فعالیت آنتی باکتریایی عصاره های قره قات (Ribes rubrum) بر باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، لیستریا اینوکوا و انتروباکتر ائروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی

فریده طباطبایی یزدی*[۱]، بهروز علیزاده بهبهانی[۲]، علیرضا وسیعی[۳]، علی الغونه[۳]

۱ -دانشیار و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲ -دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳ -دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

***نشانی برای مکاتبه:** تلفن ۸۷۶۳۸۴۲ – ۰۵۱۱ و ، ۰۹۱۶۸۷۲۹۶۱۹ ، farideh_tabatabaee@yahoo.com

دریافت مقاله: تیر نود و سه پذیرش برای چاپ: شهریور نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به ابتلای درصد بالایی از جمعیت به بیماری هایی با ماهیت عفونی- میکروبی و اعمال هزینه های فراوان درمانی به ویژه در گروه های پرخطر پیش گیری و کنترل آن بسیار حیاتی است. از طرفی به دلیل اقبال جامعه جهانی و کشورمان به درمان های سنتی و لزوم استخراج دارو از مواد طبیعی و گیاهان داروئی، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر آنتی باکتریال عصاره های متانولی، دی کلرومتانی، آبی و هیدروالکلی قره قات بر تعدادی از باکتری های عامل عفونی در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.*

روش کار: *این مطالعه در سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه فردوسی مشهد به صورت in vitro انجام پذیرفت و اثر ضد میکروبی به همراه حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش Serial Dilution Method و طبق استاندارد NCCLS تعیین گردید.*

یافته‌ها: *غلظت های ۳۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره های قره قات دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی روی باکتری ها داشت. تاثیر عصاره ها با کم شدن غلظت آن ها در دیسک، کم شد. عصاره های الکلی در تمامی غلظت ها به طور معنی دار اثر مهاری روی رشد باکتری های مورد آزمایش داشتند. بیش ترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به باکتری لیستریا اینوکوا و کم ترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی انتروباکتر ائروژینوزا بود.*

نتیجه‌گیری: *روش Serial Dilution نشان داد که عصاره های قره قات دارای اثر بازدارندگی بر تمامی سوش های مورد مطالعه داشت و این اثر برای عصاره متانولی بیشتر از سایر عصاره ها بود.*

واژگان کلیدی: قره قات، غلظت، شرایط آزمایشگاهی، عصاره

مقدمه

در سالیان اخیر به علت بروز مقاومت های دارویی و توانایی میکروارگانیسم ها در ایجاد عفونت های حاد و بیماری‌های مزمن، استفاده از گیاهان دارویی به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی، مورد توجه قرار گرفته است(۱). تنوع گونه های گیاهی و گرایش جامعه جهت استفاده از مواد طبیعی در درمان بیماری ها باعث گردیده است تا غربال گری اسانس ها و عصاره های گیاهی مورد توجه محققین قرار گیرد(۲).

باسیلوس ها باکتری های گرم مثبت، میله ای و اسپورزا هستند که به صورت گسترده در طبیعت پراکنده می باشند. *باسیلوس سرئوس* از جمله باکتری های بیماری‌زا بوده که علاوه بر مسمومیت، عامل فساد نیز می باشد. این باکتری انواع مختلفی توکسین تولید می‌کند که با دو سندرم اسهال زا و استفراغ آور همراه است(۳). *باسیلوس سوبتیلیس* نیز به عنوان یک باکتری بیماری زا، همانند *باسیلوس سرئوس* می‌تواند توکسین مقاوم به حرارتی تولید کند که علایم آن مشابه سندرم استفراغ آور *باسیلوس سرئوس* است. خطر آلودگی و مسمومیت با این باکتری ها بیش تر در مواد غذایی دیده می شود که اجزاء اصلی آن ها را سبزیجات و غلات تشکیل داده و تیمار حرارتی نا کافی روی آن ها اعمال شده باشد(۴

لیستریوزیس، یک بیماری عفونی شدید است که در اثر خوردن مواد غذایی آلوده شده به وسیله *باکتری لیستریا مونوسیتوژنز* ایجاد می گردد و به عنوان یک معضل در سلامت عمومی تشخیص داده شده است. این بیماری به ویژه برای زنان باردار، نوزادان و افرادی که دارای سیستم ایمنی ضعیف دارند را درگیر می کند. از آنجا که باکتری *لیستریا اینوکوا* ویژگی‌های فیزیولوژیکی مشابهی با *باکتری لیستریا مونوسیتوژنز* دارد و تنها تفاوت آن-ها قابلیت بیماری زایی در *باکتری لیستریا مونوسیتوژنز* است، لذا در این پژوهش آزمایشگاهی از *لیستریا اینوکوا* استفاده شد. *انتروباکتر ائروژینوزا* باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که باعث بیماری‌های گوارشی می‌شود(۵).

بی شک نخستین راه مورد استفاده بشر جهت درمان بیماری های عفونی و مزمن، بهره گیری از طبیعت و گیاهان دارویی موجود در هر منطقه می

باشد. با پیش رفت جوامع بشری و کسب تجربه های فراوان انسان در زمینه استفاده از گیاهان دارویی، استفاده از گیاهان دارویی شکل تازه ای به خود گرفت و در قالب علم در آمد(۶). دانشمندان بزرگی نظیر جرجانی، ابوعلی سینا و بقراط در راه معالجه ی بیماران خود از گیاهان طبیعی بهره جسته و مطالعات گسترده ای را در این زمینه به انجام رسانیدند. در ایران نیز دانشمندان برجسته ای نظیر ابن سینا و رازی به کار گیری گیاهان و فرآورده های آن ها را در انجام امور پزشکی مورد توجه قرار دادند که نتایج تحقیقات در این زمینه در کتاب هایی همچون قانون ابوعلی سینا موجود می باشد(۷).

قره قات یا قارا قات (Redcurrant) با نام علمی *Ribes rubrum* میوه‌ای جنگلی است که بومی اروپای غربی و شمال کشورهای ایتالیا، اسپانیا، لهستان و پرتغال است. قره قات در جنگل های منطقه ارسباران نیز به وفور یافت می شود. ارتفاع بوته قره قات ۱تا ۱/۵ متر است و گاهی تا به دو متر نیز می‌رسد. شکوفه‌ها، به علت رنگ زرد مایل به سبز شان تا حدی نامرئی هستند (۸).

مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر آنتی باکتریال عصاره های متانولی، دی کلرومتانی، آبی و هیدروالکلی قره قات بر تعدادی از باکتری های عامل عفونی در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

روش کار

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل حلال های متانول، دی کلرومتان و دی متیل سولفوکساید و تمامی محیط های کشت شامل مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث و کربنات سدیم و اسید کلریدریک ۱٪ از شرکت مرک آلمان تهیه شد. *گیاه تازه قره قات از مناطق استان گرگان، شهرستان علی آباد کتول، جمع آوری شد. تایید جنس و گونه گیاه قره قات در هرباریوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. گیاه قره قات در شرایط مناسب و در سایه خشک گردیده و جهت تهیه عصاره با آسیاب پودر شد.*

گیاه قره قات پس از خشک شدن در سایه، توسط آسیاب برقی مدل Waringپودر شد. مقدار ۱۰۰ گرم از پودر قره قات را به نسبت ۱:۵ با حلال های مورد آزمایش یعنی متانول، دی کلرومتان، آب مقطر، و ترکیب یک به یک آب مقطر و اتانول ۹۶٪ مخلوط شد. مخلوط های حاصل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه بر هم زن مغناطیسی نگهداری شدند. مخلوط های مذکور توسط گاز استریل ۳ لایه ای و قیف صاف گردیدند. برای جدا کردن ناخالصی های موجود در عصاره های مورد نظر، با دور ۳۰۰۰ در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه عمل سانتریفوژ انجام شد. سپس عصاره های صاف شده به دستگاه تقطیر در خلاء برای خارج کردن حلال های مورد نظر منتقل شدند که در نهایت عصاره های غلیظی به دست آمدند. عصاره‌های حاصل با استفاده از فیلترهای میکروبی ۰/۴۵ میکرونی استریل و در میکروتیوب های استریل ۱۵ میلی متری که دور آن ها جهت جلوگیری از رسیدن نور به عصاره ها توسط فویل آلومینیومی پوشیده شده بود تقسیم و تا انجام آزمایشات در یخچال نگهداری شد(۹).

استانداردهای مک فارلند با افزودن حجم خاصی از محلول اسید سولفوریک ۱٪، کلرور باریم ۱/۱۷۵ ٪ برای بدست آوردن سولفات باریم با دانسیته نوری خاص تهیه می شود. برای تهیه محلول ۰/۵ مک فارلند، ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱٪ و ۰/۵ میلی لیتر کلرور باریم ۱/۱۷۵ ٪ به کار برده شد. محلول حاصل در طول موج ۶۲۵ نانومتر جذب معادل ۰/۰۸ - ۰/۱۳ داشت. محلول نیم مک فارلند حاصل کدورتی معادل با یک سوپانسیون باکتریایی معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ ایجاد می کند(۱۰).

سویه های میکروبی شامل *لیستریا اینوکوا* ATTC 33090، *باسیلوس سرئوس* PTCC 1154 ، *باسیلوس سوبتلیس* PTCC 1297 و *انتروباکتر ائروژینوزا* PTCC 1221 از طرف دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی اهدا شد. برای هر آزمون جهت بررسی اثرات ضد میکروبی هر بار کشت تازه تهیه گردید. برای فعال کردن سوش ها، ابتدا طبق دستورالعمل و تحت شرایط استریل سر ویال ها شکسته و محتوی داخل محیط مایع تخلیه شد. سپس در لوله ها با پنبه پوشانده و به مدت 24 ساعتدر 37 درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند تا باکتری ها رشد کرده و کدورت ایجاد کنند. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر با کمک آنس استریل از محیط مایع برداشت کرده و روی محیط جامد کشت داده شد. پلیت ها به صورت وارونه به مدت 24 ساعت دیگر در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا کلنی های لازم ایجاد شوند(۱۱) .

به منظور احیای باکتری های مورد بررسی در این پژوهش ابتدا ۰/۵ سی سی محیط مولر هینتون براث مرک آلمان به آن ها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد و سپس در محیط کشت مولر هینتون آگار مرک آلمان کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس از باکتری های موجود در محیط مولر هینتون براث سوپانسیون باکتریایی معادل استاندارد نیم مک فارلند که در این حالت حاوی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ کلنی بر میلی لیتر می باشد تهیه گردید(۱۲). روش تست اثر ضد باکتریایی براساس روش دیسک دیفیوژن انتخاب شد. برای تهیه سوسپانسیون باکتری از کشت یک شبه ی میکروارگانیسم با غلظت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند استفاده گشت. سپس نمونه باکتری روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و بعد دیسک های کاغذی (قطر ۶ میلی متر) استریل به پلیت های حاوی هر یک از باکتری ها اضافه شدند و به آنها زمان کافی داده شد تا عصاره ها به داخل آگار نفوذ کنند. دیسک حاوی ۱۵µl حلال DMSO به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. پلیت ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوباتور قرار داده شدند. هاله های شفاف عدم رشد در اطراف دیسک ها نشانگر فعالیت ضد باکتریایی عصاره ها می باشد. بعد از گذشت زمان انکوباسیون این هاله های عدم رشد دقیقا اندازه گیری شدند. آزمون بصورت دوتایی و در سه تکرارپذیر انجام شد و هاله های عدم رشد به دقت ثبت گردید(۱۳، ۱۴).

در روش پور پلیت پس از افزودن ۰/۲ گرم از عصاره‌های *قره قات* به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، مخلوط حاصل به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. 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 سوش های *لیستریا اینوکوا* ATTC 33090، *باسیلوس سرئوس* PTCC 1154 ، *باسیلوس سوبتلیس* PTCC 1297 و *انتروباکتر ائروژینوزا* PTCC 1221 بر روی این محیط‌ها کشت داده شد و به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت(۱۵).

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) به روش Serial Dilution Method هشت لوله آزمایشگاهی که با درپوش کتانی بسته شده بودند در دما ی ۱۲۱درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه استریل شدند. برای هر یک از عصاره ها رقت سازی انجام شد. ۲ لوله آزمایشی

استریل نیز به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. لوله کنترل مثبت فقط حاوی محیط کشت مولر هینتون براث و بدون هیچ عصاره ای بود. لوله کنترل منفی حاوی یک میلی لیتر عصاره خالص بود. حجم نهایی هر لوله 2 میلی لیتر بود. ۵ دقیقه پساز تهیه مایع تلقیح اولیه 1 میلی لیتر از آن به لوله های حاوی عصاره در غلظت های مختلف و کنترل مثبت اضافه شد. ۰/۵ میلی لیتر ازکنترل مثبت به ۰/۵ میلی لیتر از مولر هینتون اضافه شد. سریعاً 10 میکرولیتر از این تیوپ بر روی محیط مولر هینتون پخش شد. در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای مدت20-18 ساعت گرمخانه گذاری شد. سایر لوله ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت20-18 ساعت گرمخانه گذاری شدند. بعد از انکوباسیون، لوله ها برای ارزیابی میزان کدورت مورد بررسی قرار گرفتند. کمترین غلظت از عصاره که مانع رشد میکروارگانیسم ها شده بود و کدورت قابل مشاهده نداشت به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) انتخاب شد(۱۶، ۱۷).

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

داده¬های حاصل از تاثیر ۴ سطح متفاوت غلظت قره قات بر میکروارگانیسم¬های مورد بررسی با سه تکرار، به روش تجزیه واریانس یک طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS Ver 16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

یافته ها

عصاره های متانولی، دی کلرو متانی و هیدرو الکلی در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر تمامی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی که شامل *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* و *انتروباکتر ائروژینوزا* کاملا موثر بوده و در این غلظت توانست از رشد باکتری های مذکور جلوگیری نماید. نتایج نشان داد که عصاره آبی قره قات در غلظت مورد بررسی به روش پور پلیت توانست از رشد باکترهای *لیستریا اینوکوا* و *باسیلوس سوبتلیس* جلو گیری کند، اما عصاره آبی قره قات در این غلظت نتوانست از رشد باکتری های باسیلوس سرئوس و *انتروباکتر ائروژینوزا* جلوگیری نماید به طوری که در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر باکتری های فوق روی محیط کشت رشد کردند(جدول ۱).

جدول ۱- اثر ضد میکروبی غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های متانولی، دی کلرومتانی، آبی و هیدروالکلی قره قات به روش پور پلیت بر لیستریا اینوکوا، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس و انتروباکتر ائروژینوزا

میکروارگانیسم	عصاره آبی	عصاره متانولی	عصاره دی کلرومتانی	عصاره هیدروالکلی
لیستریا اینوکوا	+	++	++	+
باسیلوس سرئوس	-	+	+	+
باسیلوس سوبتلیس	+	+	+	+
انتروباکتر ائروژینوزا	-	+	+	+

- علامت (++) نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم بر محیط کشت و وجود فعالیت ضد میکروبی قوی عصاره‌های متانولی و دی کلرومتانی گیاه قره قات می‌باشد.
- علامت (+) نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم بر محیط کشت و وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاه قره قات می‌باشد.
- علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد میکروبی می‌باشد.

غلظت های ۳۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی، دی کلرومتانی، آبی و هیدروالکلی قره قات دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی روی باکتری ها **بود.** تاثیر عصاره ها با کم شدن غلظت آن ها در دیسک، کم شد. عصاره های متانولی، دی کلرومتانی و هیدروالکلی در تمامی غلظت ها به طور معنی دار اثر مهاری روی رشد باکتری های *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* و *انتروباکتر ائروژینوزا* داشتند(جدول ۲). بیش ترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به باکتری *لیستریا اینوکوا* و کم ترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژینوزا* بود. عصاره آبی در مقایسه دو به دو میانگین‌های قطر هاله عدم رشد در مورد عصاره های متانولی، دی کلرومتانی و هیدروالکلی 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 ۵ درصد تعیین شد. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون مشاهده شد هم در مورد عصاره الکلی که شامل متانولی، دی کلرومتانی و هیدروالکلی و هم در مورد عصاره آبی غلظت موثر ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. تفاوت معنی‌دار میانگین قطر تمامی غلظت‌ها روی *لیستریا اینوکوا* و *باسیلوس سوبتلیس* و در غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی *انتروباکتر ائروژینوزا* و *باسیلوس سرئوس* دارای اثر بازدارندگی بود. به جز درغلظت‌های ۲۰ با ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدرو الکلی بر روی *انتروباکتر ائروژینوزا* و غلظت ۳۰ با ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره آبی بر باکتری *باسیلوس سرئوس* در بقیه موارد اختلاف میانگین قطر عدم رشد (به صورت دو به دو) با هم معنی‌دار می‌باشد. در مقایسه دو به دو میان غلظت‌های عصاره‌های متانولی، دی کلرومتانی و هیدروالکلی بر *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* و *انتروباکتر ائروژینوز* نیز هاله بازدارندگی مشاهده شد. عدم رشد غلظت‌های مختلف را می‌توان به میزان استحصال عصاره از گیاه قره قات در رابطه با نوع حلال مرتبط دانست. ولی به طوری کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره‌های متانولی، دی کلرومتانی، آبی و هیدروالکلی گیاه قره قات میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می‌کند(جدول ۲).

حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی برای باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژینوزا* بیش ترین است و بیش ترین مقاومت را در برابر همه عصاره‌های گیاه قره قات نشان داد(جدول ۳ و ۴).

جدول۲- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های متانولی، دی کلرومتانی، آبی و هیدروالکلی قره قات به روش دیسک دیفیوژن بر لیستریا اینوکوا، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس و انتروباکتر ائروژینوزا

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره گیاه قره قات (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
		۱۰	۲۰	۳۰	۴۰
متانولی	*لیستریا اینوکوا*	۱۲/۱۰±۰/۵۲^{a}	۱۴/۲۰±۰/۵۴^{b}	۱۸/۵۰±۰/۲۸^{c}	۲۰/۹۰±۰/۵۰^{d}
متانولی	*باسیلوس سرئوس*	۸/۵۰±۰/۵۲^{a}	۱۱/۸۰±۰/۵۷^{b}	۱۵/۱۰±۰/۵۲^{c}	۱۷/۲۰±۰/۵۴^{d}
متانولی	*باسیلوس سوبتلیس*	۱۱/۱۰±۰/۵۰^{a}	۱۴/۱۰±۰/۴۵^{b}	۱۷/۸۰±۰/۵۴^{c}	۱۹/۷۰±۰/۵۷^{d}
متانولی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	۷/۶۰±۰/۵۰^{a}	۱۰/۱۰±۰/۵۷^{b}	۱۳/۱۰±۰/۵۷^{c}	۱۵/۳۰±۰/۵۰^{d}
دی کلرومتانی	*لیستریا اینوکوا*	۱۰/۰۰±۰/۵۲^{a}	۱۴/۲۰±۰/۵۰^{b}	۱۶/۳۰±۰/۵۰^{c}	۱۸/۲۰±۰/۵۰^{d}
دی کلرومتانی	*باسیلوس سرئوس*	۸/۱۰±۰/۵۲^{a}	۱۱/۲۰±۰/۵۰^{b}	۱۴/۷۰±۰/۵۷^{c}	۱۶/۹۰±۰/۵۰^{d}
دی کلرومتانی	*باسیلوس سوبتلیس*	۹/۰۰±۰/۵۴^{a}	۱۲/۰۰±۰/۴۵^{b}	۱۵/۹۰±۰/۵۷^{c}	۱۸/۰۰±۰/۵۰^{d}
دی کلرومتانی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	۶/۹۰±۰/۵۴^{a}	۹/۲۰±۰/۵۴^{b}	۱۱/۳۰±۰/۵۰^{c}	۱۴/۰۰±۰/۵۰^{d}
آبی	*لیستریا اینوکوا*	۹/۰۰±۰/۵۰^{a}	۱۱/۳۰±۰/۵۰^{b}	۱۳/۵۰±۰/۵۰^{c}	۱۵/۷۰±۰/۵۰^{d}
آبی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	۹/۰۰±۰/۵۷^{a}	۱۰/۳۰±۰/۵۰^{a}
آبی	*باسیلوس سوبتلیس*	۸/۰۰±۰/۵۰^{a}	۱۰/۲۰±۰/۴۵^{b}	۱۳/۱۰±۰/۵۰^{c}	۱۵/۰۰±۰/۴۵^{d}
آبی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	۷/۳۰±۰/۵۴^{a}	۹/۴۰±۰/۵۰^{b}
هیدروالکلی	*لیستریا اینوکوا*	۹/۱۰±۰/۵۲^{a}	۱۲/۲۰±۰/۵۰^{b}	۱۴/۳۰±۰/۵۰^{c}	۱۶/۲۰±۰/۵۰^{d}
هیدروالکلی	*باسیلوس سرئوس*	۸/۰۰±۰/۵۲^{a}	۱۱/۰۰±۰/۵۰^{b}	۱۳/۷۰±۰/۵۷^{c}	۱۶/۰۰±۰/۵۰^{d}
هیدروالکلی	*باسیلوس سوبتلیس*	۸/۲۰±۰/۵۴^{a}	۱۱/۶۰±۰/۴۵^{b}	۱۴/۹۰±۰/۵۷^{c}	۱۷/۱۰±۰/۵۰^{d}
هیدروالکلی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	۶/۵۰±۰/۵۴^{a}	۸/۴۰±۰/۵۴^{b}	۱۱/۸۰±۰/۵۰^{c}	۱۳/۰۰±۰/۵۰^{d}

- علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد باکتری عصاره قره قات می‌باشد.
- حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار ($p\leq$ ۰/۰۵) میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.
- حروف مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار ($p\leq$ ۰/۰۵) میان اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.

جدول۳- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره‌های متانولی، دی کلرومتانی، آبی و هیدروالکلی قره‌قات بر لیستریا اینوکوا، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس و انتروباکتر ائروژینوزا

		غلظت عصاره گیاه قره قات (میلی گرم بر میلی لیتر)								
نوع عصاره	میکروارگانیسم	کنترل	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶
متانولی	*لیستریا اینوکوا*	-	+	+	+	+	+	+	+	+
متانولی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	-	-	+	+	+	+	+
متانولی	*باسیلوس سوبتلیس*	-	-	+	+	+	+	+	+	+
متانولی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	+	+	+	+
دی کلرومتانی	*لیستریا اینوکوا*	-	-	+	+	+	+	+	+	+
دی کلرومتانی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	-	-	-	+	+	+	+
دی کلرومتانی	*باسیلوس سوبتلیس*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
دی کلرومتانی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	+	+	+
آبی	*لیستریا اینوکوا*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
آبی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	-	-	-	+	+	+	+
آبی	*باسیلوس سوبتلیس*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
آبی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	-	+	+
هیدروالکلی	*لیستریا اینوکوا*	-	-	+	+	+	+	+	+	+
هیدروالکلی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	-	-	-	+	+	+	+
هیدروالکلی	*باسیلوس سوبتلیس*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
هیدروالکلی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	+	+	+

+: عدم رشد -: رشد

جدول۴- نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های متانولی، دی کلرومتانی، آبی و هیدروالکلی قره قات بر لیستریا اینوکوا، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس و انتروباکتر ائروژینوزا

		غلظت عصاره گیاه قره قات (میلی گرم بر میلی لیتر)								
نوع عصاره	میکروارگانیسم	کنترل	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶
متانولی	*لیستریا اینوکوا*	-	-	+	+	+	+	+	+	+
متانولی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	-	-	-	+	+	+	+
متانولی	*باسیلوس سوبتلیس*	-	-	+	+	+	+	+	+	+
متانولی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	+	+	+
دی کلرومتانی	*لیستریا اینوکوا*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
دی کلرومتانی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	-	-	-	-	+	+	+
دی کلرومتانی	*باسیلوس سوبتلیس*	-	-	-	-	+	+	+	+	+
دی کلرومتانی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	-	+	+
آبی	*لیستریا اینوکوا*	-	-	-	-	+	+	+	+	+
آبی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	-	-	-	-	+	+	+
آبی	*باسیلوس سوبتلیس*	-	-	-	-	+	+	+	+	+
آبی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	-	-	+
هیدروالکلی	*لیستریا اینوکوا*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
هیدروالکلی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	-	-	-	-	+	+	+
هیدروالکلی	*باسیلوس سوبتلیس*	-	-	-	-	+	+	+	+	+
هیدروالکلی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	-	+	+

+: عدم رشد -: رشد

بحث

مقابله با پدیده مقاومت دارویی در راستای کاهش بروز آن و یا محدود نمودن عوامل میکروبی مقاوم از اهمیت زیادی برخوردار است. مشکلات فروانی که در این رابطه به وجود آمده، انگیزه زیادی را برای جستجو و ارایه ترکیبات ضد میکروبی به ویژه با منشاء گیاهی و طبیعی فراهم آورده است(۱۹). خواص ضد میکروبی گیاهان دارویی از قدیم الایام مورد توجه بوده و پیشینیان بدون اطلاع از وجود میکروارگانیسم های بیماری زا و تنها از طریق تجربه های بالینی از این گیاهان در درمان بیماری های عفونی استفاده می کردند(۲۰). بنابراین با توجه به عوامل ذکر شده در بالا شرکت‌های داروسازی در حال حاضر به دنبال داروهای جایگزین از سایر منابع از جمله گیاهان هستند، زیرا مشخص شده گیاهان دارویی موادی با فعالیت ضد میکروبی تولید می کنند . نتایج این مطالعه حاکی از این بود که عصاره‌های متانولی، دی کلرومتانی، آبی و هیدروالکلی قره قات دارای فعالیت ضد میکروبی قوی علیه میکروب های مورد بررسی در این پژوهش بود، به گونه ای که اثر ضد میکروبی عصاره های متانولی، دی کلرومتانی و هیدروالکلی نسبت به عصاره آبی بیشتر بود. همانگونه که در قسمت نتایج ذکر شد اثر ضد میکروبی عصارها بر روی باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژینوزا* به مراتب کمتر از سایر باکتری ها بود. در مطالعه ای که توسط محمد و همکاران(۲۰۰۵) بر روی فعالیت ضد میکروبی حنا انجام پذیرفت نیز نتایج مشابه ای به دست آمد(۲۱). پانیز و همکاران فعالیت ضد میکروبی ۴ گونه گیاهی بر تعدادی از باکتری های عامل عفونی و بیماری زا را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که نوع حلال به کار رفته بر میزان استخراج عصاره رابطه مستقیمی دارد، به گونه ای که حلال الکلی توانسته بود میزان مواد موثره بیشتری را استخراج کرده و باعث بالا رفتن وزن خشک عصاره شده بودند(۲۲). همچنین نتایج پانیز و همکاران نشان داد که اثر ضد میکروبی

بر روی گونه باکتری های گرم مثبت به مراتب بیشتر از باکتری های گرم منفی می‌باشد(۲۲)، نتایج این پژوهش با یافته های این مطالعه همخوانی داشت. مقایسه دو به دو میانگین‌های قطر هاله عدم رشد در مورد عصاره های متانولی، دی کلرومتانی و هیدروالکلی بر باکتری‌های مورد بررسی نشان داد که در تمامی غلظت‌ها، میانگین قطر عدم رشد اختلاف معنی‌دار دارند. غلظت مؤثر عصاره‌ها 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 عصاره الکلی که شامل متانولی، دی کلرومتانی و هیدروالکلی و هم در مورد عصاره آبی غلظت موثر ۴۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر بود. تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد غلظت‌های مختلف را می-توان به میزان استحصال عصاره از گیاه قره قات در رابطه با نوع حلال مرتبط دانست. ولی به طوری کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره‌های متانولی، دی کلرومتانی، آبی و هیدروالکلی گیاه قره قات میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می‌کند (جدول ۲). دپا و همکاران (۲۰۰۴) فعالیت ضد میکروبی *Salacia beddomei* را بر تعدادی از میکروب هایی بیماری زا مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که *Salacia beddomei* بر باکتری های مورد مطالعه دارای اثر بازدارندگی می باشد و میزان بازدارندگی در مورد باکتری های گرم مثبت بیشتر از باکتری های گرم منفی می باشد(۲۳). علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۲) اثر ضد قارچی عصاره های متانولی و آبی *Avicennia marina* را بر آلترناریا آلترناتا و پنی سیلیوم سیترینوم در شرایط محیط کشت مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره های متانولی و آبی این گیاه بر روی هر دو گونه قارچ بیماری زا دارای فعالیت کشندگی می باشد اما فعالیت ضد قارچی عصاره متانولی بیشتر از عصاره آبی می باشد که با یافته های این مطالعه همخوانی داشت(۲۴).

نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهار کنندگی یا MIC عصاره متانولی گیاه قره قات برای باکتری های *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* و *انتروباکتر ائروژینوز* به ترتیب ۲، ۱۶، ۴ و ۳۲ میلی-گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره های دی کلرومتان و هیدرو الکلی گیاه قره قات برای باکتری های *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* و *انتروباکتر ائروژینوز* به ترتیب ۴، ۳۲ ،۸ و ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره آبی گیاه قره قات برای باکتری های *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* و *انتروباکتر ائروژینوز* به ترتیب ۸، ۳۲ ،۸ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. هبال و همکاران (۲۰۰۵) اثر ضد میکروبی Lawsonia inermis را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس ائروژینوزا* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان که که میزان حداقل غلظت مهار کنندگی در مورد با کتری های مورد مطالعه بسته به حلال می باشد، به طوری که میزان MIC برای عصاره الکلی کمتر از عصاره آبی بدست آمد. همچنین این پژوهشگران بیان داشتند که حداقل غلظت مهار کنندگی در مورد باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* کم‌تر از باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* می باشد که با یافته های این مطالعه همخوانی داشت(۲۵). نتایج نشان داد که حداقل غلظت کشندگی یا MBC عصاره متانولی گیاه قره قات برای باکتری های *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* و *انتروباکتر ائروژینوز* به ترتیب ۴، ۳۲ ،۴ و ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

نتایج نشان می‌دهد MBC عصاره های دی کلرومتان و هیدرو الکلی گیاه قره قات برای باکتری های *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* و *انتروباکتر ائروژینوز* به ترتیب ۸، ۶۴، ۱۶ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و MBC عصاره آبی قره قات برای باکتری های *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* و *انتروباکتر ائروژینوز* به ترتیب ۱۶، ۶۴ ،۱۶ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بنیادیان و همکاران (۲۰۰۲) اثر ضد میکروبی تعدادی از روغن های فرار گیاهی را بر *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که حداقل غلظت کشندگی برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار کم‌تر از باکتری *اشرشیا کلی* می باشد(۲۶). یلمه و همکاران (۱۳۹۳) اثر ضد میکروبی دانه آناتو را بر تعدادی از باکتری های بیماری زا مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که آناتو بر رشد باکتری های بیماری زا موثر است، *باسیلوس سوبتلیس* و *اشرشیا کلی* به ترتیب بیشترین و کم‌ترین حساسیت را به رنگ آناتو نشان دادند. این پژوهشگران بیان داشتند که عصاره آناتو بر باکتری های گرم مثبت مورد آزمون اثر ضد میکروبی بیشتری را نسبت به باکتری های گرم منفی نشان داد. نتایج این پژوهشگران با یافته های این مطالعه همخوانی داشت(۲۷). به طور کلی عصاره های گیاهی می توانند در بخش های مختلف سلول از جمله دیواره سلولی، غشای سیتوپلاسمی و پروتیئن های غشای سیتوپلاسمی ایجاد اختلال کنند. علاوه بر این می توانند باعث منعقد و کوآگوله شدن محتویات سیتوپلاسم و نشت اجزای سیتوپلاسمی شوند و بدین ترتیب از رشد باکتری ها ممانعت نمایند(۲۸).

نتیجه گیری

بررسی فعالیت ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد سرطانی در گیاهان ایران سر منشأ بسیاری از پژوهش ها بوده است و به سرانجام رسیدن این تحقیقات می تواند باعث رشد چشمگیری در صنایع دارویی کشور شود. با توجه به اینکه در حال حاضر، اکثر مواد اولیهٔ دارویی در ایران ساخته نمی شود و نیاز به واردات این کالاها وجود دارد و از طرفی، به علت مقاوم شدن باکتری ها نسبت به داروهای سنتزی شیمیایی، نیاز به بررسی و تولید انواع مواد ضد میکروبی گیاهی منطقی به نظر می رسد. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های متانولی، دی کلرومتانی، آبی و هیدروالکلی قره قات دارای فعالیت ضد میکروبی قوی علیه میکروب های مورد بررسی در این پژوهش بود. لذا می توان با انجام مطالعات بیشتر بر روی اثر ضد میکروبی این گیاه بر روی سوش های بیماری زا دیگر و یافتن و شناسایی ترکیبات موثر در این گیاه در آینده از قره قات به عنوان یک داوری طبیعی در جهت درمان بیماری های عفونی بهره برد.

تقدیر و تشکر

مقاله علمی _ پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۲/۳۰۷۱۳ مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

REFERENCES

1- Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from sentry antimicrobial Surveillance program (Latin America, 2008–2010). Diagnostic microbiology and infectious disease. 2012; 73(4):354-60.

2- Huang W, Cai Y, Hyde K, Corke H, Sun M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. Fungal Divers. 2008; 33(1):61-75.

3- Liu ZY, Chen X, Shi Y, Su ZC. Bacterial degradation of chlorpyrifos by Bacillus cereus. Advanced Materials Research. 2012; 356:676-80.

4- McKenney PT, Driks A, Eichenberger P. The Bacillus subtilis endospore: assembly and functions of the multilayered coat. Nature Reviews Microbiology. 2012; 11(1):33-44.

5- Pochop J, Kacaniova M, Hleba L, Lopasovsky LU, Bobkova A, Zelenakova L, et al. Detection of Listeria monocytogenes in ready-to-eat food by step one real-time polymerase chain reaction. Journal of Environmental Science and Health, Part B. 2012; 47(3):212-6.

6- Rahmatullah M, Azam NK, Khatun Z, Seraj S, Islam F, Rahman A, et al. Medicinal plants used for treatment of diabetes by the Marakh sect of the Garo tribe living in Mymensingh district, Bangladesh. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2012; 9(3):380-5.

7- Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Heidari Sureshjani M. The comparison of antimicrobial effects of Chevil (*Ferulago angulata*) extract with a variety of common therapeutic antibiotics in vitro. Arak Medical University Journal (AMUJ). 2014; 17(84): 35-46.

8- Benvenuti S, Pellati F, Melegari Ma, Bertelli D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes, and Aronia. Journal of Food Science. 2004; 69(3): 164-9.

9- Sharafati Chaleshtori F, Sharafati Chaleshtori R, Momeni M. Comparison of the antimicrobial effects of the ethanolic and aqueous extracts of scrophularia striata on Escherishia coli O157:H7 in vitro. Shahrekord Unive Med Sci J. 2009; 10(4): 32-8.

10- Andrews J. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). Journal of antimicrobial chemotherapy. 2005; 56(1):60-76.

11- Rani P, Khullar N. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi-drug resistant Salmonella typhi. Phytotherapy Research. 2004; 18 (8):670-3.

12- Parekh J, Jadeja D, Chanda S. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. Turk J Biol. 2005; 29: 203-10.

13- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002; 97 (7):1027-31.

14- 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.

15- 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.

16- Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature protocols. 2008; 3 (2):163-75.

17- Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, El Sayed S, et al. Correlation of Oxacillin MIC with mecAGene Carriage in Coagulase-Negative Staphylococci. Journal of clinical microbiology. 2000; 38 (2):752-4.

18- Burnett A, Lalancette N, McFarland K. First report of the peach brown rot fungus Monilinia fructicola resistant to demethylation inhibitor fungicides in New Jersey. Plant Disease. 2010; 94(1):126-9.

19- Kumar VP, Chauhan NS, Padh H, Rajani M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. Journal of ethnopharmacology. 2006; 107(2):182-8.

20- Suffredini I, Sader H, Gonçalves A, Reis A, Gales A, Varella A, et al. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. Brazilian journal of medical and biological research. 2004; 37(3):379-84.

21- Muhammad H, Muhammad S. The use of Lawsonia inermis linn.(henna) in the management of burn wound infections. African journal of biotechnology. 2005; 4(9): 934-937.

22- Panizzi L, Flamini G, Cioni P, Morelli I. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. Journal of ethnopharmacology. 1993; 39(3):167-70.

23- Deepa M, Narmatha Bai V. Antibacterial activity of Salacia beddomei. Fitoterapia. 2004; 75(6):589-91.

24- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. Antifungal effect of aqueous and methanolic *Avicennia marina* leaves extracts on *Alternaria alternata* and *Penicillium citrinum*. J Rafsanjan Univ Med Sci 2014; 12(12): 1015-24. [Persian].

25- Habbal OA, Al-Jabri AA, El-Hag AH, Al-Mahrooqi ZH, Al-Hashmi NA. In-vitro antimicrobial activity of Lawsonia inermis Linn (henna). A pilot study on the Omani henna. Saudi medical journal. 2005; 26(1):69-72.

26- Bonyadian M, Karim G: study of the effect of some volatile oils of herbs (pennyroyal, peppermint, tarragon, caraway seed and Thyme against E.coli and S.aureus in broth media. Journal of Veterinary Research; 2002: March 57(4): 81-83.

27- Yolmeh M, Habibi Najafi MB, Hosseini F, Shahabadi S. Evaluation of antibacterial activity of annatto dye on Streptococcus pyogenes, Escherichia coli, Enterococcus faecalis, and Bacillus subtilis. Sadra Med Sci J 2014; 2(3): 307-314.

28- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils–a review. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46(2):446-75.