اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی (*Falcaria vulgaris*) بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری زا و مقایسه آن با آنتی بیوتیک های رایج درمانی در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه پورحاجی[1]*، سارا نیاستی[1]

۱- دانشجویی دکترا، دانشگاه فردوسی مشهد

***نشانی برای مکاتبه:** pourhajif@yahoo.com ، تلفن ۰۹۱۵۵۱۷۷۹۳۱

دریافت مقاله : خرداد نود و شش پذیرش برای چاپ: مرداد نود و شش

چکیده

سابقه و هدف: گیاه غازیاقی یا پاغازه در استان های غربی کشور به شکل خوراکی و یا به عنوان دارو جهت درمان بیماری زخم معده و تسریع بهبود زخم های پوستی مورد استفاده قرار می گیرد. در سالیان اخیر با افزایش مقاومت سویه های میکروبی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها تلاش برای یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید و طبیعی مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این پژوهش بررسی اثر ضد میکروبی غازیاقی بر تعدادی از باکتری های عفونت زا شامل *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* می‌باشد.

روش کار: از روش خیساندن و حلال های آب و اتانول با نسبت ۱ به ۵ (گیاه به حلال) جهت عمل عصاره گیری استفاده شد. برای تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره غازیاقی از روش های متنوع کیفی و کمی استفاده گردید. جهت تعیین حساسیت سویه های گرم مثبت و گرم منفی از روش پور پلیت و کربی- بوئر استفاده شد. حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) با روش چاهک ۹۶ خانه و استفاده از معرف و روش ماکرودایلوشن براث تعیین گردید. حداقل غلظت کشندگی (MBC) نیز تعیین شد.

یافته‌ها: بیشترین میزان اثر عصاره اتانولی غازیاقی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و در غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد. کمترین قطر هاله عدم رشد در همین غلظت مربوط به باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* بود. MIC عصاره اتانولی برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MBC آن‌ها به ترتیب ۲۵، ۲۵، ۱۰۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. عصاره آبی نسبت به عصاره اتانولی غازیاقی دارای اثر ضد میکروبی کم تری بود.

نتیجه‌گیری: گیاه غازیاقی دارای اثرات ضدمیکروبی مناسبی بود. با توجه به اهمیت موضوع مطالعات تکمیلی برای مشخص شدن ماده موثر گیاه پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: غازیاقی، آنتی بیوتیک، میکروارگانیسم های بیماری زا، عصاره

مقدمه

گیاه غازیاقی یا پاغازه با اسم علمی *Falcaria vulgaris* از جمله گیاهان دارویی و بومی ایران می باشد که به طور سنتی در استان های غربی کشور ایران همانند کرمانشاه مورد استفاده قرا می گیرد. گیاه غازیاقی از تیره چتریان می باشد و اسم محلی این گیاه در کرمانشاه پاغازه می باشد. در طب سنتی از گیاه غازیاقی جهت تسریع و بهبود زخم های پوست مورد استفاده قرار می‌گیرد. تعدادی از پژوهش های انجام شده اثر مثبت استفاده از گیاه غازیاقی جهت بهبود زخم های پوست و زخم معده را نشان می دهداز نظر گیاه شناسی، گیاه غازیاقی گیاهی است دوساله با ساقه ای منشعب و بدون کرک است، چتر این گیاه دارای ۵ تا ۱۵ پرتو با گل‌های سفید رنگ می باشد. در ایران دو گونه علفی از این گیاه شامل *Falcaria vulgaris* و *Falcaria falcariodes* وجود دارد. این گیاه جز گیاه بومی ایران بوده و در مناطق وسیعی از اروپا، آسیا و آفریقا یافت می شود. همچنین در برخی از نقاط در ایران از گیاه غازیاقی به عنوان سبزی مصرف می شود(۴-۱).

هرچند استفاده از داروهای شیمیایی دارای کارایی بالایی جهت کنترل و از بین بردن میکروارگانیسم های بیماری زا می‌باشد، اما از طرف دیگر داروهای شیمیایی دارای اثرات جانبی نامطلوب زیادی می باشد و به ندرت، ماده یا ترکیب خالصی یافت می‌شود که دارای اثر منفی برای مصرف کنندگان نباشد. در مقابل ترکیبات شیمیایی، ترکیبات و ماده مؤثر موجود در گیاهان به ویژه گیاهان دارویی از یک حالت متعادل بیولوژیکی دارا می باشند در نتیجه این ترکیبات در بدن انباشته نمی شود و اثرات جانبی به همراه ندارد. علاوه بر این در دسترس بودن، تمایل مصرف کنندگان و ارزان بودن این ترکیبات طبیعی برتری قابل توجهی نسبت به داروهای شیمیایب را دارا می باشد(۵). گیاهان دارویی دارای طیف ترکیباتی بی‌شمار و زیادی هستند که می توان از آن ها به عنوان منابع ارزشمند جدیدی که دارای فعالیت ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی بهره جست. آمار سازمان بهداشت جهانی نشان می دهد که حدود هشتاد درصد از مردم سرتاسر دنیا برای مراقبت‌های بهداشتی اولیه تمایل به طب سنتی دارند. بر طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی، عنوان گیاه دارویی به گیاهانی اطلاق می گردد که یک یا چند بخش آن حاوی ترکیباتی است که این ترکیبات می‌توانند با اهداف درمانی مورد استفاده قرار گرفته و یا از این ترکیبات به عنوان پیش- ساز داروهای شیمیایی به صورت نیمه سنتزی استفاده شود. با توجه به تعریف سازمان بهداشت جهانی قسمت‌های مختلف گیاهان دارویی شامل برگ، ریشه، ساقه، پوست درخت، گل، میوه و دانه می‌باشد که از آن ها در درمان و کنترل بیماری‌ها استفاده می شود و همچنین این بخش های گیاهان دارویی حاوی ترکیباتی می‌باشند که از لحاظ پزشکی فعال و سودمند می‌باشند(۶ و ۷). باکتری‌ها عمومی‌ترین عامل در ارتباط با مسمومیت‌ها و عفونت‌ها، می‌باشند. *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از میکروارگانیسم‌های مهم بیماری‌زا بوده و پاتوژن مهمی برای انسان به حساب می آید. ظرفیت و توانایی بیماری‌زایی این باکتری به عوامل مختلفی از جمله فاکتور های خارج سلولی، خصوصیات تهاجم و توکسین های تولید شده توسط آن بستگی دارد. طیف وسیعی از بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری، به شکل عفونت و مسمومیت غذایی به دنبال خوردن انتروتوکسین مشاهده می‌شوند. *لیستریا منوسیتوژنز* عامل بیماری لیستریوز است که از بیماری‌های مشترک انسان و حیوان می‌باشد. در بزرگسالان غیر باردار، مننژیت اولیه، انسفالیت، یا سپتی سمی ایجاد می‌کند. تمایل *لیستریا مونوسیتوژنز* به سیستم عصبی مرکزی منجر به بیماری حاد می‌شود که معمولاً میزان کشندگی آن بالاست. با توجه به بیماری زایی بالا باکتری *لیستریا منوسیتوژنز* در این پژوهش از سویه *لیستریا اینوکوا* استفاده شد. *سودوموناس آئروژینوزا* باکتری گرم منفی و یک باکتری فرصت طلب می باشد. *سودوموناس آئروژینوزا* سبب عفونت‌های مجاری ادراری، سیستم تنفسی و ... می باشد. *اشرشیا کلی* باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه بوده و یکی از شایعترین عامل عفونت دستگاه ادراری می باشد(۱۱-۸). هدف از این پژوهش آزمایشگاهی تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی بر تعدادی از باکتری‌های بیماری زا شامل استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا با استفاده از روش های متنوع کیفی و کمی بوده و در انتها اثر ضد میکروبی گیاه غازیاقی با تعدادی از آنتی بوتیک های رایج درمانی در شرایط برون تنی مقایسه گردید.

روش کار

در این پژوهش از دو سویه گرم مثبت (*Staphylococcu aureus* PTCC 1431 و *Listeria innocua* ATCC 33090) و دو سویه گرم منفی (*Escherichia coli* PTCC 1398 و *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1310) جهت تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره های غازیاقی استفاده شد. مواد مصرفی در این پژوهش شامل محیط کشت مولر هینتون آگار، مولر هینتون براث، فیلتر سرنگی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرونی، چاهک یا پلیت های ۹۶ خانه ای، اتانول ۹۶ درصد، اسید سولفوریک، کلروربایریم، دیسک های آنتی بیوتیک ونکومایسین، کانامایسین و آمپی سیلین بود. محیط کشت های مصرفی و حلال های مورد استفاده در این پژوهش همگی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

گیاه غازیاقی از غرب ایران، استان کرمانشاه و در اواخر فصل بهار جمع آوری گردید و بعد از تایید جنس و گونه گیاه جهت انجام مراحل بعدی آزمایش ها، ابتدا یک شست وشوی سطحی انجام پذیرفت سپس گیاه غازیاقی در سایه خشک گردید. بعد از اینکه گیاه غازیاقی در سایه خشک گردید، ابتدا گیاه خشک شده توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر گردید و به دلیل اهمیت اندازه ذرات در مرحله عصاره گیری گیاه پودر شده از الک آزمایشگاهی عبور داده شد تا یکنواختی ذرات حاصل گردد. از روش ماسراسیون (خیساندن) جهت عمل عصاره گیری استفاده شد. در عمل عصاره گیری نسبت گیاه به حلال با نسبت ۱ به ۵ رعایت گردید. در این روش ۵۰ گرم از پودر گیاه غازیاقی با ۲۵۰ میلی لیتر از حلال های آب و اتانول ۹۶ درصد مخلوط شد. جهت هر چه تماس بهتر حلال با گیاه غازیاقی و استخراج هر چه بیشتر مواد فعال موجود در گیاه از دستگاه شیکردار به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط استفاده شد. بعد از طی ۷۲ ساعت ابتدا مخلوط (محلول رویی) به وسیله کاغذ صافی واتمن صاف گردید و ذرات پودر گیاه غازیاقی جدا شدند، جهت شفاف سازی و یکنواختی هر چه بهتر عصاره عمل سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه انجام گردید. بعد از عمل سانتریفوژ عصاره ها، حذف حلال با استفاده از دستگاه روتاری انجام شد. در انتها عصاره‌های تغلیظ شده به طور جداگانه در ظروف شیشه ای استریل که جداره آن با فویل آلومینیوم پوشانده شده بود قرار گرفت و در دمای یخچال(۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند(۱۲)

برای تعیین وزن خشک عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی ابتدا وزن یک پلیت آزمایشگاهی خالی با استفاده از ترازوی دیجتال با دقت ۰/۰۰۱ تعیین شد، در این روش ابتدا ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی و اتانولی غازیاقی درون پلیت‌های جداگانه و در دمای اتاق نگهداری گردید تا کاملا خشک شود. پس از این مدت وزن پلیت حاوی عصاره خشک شده یادداشت و از وزن پلیت خالی کسر گردید، میانگین سه بار تکرار به عنوان وزن خشک و یا درصد استخراج عصاره های آبی و اتانولی غازیاقی در نظر گرفته شد(۱۳). برای تهیه محلول نیم مک فارلند جهت تهیه محلول استاندارد جهت مقایسه با سوسپانسیون میکروبی از محلول اسید سولفوریک ۱ درصد و کلرور باریم ۱/۱۷۵ درصد استفاده شد. در این روش چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه‌گیری جذب در اسپکتروفوتومتر مشخص می‌شود. میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد. استاندارد ۰/۵ مک فارلند کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی حاوی $1/5 \times 10^8$ CFU/ml ایجاد می‌کند(۱۴). جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی، ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش ها، تلقیح از کشت ذخیره به محیط کشت شیب دار مولر هینتون آگار انجام شد. سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر، پس از رشد باکتری بر سطح شیب دار آگار تهیه گردید. سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و تا برابر شدن کدورت محلول با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق گردید (۱۵). در این حالت تعداد سویه های میکروبی جهت ارزیابی آزمون های ضد میکروبی برابر با $1/5 \times 10^8$ CFU/ml بود. جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی از روش های متنوع کیفی و کمی استفاده گردید. روش پورپلیت مطابق با روش کلاهی مرند و همکاران (۱۳۹۵) انجام شد. در این روش پس از افزودن ۲۰۰ میلی گرم از عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، با استفاده از دستگاه شیکر عمل مخلوط شدن به طور کامل انجام شد سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول به ظرف‌های پتری استریل اضافه گشت. سپس یک لوپ از کشت استاندارد میکروبی (معادل استاندارد نیم مک فارلند) حاوی $1/5 \times 10^8$CFU/ml از هر سویه میکروبی بر محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت(۱۶). از روش کربی-بوئر عمدتا برای ارزیابی مقدماتی فعالیت ضد میکروبی عصاره ها یا اسانس های گیاهی قبل از بررسی دقیق استفاده می شود. روش کربی-بوئر یک روش کیفی ارزیابی فعالیت ضد میکروبی می باشد.برای انجام این آزمون ابتدا سوسپانسیون میکروبی استاندارد به روش سطحی در محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده می شود. برای بررسی اثر ضد میکروبی (هاله عدم رشد)، دیسک های کاغذی بلانک (ساخت پادتن طب) با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شدند. دیسک های کاغذی بلانک حاوی غلظت های ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر از هر یک از عصاره های آبی و اتانولی غازیاقی بودند. بعد از تهیه غلظت های مذکور از هر یک از عصاره های آبی و اتانولی غازیاقی جهت از بین بردن هرگونه آلودگی میکروبی از عصاره های تهیه شده قبل از اضافه کردن آن ها به دیسک، عصاره ها با استفاده از فیلتر سرنگی با اندازه قطر ذرات ۰/۴۵ میکرومتر استریل گردید. از دیسک های آنتی بیوتیک های ونکومایسین، کانامایسین و آمپی سیلین جهت مقایسه نیز استفاده گردید. لازم به ذکر می باشد اصول کلی استفاده از دیسک های آنتی بیوتیک همانند استفاده از دیسک های بلانک حاوی عصاره های آبی و اتانولی غازیاقی می باشد. بعد از عمل دیسک گذاری محیط کشت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. بعد از طی این مدت زمان قطر هاله های تشکیل شده در اطراف دیسک ها، به وسیله خط کش اندازه گیری شد(۱۷). جهت حصول اطمینان از هر یک از غلظت های مختلف عصاره ها و آنتی بیوتیک ها این آزمایش برای هر سویه مورد آزمون ۳ بار تکرار شدند. حداقل غلظت بازدارندگی رشد به روش چاهک ۹۶ خانه ای و معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید انجام شد. در این روش ابتدا سریال های رقت معادل ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر (۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰) عصاره های آبی و اتانولی غازیاقی تهیه و ۷۰ میکرو لیتر از هر یک از رقت ها به چاهک های ۹۶ خانه ایی که قبلا حاوی ۷۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک فارلند که معادل با $1/5 \times 10^8$CFU/ml بودند اضافه گردید.همانند روش قبلی عمل انکوباسیون گذاری به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. بعد از طی ۲۴ ساعت ۲۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید[1] ۵ درصد، به عنوان شاخص رنگی رشد میکروبی به هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای افزوده و به مدت نیم ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد عمل انکوبه انجام گردید. در خانه‌هایی که رشد میکروبی اتفاق افتاده باشد، پس از گذشت مدت زمان مذکور رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ایجاد می‌شود. اولین غلظتی که در آن رشد میکروبی روی نداده و رنگ قرمز تشکیل نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی رشد گزارش گردید(۱۸). حداقل غلظت بازدارندگی رشد به روش ماکرودایلوشن براث یا روش رقت لوله ای انجام شد. اصول کلی این روش همانند روش چاهک ۹۶ خانه ای می باشد با این تفاوت که حجم محیط کشت، عصاره و سوسپانسیون میکروبی در مقیاس بیشتری مورد استفاده قرار می گیرد و همچنین جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد از یکسری لوله های آزمایشگاهی دارای غلظت مشخص از عصاره ها استفاده می گردد

و کدورت ناشی از رشد باکتری ها با استفاده از چشم تشخیص داده می شود. از آنجایی که در این روش رشد میکروارگانیسم ها توسط چشم بررسی می شود لذا ضریب خطا در این روش بیشتر می باشد(۱۹).با توجه به نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (چاهک ۹۶ خانه ای و معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید)، از چاهک‌هایی که فاقد رنگ قرمز بودند، ۱۰۰ میکرولیتر بر پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شدند. غلظت‌هایی که فاقد رشد میکروارگانیسم بودند، به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های آبی و اتانولی غازیاقی برای میکروارگانیسم شاخص در نظر گرفته شدند(۱۵).داده های حاصل از تاثیر ۴ سطح متفاوت غلظت (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره های آبی و اتانولی غازیاقی بر میکروارگانیسم های مورد بررسی با سه تکرار، با روش معنی دار بودن در سطح ۵٪ و با مقایسه میانگین (Duncan) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها با کمک نرم افزار SPSS (Version18.0, SPSS Inc., Chicago, USA) انجام پذیرفت.

یافته ها

وزن خشک عصاره اتانولی گیاه غازیاقی ۱۰ درصد بود در حالی که وزن خشک عصاره آبی غازیاقی ۷ درصد بود، مقایسه نتایج وزن خشک عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی نشان می‌دهد که یک تفاوت ۳ درصدی استحصال عصاره در مورد حلال های آبی و اتانولی وجود دارد. از آنجایی که طبق نتایج به دست آمده وزن خشک عصاره اتانولی ۳ درصد بیشتر از از وزن خشک عصاره آبی غازیاقی می باشد، می توان بیان نمود که حلال اتانول به طور موثرتر و بهتری توانسته با اجزا و ترکیبات تشکیل دهنده گیاه غازیاقی وارد واکنش شده و باعث افزایش راندمان و وزن خشک عصاره اتانولی شود. نکته حائز اهمیتی که وجود دارد نوع حلال به کار برده شده جهت استخراج عصاره گیاهان می باشد که یکی از مهم ترین و اساسی ترین عواملی می باشد که در هنگام عصاره گیری باید به آن توجه ویژه ای شود. نتایج آزمون پورپلیت نشان داد(جدول ۱) که در غلظت نهایی عصاره آبی گیاه غازیاقی که ۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود، نتوانست از رشد هیچ کدام از باکتری های مورد بررسی جلوگیری کند و باکتری ها در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار رشد کردند، هر چند لازم به ذکر است که در این غلظت از عصاره آبی گیاه غازیاقی تا حدودی رشد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس کاهش داد (در مقایسه با سایر باکتری ها) اما همچنان این باکتری توانست بر سطح محیط کشت رشد نماید. نتایج آزمون روش تمام ظرف در مورد عصاره اتانولی گیاه غازیاقی نشان داد که در این غلظت هیچ اثر مهاری بر باکتری های گرم منفی اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا ندارد و این دو سویه به طور کامل در مقایسه با نمونه کنترل در سطح محیط کشت رشد کردند، هر چند در این غلظت عصاره اتانولی گیاه غازیاقی بر باکتری های گرم مثبت لیستریا اینوکوا و استافیلوکوکوس اورئوس تا حدودی توانست از رشد آن ها در سطح محیط کشت را کنترل نمایید (مقایسه با نمونه کنترل).

جدول ۱- اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی به روش پورپلیت (تمام ظرف) بر باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا*

میکرو ارگانیسم	عصاره آبی	عصاره اتانولی
استافیلوکوکوس اورئوس	**R**	**I**
لیستریا اینوکوا	**R**	**I**
اشرشیا کلی	**R**	**R**
سودوموناس ائروژینوزا	**R**	**R**

R: Resistant, I: Intermediate

در روش کربی-بوئر بیشترین میزان اثر عصاره اتانولی غازیاقی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و در غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد. کمترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به باکتری گرم منفی سودوموناس *ائروژینوزا* بود. به طور کلی نتایج نشان داد که عصاره اتانولی گیاه غازیاقی دارای اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به عصاره آبی گیاه غازیاقی می باشد(جدول ۲).

جدول۲- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه بر حسب میلی‌متر به روش انتشار در آگار به کمک دیسک (کربی-بوئر)

عصاره	میکروارگانیسم	غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر) ۱۵	۳۰	۴۵	۶۰
آبی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	۸/۳۰±۰/۵۰^{a}	۱۰/۱۰±۰/۵۲^{b}	۱۳/۰۰±۰/۵۴^{c}	۱۵/۸۰±۰/۲۸^{d}
آبی	*لیستریا اینوکوا*	۷/۰۰±۰/۵۲^{a}	۸/۶۰±۰/۵۴^{b}	۹/۲۰±۰/۵۲^{b}	۱۱/۰۰±۰/۵۲^{c}
آبی	*اشرشیا کلی*	-	-	۶/۴۰±۰/۵۲^{a}	۸/۵۰±۰/۵۰^{b}
آبی	*سودوموناس ائروژینوزا*	-	-	-	۷/۲۰±۰/۵۲^{a}
اتانولی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	۹/۲۰±۰/۵۰^{a}	۱۱/۵۰±۰/۵۴^{b}	۱۴/۰۰±۰/۲۸^{c}	۱۷/۳۰±۰/۵۴^{d}
اتانولی	*لیستریا اینوکوا*	۷/۵۰±۰/۳۴^{a}	۹/۴۰±۰/۵۴^{b}	۱۰/۲۰±۰/۲۸^{b}	۱۲/۸۰±۰/۲۸^{c}
اتانولی	*اشرشیا کلی*	۷/۰۰±۰/۵۴^{a}	۸/۱۰±۰/۲۸^{a}	۱۰/۱۰±۰/۵۲^{b}	۱۱/۲۰±۰/۵۰^{b}
اتانولی	*سودوموناس ائروژینوزا*	-	-	۷/۹۰±۰/۵۷^{a}	۹/۶۰±۰/۵۰^{b}

- علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد باکتری عصاره های آبی و اتانولی غازیاقی 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.

در روش رشد به روش چاهک ۹۶ خانه ای و معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید MIC عصاره اتانولی برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب* ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر درحالی که MIC عصاره آبی گیاه غازیاقی برای باکتری-های *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب* ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی رشد به روش رقت لوله ای نشان داد که MIC عصاره اتانولی برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب* ۲۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر درحالی که MIC عصاره آبی گیاه غازیاقی برای باکتری-های *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب* ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. مقایسه بین دو روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی نشان می‌دهد که یک تفاوت بین نتایج وجود دارد، همانگونه که قبلا هم اشاره گردید اختلاف بین این دو روش را می توان به ضریب خطای بالاتر تعیین کدورت به وسیله چشم نسبت داد، زیرا در روش رقت لوله ای برخلاف روش چاهک ۹۶ خانه ای از معرف استفاده نمی‌شود و تعیین رشد یا عدم رشد (کدورت) توسط چشم سنجیده می شود که ضریب خطا در این روش را بالاتر می برد(جدول ۳).

MBC عصاره اتانولی برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب* ۲۵، ۲۵، ۱۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر درحالی که MBC عصاره آبی گیاه غازیاقی برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب* ۵۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود(جدول ۳).

جدول۳- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) به روش چاهک ۹۶ خانه ای و معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های آبی و اتانولی غازیاقی بر باکتری‌های مورد مطالعه

نوع عصاره	میکرو ارگانیسم	MIC	MBC
اتانولی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	۱۲/۵	۲۵
اتانولی	*لیستریا اینوکوا*	۲۵	۲۵
اتانولی	*اشرشیا کلی*	۵۰	۱۰۰
اتانولی	*سودوموناس ائروژینوزا*	۵۰	۱۰۰
آبی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	۲۵	۵۰
آبی	*لیستریا اینوکوا*	۵۰	۵۰
آبی	*اشرشیا کلی*	۱۰۰	۱۰۰
آبی	*سودوموناس ائروژینوزا*	۱۰۰	۲۰۰

بحث

با توجه به مقاومت میکروارگانیسم های عامل عفونت و مسمومیت نسبت به آنتی بیوتیک های رایج درمانی، استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها به عنوان جایگزین با آنتی‌بیوتیک‌های درمانی مطرح می باشند. نتایج بسیاری از پژوهش های سالیان اخیر نشان می دهد که عصاره های برخی از گیاهان دارویی توانایی مهار رشد و کشندگی باکتری های بیماری زا را دارند. با توجه به اهمیت موضوع و اثرات جانبی کم تر استفاده از گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی امروزه از این گیاهان به عنوان عوامل ضدمیکروبی جدید در صنایع مختلفی از جمله پزشکی، داروسازی، صنایع غذایی و غیره می توان بهره جست (۲۰).

با توجه به گسترش بیماری‌های عفونی ناشی از میکروارگانیسم های بیماری زا، شناسایی تعداد بیشتری از گیاهان دارویی و بومی و همچنین خالص‌سازی ترکیبات موثره گیاهان در درمان بیماری‌ها می تواند مفید واقع شود. ترکیبات ضدمیکروبی با منشا گیاهی دارای اثرات درمانی فراوانی می باشند، این گیاهان نه تنها در درمان بیماری‌های عفونی نقش دارند، بلکه به طور همزمان تعداد زیادی از اثرات جانبی را که در اثر استفاده از داروهای شیمیایی و یا آنتی بیوتیک های درمانی ایجاد می شود کاهش می‌دهند (۲۱). در همین راستا، در مطالعه اخیر به بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی (بومی ایران) بر چهار گونه باکتری بیماری زا انسانی مورد بررسی قرار گرفت.

همانگونه که در جدول ۱، آورده شده است نتایج حاصل از روش پور پلیت نشانگر تاثیر کم عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه بود. مقایسه بین نتایج عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی نشان می دهد که در روش پورپلیت اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه غازیاقی به مراتب بیشتر از عصاره آبی می باشد، دلیل این امر را شاید بتوان به تفاوت بین نوع حلال مرتبط دانست زیرا به نظر می رسد حلال اتانول به طور موثرتری با گیاه غازیاقی برهمکنش ایجاد نموده و ترکیبات موثر بیشتری استخراج شده است، که نتایج حاصل از بازده وزن خشک عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی نیز در تایید این مطلب می باشد. به طور کلی میزان درصد استحصال عصاره اتانولی گیاه غازیاقی ۳ درصد از عصاره آبی بیشتر بود. نتایج نشان داد که از لحاظ حساسیت به عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی به روش کربی-بوئر در باکتری های مورد مطالعه اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد وجود دارد. از سویی نتایج این مطالعه بیانگر حساسیت بیشتر سویه های گرم مثبت نسبت به سویه های گرم منفی بود. بیشترین حساسیت در باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و کم‌ترین حساسیت در باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده شد. به نظر می‌رسد که علت مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی به اسانس و عصاره گیاهان دارویی، را می توان به وجود اختلاف ساختمانی و پیچیدگی بیشتر غشا سلولی این باکتری ها در مقایسه با غشای تک لایه ای باکتری‌های گرم مثبت عنوان نمود. باکتری‌های گرم مثبت همانند باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* در دیواره سلولی خود دارای ترکیب موکوپپتید بوده درحالی‌که قسمت اعظم ساختمان دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی همانند *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساکارید است. از سوی دیگر به نظر می‌رسد مقاومت سلول‌های باکتریایی وابسته به سرعت و میزان حل شدن مواد ضد میکروبی (عصاره یا اسانس گیاهان دارویی) در بخش لیپیدی غشاء سلولی میکرروارگانیسم می‌باشد. هرچند این مسئله نمی‌تواند دلیل کافی و محکمی برای بیان اختلاف در حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی باشد، اما می توان اختلاف در هیدروفوبیسیتی سطح غشای سلول نیز به عنوان یک عامل مؤثر پیشنهاد داد (۱۶ و ۲۲). تحقیقات مشابه در مورد اثر ضد میکروبی

عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان دارویی که روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نیز انجام پذیرفته است مطلب فوق را تایید می‌کند.

نتایج نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره های آبی و اتانولی غازیاقی در غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* بود. مقایسه دو به دو میان غلظت‌های عصاره آبی غازیاقی بر باکتری های مورد بررسی در غلظت های مختلف نشان داد به طور کلی اختلاف معنی داری بین غلظت ها وجو دارد و با افزایش غلظت عصاره آبی گیاه غازیاقی قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می کند، اما همانگونه که در جدول ۲، مشخص است بین غلظت های ۳۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره های آبی گیاه غازیاقی بر باکتری گرم مثبت *لیستریا اینوکوا* اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد. نتایج عصاره اتانولی گیاه غازیاقی نشان می دهد که عصاره اتانولی غازیاقی در تمامی غلظت ها بر میکروارگانیسم ها داری اثر بازدارندگی می باشد (به جز غلظت ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر بر باکتری *سودوموناس ائروژینوزا*). به طور کلی مقایسه میانگین داده های حاصل از هاله عدم رشد عصاره اتانولی گیاه غازیاقی نشان داد در غلظت های مورد آزمون به جز غلظت های ۳۰ و ۴۵ میلی گرم بر میلی لیتر باکتری *لیستریا اینوکوا* و همچنین غلظت های ۱۵ و ۳۰ و غلظت ۴۵ و ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر باکتری *اشرشیا کلی* در سایر غلظت ها تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۲).

تاکنون تحقیقات بسیار کمی در مورد اثر ضد میکروبی گیاه غازیاقی انجام شده است. شفقت (۲۰۱۰)، اثر ضد میکروبی و ترکیبات تشکیل دهنده گیاه غازیاقی را مورد بررسی قرار داد و نشان داد که اسانس این گیاه دارای اثر ضد میکروبی می باشد (۲۳). در تحقیقی دیگر مصحفی و همکاران (۱۳۹۳)، اثر ضد میکروبی عصاره های میوه غازیاقی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران بر اساس روش دیسک دیفیوژن نشان داد که، اثر مهاری فراکسیون اتیل استاتی میوه غازیاقی بیشتر از سایر عصاره بود. در بیواتوگرافی این فراکسیون، اثر ضد میکروبی بر باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *کلبسیلاپنومونیه* و *سودوموناس ائروژینوزا* در محدود ۰/۹ ظاهر شد (۲۴). خان احمدی و همکارن (۱۳۸۶)، ترکیبات تشکیل دهنده گیاه غازیاقی با استفاده از کروماتوگرافی گازی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که ترکیب اصلی شناسایی شده در گیاه غازیاقی ترکیبات اسپاتولنول و کارواکرول بودند (۲۵). براساس مطالعه ای که صالحی و همکاران (۲۰۰۴)، بر روی عصاره اتانولی این گیاه انجام دادند مشخص گردید که عصاره اتانولی این گیاه در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بهترین اثر حفاظتی را بر زخم معده موش های آزمایشگاهی دارا می باشد (۴).

میانگین نتایج آنتی بیوتیک های ونکومایسین، کانامایسین و آمپی سیلین بر باکتری های گرم مثبت به ترتیب دارای قطر ۱۹/۲۰، ۲۱/۱۰ و ۲۶/۵۰ میلی متر بود، در حالی که میانگین هاله برای باکتری های گرم منفی به ترتیب دارای قطر ۱۸/۱۰، ۱۹ و ۲۰ بود. مقایسه بین نتایج هاله عدم رشد در روش کربی-بوئر با نتایج آنتی بیوتیک های رایج درمانی نشان داد قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک ها بیشتر از بالاترین غلظت عصاره های آبی و اتانولی گیاه غازیاقی بود. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی نشان داد که عصاره اتانولی گیاه غازیاقی در غلظت های کم تری نسبت به عصاره آبی دارای اثر مهاری و کشندگی می باشد. دلیل این امر را نیز می توان به استحصال بیشتر ترکیبات موثر ضد میکروبی در عصاره اتانولی نسبت داد، تحقیقاتی مشابه ای نیز در این راستا انجام شده است و همگی تایید کننده اثر ضد میکروبی بیشتر عصاره های اتانولی نسبت به عصاره آبی می باشند.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که گیاه غازیاقی دارای فعالیت ضد میکروبی خوبی بر باکتری های بیماری زا داشتو بنابراین می‌توان پیشنهاد داد که از این گیاه در جهت مقابله با بیماری های عفونی استفاده نمود. نتایج نشان داد که باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان حساس ترین باکتری و باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* به عنوان مقاومترین سویه در برابر عصاره های آبی واتانولی گیاه غازیاقی بود. پیشنهاد می‌شود در ادامه، مطالعات وسیع‌تری در زمینه اثر ضد میکروبی سایر عصاره‌های و فراکسیون های مختلف گیاه غازیاقی بر طیف بیشتری از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط برون تنی انجام گیرد. از آنجایی که این گیاه در برخی استان های کشور (کرمانشاه و همدان) دارای مصرف خوراکی می باشد لذا می توان در پژوهش‌های آتی تاثیر این گیاه را بر روی فلور میکروبی مصرف کنندگان در این ناحیه مورد بررسی قرارداد تا شاهد اقدامی شگرف در بهبود بیماری-های مربوط به باکتری‌های بیماری زا انجام گیرد.

REFERENCES

1- Khazaei M, Salehi H. Protective effect of Falcaria vulgaris extract on ethanol induced gastric ulcer in rat. Iranian journal of pharmacology & therapeutics. 2006;5(1):43-6.
2- zhdari, E. Treatment of diseases with traditional method. Mashad, Yas publisher, 4th edition, 1380; 226-9.
3- Mir-Haidar H. Plant knowledge and using plants for prevent and treatment disease. Tehran, Daftare Nashre Farhang Eslami. 1st Ed, 2001; 67-8.
4- Salehi H, Khazaei M, Gh R, Gh B, Izadi B. Microscopical evaluation of protective effect of gazayagi (Falcaria vulgaris) extract on ethanol induced gastric ulcer in rat. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2010:59-61.
5- Khodaei Motlagh M, Kazemi M, Ghasemi HA, Farahani K, Hossein A, Yahyaei M, et al. Antibacterial effect of medicinal plant essence (Thymus vulgaris) on major bacterial mastitis pathogen in vitro. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research. 2014;2(2):286-94.
6- Doughari, J. H. 2012. Phytochemicals: *Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents, Phytochemicals- A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Rao, V., (Ed.), In Tech, Rijeka.
7- Kolahi Marand S, Comparison of antimicrobial compounds extracted from the leaves of artichoke (*Cynara scolymus*) by supercritical fluid and maceration and its effect on the population of microorganisms of food poisoning and infections. MSc Thesis. 2015. Ferdowsi University of Mashhad. [Full Text in Persian].
8- Vasiee A, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi S. Evaluation of the antibacterial activity of coriander (Coriandrum sativum) on a number of pathogenic microorganisms "in vitro". Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2014; 20(71): 59-66. [Full Text in Persian].
9- Jay, J. M., M.Loessner, M., and A.Golden, D. 2000. *Modern Food Microbiology*. 6nd ed. Aspen. Maryland.
10- Banada PP, Guo S, Bayraktar B, Bae E, Rajwa B, Robinson JP, et al. Optical forward-scattering for detection of Listeria monocytogenes and other Listeria species. Biosensors and Bioelectronics. 2007;22(8):1664-71.
11- Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. The antimicrobial effect and interaction between the aqueous and ethanolic extracts of *Plantago major* on *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* "*in vitro".* Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2017; 21(75): 1-8. [Full Text in Persian].
12- Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (Artemisia dracunculus) extract and chemical composition of its essential oil. Journal of Food Measurement and Characterization. 2017:1-17.

13- Vasiee A, Zanganeh H, Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F. The in vitro investigating of Antimicrobial Effect of *Portulaca oleracea* Extract on Infectious Microorganisms. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2014; 19(66): 37-43. [Full Text in Persian].
14- McFarland, J. 1907. Nephelometer; an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of American Medical Association*; 14:1176-1178.
15- Alizadeh Behbahani B, Yazdi FT, Shahidi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Principle component analysis (PCA) for investigation of relationship between population dynamics of microbial pathogenesis, chemical and sensory characteristics in beef slices containing Tarragon essential oil. Microbial Pathogenesis. 2017;105:37-50.
16- Kolahi Marand S, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi S A, Beig Babaei A. Inhibitory and Bactericidal Effects of Artichoke (Cynara scolymus) on Pathogenic Strains and Their Comparison with Antibiotics In Vitro. Qom Univ Med Sci J . 2016; 10 (2) :32-42. [Full Text in Persian].
17- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J.C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4): 493.
18- Mehraban A, Haddad Khodaparast M H, Mehraban Sang Atash M. Evaluation of Inhibitory and Lethal Effects of Aqueous, Ethanolic and Hydroalcoholic Extracts of Aerial Parts of Salvia chorassanica against Some Gram-negative and Gram-positive Bacteria in Vitro. Qom Univ Med Sci J . 2016; 10 (2) :2-11. [Full Text in Persian].
19- Yeganegi M, Comparison methods for the extraction of *Equisetum telmateia* Ehrh. extract using supercritical fluid extraction and Maceration, evaluation of its Antimicrobial activity against food infective and intoxication microorganisms. MSc Thesis. 2016. Ferdowsi University of Mashhad. [Full Text in Persian].
20- Mitscher LA, Drake S, Gollapudi SR, Okwute SK. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. Journal of natural products. 1987;50(6):1025-40.
21- Pirnia M, Edalatian Dovom M R, Tabatabaee Yazdi F, Shahidi F. The Antibacterial Effects of the Aqueous and Ethanolic Extracts of Cordiamyxa L. Fruit on Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli, and Salmonella typhi. Qom Univ Med Sci J . 2015; 9 (4) :39-48. [Full Text in Persian].
22- Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology. 2005;22(4):273-92.
23- Shafaghat A. Free radical scavenging and antibacterial activities, and GC/MS analysis of essential oils from different parts of Falcaria vulgaris from two regions. Natural product communications. 2010;5(6):981-4.
24- Moshafi M, Mehrabani M, Mahdikhani S, Saffari F. Antibacterial Effects of Different Fractions of Extract of *Falcaria vulgaris* Bernh Fruits and Bioautography of Its Effective Fraction. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services. 2015; 36(6): 74-9.
25- KhanAhmadi M, Shahrezaei F. Study on Chemical Constituents of the Essential Oil of Falcaria vulgaris Bernh.. JMP. 2007; 3 (23) :52-57. [Full Text in Persian].