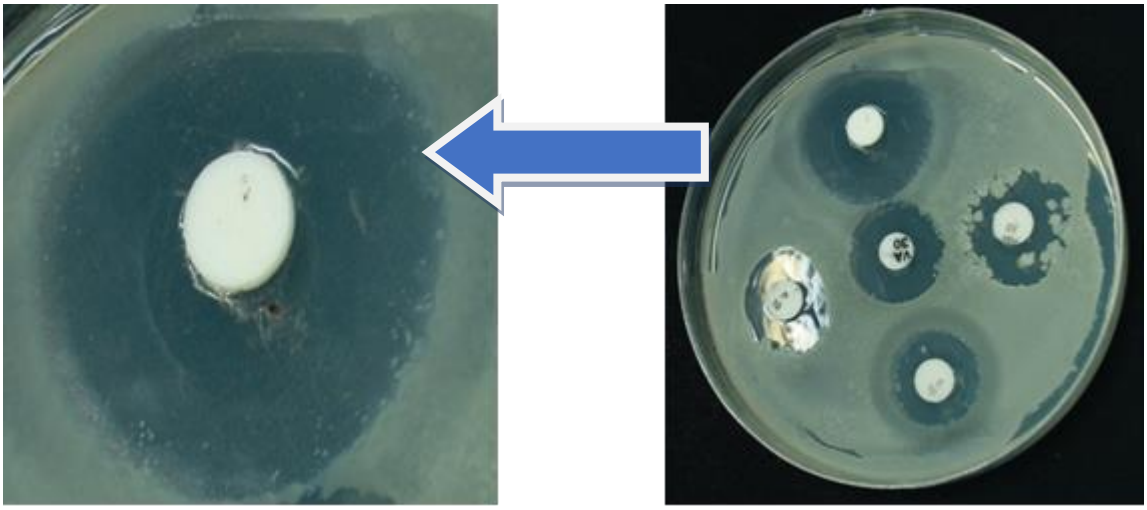
جدول۴- نتایج حداقل غلظت کشندگی(MBC) آلوئه ورا و کیتوزان بر استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت (mg/ml) ۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
آلوئه ورا	*استرپتوکوکوس پیوژنز*	–	+	+	+	+	+	+	+	–
آلوئه ورا	*استافیلوکوکوس اورئوس*	–	–	+	+	+	+	+	+	–
آلوئه ورا	*اشرشیا کلی*	–	–	+	+	+	+	+	+	–
آلوئه ورا	*کلبسیلا پنومونیه*	–	–	–	+	+	+	+	+	–
کیتوزان	*استرپتوکوکوس پیوژنز*	+	+	+	+	+	+	+	+	–
کیتوزان	*استافیلوکوکوس اورئوس*	–	–	+	+	+	+	+	+	–
کیتوزان	*اشرشیا کلی*	–	–	+	+	+	+	+	+	–
کیتوزان	*کلبسیلا پنومونیه*	–	–	+	+	+	+	+	+	–

+: عدم رشد -: رشد



شکل ۱- اثر ضد میکروبی غلظت mg/ml ۲ آلوئه ورا (سمت راست) و کیتوزان (سمت چپ) نمونه شاهد (وسط) بر *اشرشیا کلی* (روش آمیخته).



شکل ۲- قطر هاله عدم رشد آلوئه ورا بر *استرپتوکوکوس پیوژنز*.

بحث

آنتی بیوتیک ها از جایگاه ویژه ای در درمان بیماری های عفونی برخوردار هستند. مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های رایج درمانی در باکتری ها، یک پدیده جهانی و فراگیر است و دامنه ی آن بسیار وسیع و شامل تمام عوامل بیماری‌زای انسانی و تمامی گروه های آنتی بیوتیکی می باشد، لذا نیاز به مواد ضد میکروبی طبیعی جدید و کم خطر به شدت مورد نیاز می‌باشد (۲).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در تمامی موارد و در برابر سویه های مورد بررسی، بین قطر هاله عدم رشد و غلظت آلوئه ورا و کیتوزان رابطه مستقیمی وجود دارد. بدین معنی که با کاهش غلظت در تمامی موارد قطر هاله عدم رشد کاهش می یابد. این روند بر روی هر چهار سوش استاندارد باکتریایی نشان دهنده این واقعیت است که آلوئه ورا و کیتوزان اثر ضد میکروبی مشخصی دارند، که با افزایش غلظت و یا به عبارت دیگر با افزایش غلظت مواد موثره در آلوئه ورا و کیتوزان اثر بازدارندگی و کشندگی بیشتر می شود. در پژوهش حاضر تلاش بر این بود که از غلظت های پایین (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) جهت بررسی اثر ضد میکروبی استفاده شود. با توجه به اینکه هر چه قطر هاله عدم رشد ایجاد شده بر روی محیط کشت بیشتر باشد، اثر ضد میکروبی بیشتر است، بنابراین اثر ضد میکروبی آلوئه ورا و کیتوزان نسبت به داروهای شیمیایی مذکور قابل بحث می باشد. نتایج نشان داد که آلوئه ورا و کیتوزان به خوبی از رشد دو گونه گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogenes*) و دو گونه گرم منفی (*Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli*) جلوگیری کرد. نتایج اثر ضد میکروبی کیتوزان (جدول ۲) نشان داد که به جز درغلظت‌های ۸ با ۱۰ و ۶ با ۸ کیتوزان بر روی کلبسیلا پنومونیه و همچنین غلظت ۸ با ۱۰ بر استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی در بقیه موارد اختلاف میانگین قطر عدم رشد (به صورت دو به دو) با هم معنی‌دار می‌باشد. در مورد اثر ضد میکروبی کیتوزان با افزایش غلظت آن، نظرات متفاوتی وجود دارد. به عنوان مثال کائو و همکاران (۲۰۰۹) بیان نمودند که با افزایش غلظت کیتوزان اثر ضد میکروبی آن افزایش می یابد (۱۹)، این در حالی است که ژیافنگ و همکاران (۲۰۱۰) بیان داشتند که افزایش غلظت کیتوزان تاثیری در افزایش اثر ضد میکروبی کیتوزان ندارد (۲۰). وجود اختلاف در نتایج ممکن است به دلیل تفاوت در شرایط انجام آزمایش باشد. عدم افزایش فعالیت ضد باکتریایی کیتوزان با افزایش غلظت آن، ممکن است به دلیل افزایش ویسکوزیته محلول کیتوزان در غلظت های بالا (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) و محدود شدن تعداد تماس های موثر کیتوزان با سطح سلول های ضد باکتریایی باشد. از سویی دیگر با افزایش غلظت کیتوزان، میزان بار مثبت ناشی از حضور گروه‌های آمینی افزایش می یابد و سبب تشکیل پیوندهای الکتروستاتیک قوی تر و محکم تری می شود. این امر باعث ایجاد واکنش های قوی بین کیتوزان و دیواره سلولی باکتری ها و در نتیجه افزایش اثر ضد میکروبی کیتوزان می‌گردد (۲۰)، شاید بتوان یکی از دلایل اینکه کیتوزان دارای اثر بازدارندگی و کشندگی بیشتری بر روی باکتری های گرم مثبت است را تفاوت در ساختار باکتری گرم مثبت با گرم منفی و در نتیجه واکنش قویتر بین کیتوزان و دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیان نمود. نتایج پژوهش حاضر نیز موئد این مطلب بود و نشان داد که کیتوزان به خوبی از رشد و فعالیت سوش های مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری به عمل آورد. کائو و همکاران (۲۰۰۹) بیان نمودند که کیتوزان رشد باکتری‌های مختلف بر روی صدف خوراکی را کاهش داده و با افزایش غلظت کیتوزان اثر ضد میکروبی آن افزایش می‌یابد (۱۹). مونز و همکاران (۲۰۰۹) اثر ضد میکروبی پوشش کیتوزان را بر روی توت فرنگی و گوجه فرنگی را در ۷ روز اینکوباسیون مورد بررسی قرار دادند، نتایج این پژوهشگران نشان داد که با افزایش غلظت کیتوزان، به طور معنی داری اثر ضد میکروبی کیتوزان افزایش می یابد (۲۱).

نتایج این مطالعه حساسیت بیش‌تر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی در مقابل عوامل ضد میکروبی آلوئه ورا و کیتوزان را نشان داد. با توجه به تعداد ترکیبات تشکیل دهنده آلوده ورا و کیتوزان، نمی توان مکانیسم واحدی برای فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها در نظر گرفت.

در مطالعات دیگر نیز محققین بر افزایش اثر ضد میکروبی عصاره‌های مختلف بر باکتری‌های گرم مثبت مهر تایید زده‌اند. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۴) اثر ضد میکروبی پوشش کربوکسی متیل سلولز حاوی اکالیپتوس کامالدوالنس را بر استرپتوکوکوس پایوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و پسودوموناس آئروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که اثر ضد میکروبی پوشش کربوکسی متیل سلولز حاوی اکالیپتوس کامالدوالنس بر استرپتوکوکوس پایوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نسبت بر باکتری گرم منفی پسودوموناس آئروژینوزا بیشتر بود. این محققان علت این پدیده را، تفاوت دیواره باکتری‌های گرم مثبت در قیاس با باکتری‌های گرم منفی عنوان نمودند (۲۲). در پژوهش دیگر طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱۴) اثر ضد میکروبی رزماری و اسطوخودوس را بر شش سوش میکروبی گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که اثر ضد میکروبی رزماری و اسطوخودوس بر باکتری های گرم مثبت به مراتب بیشتر از باکتری های گرم منفی می باشد (۲۳). حیدری سورشجانی و همکاران (۲۰۱۴) اثر ضد میکروبی کرفس کوهی را بر روی استافیلو کوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتلیس و انتروباکتر ائروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی بررسی نمودند. نتایج نشان داد اثر ضد میکروبی کرفس کوهی بر روی استافیلو کوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتلیس بسیار بیشتر از باکتری گرم منفی انتروباکتر ائروژینوزا بود (۲۴). طباطبایی یزدی و همکاران (۱۳۹۳) اثر ضد میکروبی کلپوره را بر روی ۳ سوش گرم مثبت و ۲ گونه گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد، اثر ضد میکروبی کلپوره بر روی سوش های استاندارد گرم مثبت بیشتر از باکتری های گرم منفی بود (۲۵).

مقایسه بین اثر ضد میکروبی آلوئه ورا در برابر هر شش آنتی بیوتیک رایج نشان داد که اثر ضد میکروبی بر استرپتوکوکوس پیوژنز در بالاترین غلظت حداکثر بود و این میزان (۰/۵۰± ۱۶/۹۰) جدول (۲) بدست آمد و این میزان بازدارندگی از تمامی آنتی بیوتیک‌ها به جز آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشتر بود. همچنین اثر ضد میکروبی آلوئه ورا به روش کربی - بوئر بر کلبسیلا پنومونیه از سه آنتی بیوتیک (کانامایسین، سیپروفلوکساسین و جنتامیسین) کم‌تر بود و در مقایسه با سه آنتی بیوتیک (استرپتومایسین، متی سیلین، و وانکومایسین) بیشتر بود. همچنین مقایسه بین اثر ضد میکروبی کیتوزان در برابر هر شش آنتی بیوتیک رایج نشان داد، که اثر ضد میکروبی بر استرپتوکوکوس پیوژنز در بالاترین غلظت حداکثر بود و این میزان (۰/۵۰± ۱۷/۹۰) جدول (۲) بدست آمد و این میزان بازدارندگی از تمامی آنتی بیوتیک‌ها به جز آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشتر بود. همچنین اثر ضد میکروبی کیتوزان بر کلبسیلا پنومونیه (۰/۵۰ ± ۱۲/۳۰) جدول (۲) از سه آنتی بیوتیک (کانامایسین، سیپروفلوکساسین و جنتامیسین) کم‌تر بود و در مقایسه با سه آنتی بیوتیک (استرپتومایسین، متی سیلین، و وانکومایسین) بیشتر بود. مصرف زیاد و فراوان عوامل ضد میکروبی همانند آنتی بیوتیک‌ها منجر به ظهور مقاومت باکتری به آنتی بیویتیک های رایج درمانی می گردد. مصرف انتخابی با دوز بالا، نقش مسلط در ظهور و کسب مقاومت دارد. این عوامل مقاومت، می توانند به وسیله مکانیسم های انتقال ژنتیک بین جمعیت های متعدد منتقل گردند. بنابراین، مقاومت های چندگانه در یک گونه رخ داده و سپس به دیگر گونه ها منتقل می گردد. از این رو، مقاومت به آنتی بیوتیک ها از طریق انتقال ژن و سازگاری و همچنین از منابع مختلف مانند خاک، گیاهان، حیوانات و انسان نیز می باشد (۲۶).

نتایج نشان داد که MIC آلوئه ورا برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب ۲، ۸، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MIC کیتوزان برای باکتری-های استرپتوکوکوس پیوژنز، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب ۲، ۴، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد MBC آلوئه ورا برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب ۴، ۱۶، ۸ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MBC کیتوزان برای باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب ۲، ۸، ۸ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، بیش‌ترین مقاومت مربوط به باکتری گرم منفی کلبسیلا پنومونیه بود (جدول ۴ و ۵).

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد، به طور کلی آلوئه ورا و کیتوزان در شرایط "in vitro" اثر ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای روی سویه های مورد مطالعه داشت و در ادامه لازم است مطالعات بیش‌تری در شرایط " in vivo" انجام شود تا دوز موثر بر باکتری‌های مورد نظر مشخص گردد و در نهایت بتوان از آلوئه ورا و کیتوزان برای کنترل بیماری عفونی و مسمویت زا استفاده شود و بتوان از آن ها در تهیه آنتی بیوتیک‌های جدید با کم ترین اثر جانبی و عوارض درمانی بهره برد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از خانم مهندس مریم حیدری سورشجانی و خانم مهندس شهناز افشاریان که در فراهم نمودن مواد لازم و انجام آزمایش‌ها ما را یاری کردند، قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1- Kaye KS, Kaye D. Multidrug-resistant pathogens: Mechanisms of resistance and epidemiology. Current Infectious Disease Reports 2005; 2(5): 391-8.

2- Jalal Pour SH, Kasra Kermanshahi R, Nouhi AS, Zarkesh Isfahani H. Comparing the frequency of â-lactamase enzyme in isolated nosocomial infectious bacteria. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 2010; 12(4): 3-10.

3- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR. 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: 597-602.

4- Krokida M, Pappa A, Agalioti M. Effect of drying on Aloe's functional components. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11), Procedia Food Science 2011; 1:1523-27.

5- Alsalvar, C., Shahidi, F. & Quantick, P. Food and health applications of marine nutraceuticals: a Review. Sea food-Quality, Technology and Nutraceutical Applications 2002; 26: 186-9.

6- Vali L, Davies SE, Lai LL, Dave J, Amyes SG. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin- resistant Staphylococcus aureus isolates. Jo Antimicrob Chemother 2008; 61: 524- 32.

7- Falade AG, Ayede AI. Epidemiology, etiology and management of childhood acute community-acquired pneumonia in developing countries-a review. Afr J Med Med Sci 2011; 40(4):293-308.

8- Doyle MP, Beuchat LR, Montville T, edithors. Food microbiology: fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press: 2001; 24-6.

9- Barrick, J. E., Yu, D. S., Yoon, S. H., Jeong, H., Oh, T. K., Schneider, D., Kim, J. F. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. Nature, 2009; 461(7268): 1243-7.

10- Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J Ethnopharmacol 2001; 74(2): 113-23.

11- Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M. Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus "in vitro". Inter Agro Plant Produc 2013; 4(7): 1652-8.

12- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM, Vasiee A. 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.

13- Babayi H, Kolo I, Okogun J.I, Ijah U. J. J. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. Nigerian Society for Experimental Biology 2004; 16(2):106-11.

14- 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. Sci J Microbiol 2013; 2: 15-22.

15- Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Shahidi F, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of *Satureja bachtiarica* extracts aqueous and ethanolic on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Scientific Journal of Biological Sciences 2013; 2: 24-31.

16- Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Koocheki, A., Afsharian, S., & Alizadeh Behbahani, B. Antimicrobial properties of plant extracts of *Thymus vulgaris* L., *Ziziphora tenuior* L. and *Mentha Spicata* L., against important foodborne pathogens in vitro. Sci J Microbiol 2013; 2(2): 23-30.

17- 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.

18- 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.

19- Cao, R., Xue, C. & Liu, Q. Changes in microbial flora of Pacific oysters (Crassostrea gigas) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. International Journal of Food Microbiology 2009; 131: 272–6.

20- Xiao Fang, L., Xiao Qiang, F., Sheng, Y. & Ting Pu, W. Effects of molecularweight and concentration of chitosan on antifungal activity against Aspergillus niger. Iranian Polymer Journal 2010; 17: 843-852.

21- Munoz, A., Moret, S. & Garce, S. Assessment of chitosan for inhibition of Colletotrichum sp. on tomatoes and grapes. Crop Protection 2009; 28: 36–40.

22- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM, Vasiee A. Antimicrobial effect of Carboxy Methyl Cellulose (CMC) containing aqueous and ethanolic *Eucalyptus camaldulensis* L. leaves extract against *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. Journal of Paramedical Sciences 2014; 5(2): 59-69.

23- Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi A. Investigating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on pathogen bacterias *"in vitro"*. Journal of Paramedical Sciences 2014; 5(2): 91-101.

24- Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Antimicrobial effects of *Kelussia odoratissima* extracts against food borne and food spoilage bacteria "*in vitro*". Journal of Paramedical Sciences 2014; 5(2): 115-120.

25- Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Heidari Sureshjani M, Mortazavi A. The In vitro Study of Antimicrobial Effect of Teucrium polium Extract on Infectious Microorganisms. Sci J Hamadan Univ Med Sci 2014; 21 (1):16-24. (Persian).

26- Savas L, Guvel S, Onlen Y, Savas N, Duran N. Nosocomial urinary tract infections: microorganisms, antibiotic sensitivities and risk factors. West Indian Med J 2006; 55 (3): 188-93.