



Scan online to view this article

Evaluation of antibacterial effect of methanolic extract of *Verbascum thapsus* L. Ecotypes in North Khorasan against of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro
Raheleh Ghorbani Moghaddam¹, Ahmad Asgharzadeh^{2,*}, Amir Amani³, Mohammad Reza Hosseinzadeh⁴, Jamal Kasaian³

1. Department of Medicinal Plants, Islamic Azad University, Shirvan, Iran.
2. Department of Horticulture, Islamic Azad University, Shirvan, Iran.
3. Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran.
4. Department of Agriculture, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran.

Abstract

Aim and Background: Wild plants in nature are valuable samples for use in various studies due to their characteristics such as resistance to adverse environmental conditions, resistance to pests and diseases and even having high active ingredients. Today, with the increasing resistance of bacteria to antibiotics, the use of medicinal plants has been welcomed. The present study aimed to investigate the effect of antibacterial effects of different ecotypes of *Verbascum thapsus* extract.

Materials and Methods: *Verbascum thapsus* from three regions of North Khorasan (Ashkhaneh, Bojnourd and Shirvan), after collection and drying, was extracted by methanol solvent by soaking and its antibacterial properties was investigation against (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*) using disk and well diffusion, MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) methods.

Results: The results showed that between different ecotypes of North Khorasan, *Verbascum* extract of Bojnourd region had the most inhibition zone in disk and well diffusion method on *Staphylococcus aureus* bacteria were equal to 12.33 and 14.66 mm, respectively, and for *Bacillus cereus* bacteria were 11.33 and 13.66 mm, respectively. And MIC and MBC of *Verbascum* extract of Bojnourd region on bacteria (*Staphylococcus aureus*) 12. mg/ml were observed as the most sensitive bacteria.

Conclusion: In this study, it was found that among different ecotypes of North Khorasan, methanolic extract of *Verbascum thapsus* of Bojnourd region had the most antibacterial effect on bacteria (*Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*) however the extract was not effective on *Escherichia coli*.

Keywords: *Verbascum*, Antibacterial, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Horticulture, Islamic Azad University, Shirvan, Iran

Email: asg.ahmad@yahoo.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی اکوتیپ‌های گیاه گل ماهور (*Verbascum thapsus L.*) خراسان شمالی علیه باکتری‌های اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی

راحله قربانی مقدم^۱، احمد اصغرزاده^{۲*}، امیر امانی^۳، محمد رضا حسین زاده^۴، جمال کسانیان^۳

۱. گروه گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیروان، ایران

۲. گروه باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیروان، ایران

۳. مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

۴. گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بجنورد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: گیاهان خودرو در طبیعت به دلیل داشتن خصوصیت‌هایی مانند مقاومت به شرایط نامناسب محیطی، مقاومت به آفات و بیماری‌ها و داشتن مواد مؤثره بالا نمونه‌های ارزشمند برای بهره‌گیری در مطالعه‌های مختلف کاربردی هستند امروزه با افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از گیاهان دارویی مورد استقبال قرار گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی اثرهای ضد باکتریایی اکوتیپ‌های مختلف عصاره گیاه گل ماهور انجام گردید.

مواد و روش‌ها: گیاه گل ماهور (*Verbascum thapsus L.*) از سه منطقه خراسان شمالی (آشخانه، بجنورد و شیروان)، پس از جمع‌آوری و خشک نمودن در سایه، توسط حلال متانول به‌روش خیساندن عصاره‌گیری شد و خاصیت ضد باکتریایی (اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس) با استفاده از روش‌های انتشار دیسک، چاهک پلیت، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بین اکوتیپ‌های مختلف خراسان شمالی، عصاره گل ماهور منطقه بجنورد بیش‌ترین هاله عدم رشد در روش دیسک و چاهک بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر با ۱۲/۳۳ و ۱۴/۶۶ میلی‌متر و برای باکتری باسیلوس سرئوس به ترتیب ۱۱/۳۳ و ۱۳/۶۶ میلی‌متر به دست آمد و حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی عصاره گل ماهور منطقه بجنورد بر باکتری (استافیلوکوکوس اورئوس) ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان حساس‌ترین باکتری مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش مشخص شد بین اکوتیپ‌های مختلف خراسان شمالی عصاره متانولی گل ماهور منطقه بجنورد بیش‌ترین اثر ضد باکتری را بر روی باکتری‌های (باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس) داشته ولی بر روی باکتری اشریشیاکلی مؤثر نبوده است.

واژگان کلیدی: گل ماهور، ضد باکتریایی، اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس، Iau Science.

مقدمه

شرایط محیطی و ژنتیک گیاه است. اکوتیپ‌های خودرو در طبیعت به دلیل داشتن خصوصیت‌هایی مانند مقاومت به شرایط نامناسب محیطی، مقاومت به آفات و بیماری‌ها و حتی داشتن مواد مؤثره بالا نمونه‌های ارزشمند برای بهره‌گیری در مطالعه‌های مختلف هستند (۱). گل ماهور یا خرگوشک با نام علمی *Verbascum* گیاه علفی دو ساله است که دارای گل‌های زرد رنگ و برگ‌ها با کرک‌های پنبه‌ای و ساقه ضخیم به ارتفاع

شرایط اقلیمی گوناگون و متنوع ایران موجب پدید آمدن محیط‌های مناسب برای رشد تعداد زیادی از گیاهان دارویی با پراکنش زیاد شده که میزان و تجمع مواد مؤثره تحت تأثیر

نویسنده مسئول:

گروه باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیروان، ایران
پست الکترونیکی: asg.ahmad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۸

اشریشیاکلی^۱ نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. برخی از سروتیپ‌های آن موجب مسمومیت غذایی و اسهال می‌گردند. اشریشیاکلی شایع‌ترین عامل عفونت دستگاه ادراری است. استافیلوکوکوس اورئوس^۲، باکتری گرم مثبت و بی-هوازی اختیاری است که ممکن است به شکل فلور عادی پوست یا بینی وجود داشته باشد. استافیلوکوکوس اورئوس گستره وسیعی از عفونت‌ها، عفونت‌های ساده پوستی تا بیماری‌هایی مانند پنومونی و مننژیت را ایجاد می‌نماید. استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان یکی از ۵ عامل شایع ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است (۱۲،۱۱). باسیلوس سرئوس^۳ نیز به‌عنوان عامل مسمومیت شناخته شده و در خاک، آب و گرد و غبار و مواد غذایی آلوده شده مانند گوشت، شیر، تخم مرغ وجود دارد. با توجه به گستره وسیع بیماری‌زایی این سه باکتری در زندگی روزمره بررسی اثر آنتی‌باکتریال گیاهان دارویی می‌تواند بسیار مؤثر باشد (۱۳).

گیاهان دارویی و مشتق‌های آن‌ها امروزه ۲۰ درصد تجویزهای دارویی در کشورهای صنعتی پیشرفته و ۸۰ درصد از کشورهای در حال توسعه را به خود اختصاص داده است. از آن جایی که گیاهان مفید دارویی در کشور ما فراوان می‌رویند، بررسی اثرهای ضد میکروبی آن‌ها می‌تواند گامی مثبت در شناسایی و استفاده بهینه از این ثروت ملی و با ارزش باشد (۱۴). بسیاری از متابولیت‌های ثانوی و عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت زیستی متفاوت از جمله خواص ضد میکروبی هستند که باعث شده موضوع جایگزینی سموم شیمیایی با مواد طبیعی امن و دوستدار محیط زیست در مجامع علمی دنیا مطرح شود. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی اثرهای ضدباکتریایی اکوتیپ‌های مختلف عصاره متانولی گیاه گل ماهور انجام گردید.

روش بررسی

جمع‌آوری گیاه از رویشگاه

این تحقیق پس از بازدیدهای میدانی زیاد و بر اساس نظر کارشناسان منابع طبیعی، بر اساس حضور گونه در مهم‌ترین رویشگاه‌های گل ماهور انتخاب گردید. اندامهای هوایی گیاه گل ماهور در مرحله گلدهی کامل از رویشگاه طبیعی خود از حوالی شهرستان‌های بجنورد، شیروان و آسخانه واقع در خراسان شمالی جمع‌آوری شد و نمونه‌ها ی تهیه شده، در

حدود ۲ متر است که در زمین‌های بایر، جنگل‌ها و مزارع و در نواحی کوهستانی نیز تا حد ۱۸۰ سانتی‌متری رشد می‌کند (۲). گل ماهور یا خرگوشک در مناطق مختلف ایران به نام‌های علف خرگوش، خرگوشک، گل ماهور و علف ماهور نامیده می‌شود و در کتب سنتی به نام‌های «قلوئس»، «بوصیر» و «آذان‌الدب» آورده شده است (۳). به‌طور کلی گیاهان این جنس را *Molene* و به انگلیسی *Mullen* و *Lungwort* و *Torches* می‌نامند که از خانواده پروانه‌آسا (*Scrophulariaceae*) هستند و متجاوز از ۲۰ گونه آن در ایران در نقاط مختلف می‌رویند، از روزگاران کهن از این گیاهان برای درمان ناراحتی‌های تنفسی استفاده می‌گردید. پزشکان از این گیاه جهت درمان سرفه استفاده می‌کردند و مهاجران اروپایی این گیاه را با خود به آمریکا انتقال داده و از زمان‌های قدیم از این گیاه برای درمان سرماخوردگی، التهاب حلق و گلو، ورم لوزه‌ها، اسهال و بواسیر و عفونت‌های مجاری ادراری استفاده می‌شده است (۳). گل‌های گل ماهور به دلیل داشتن ساپونین، موسیلاژ و فلاونوئیدها خاصیت دارویی دارند و در بیش‌تر دارونامه‌های معتبر از گل‌های این گیاه به‌عنوان دارو یاد شده است این ترکیب‌ها برای مداوای برخی ناراحتی‌های ریوی مانند برونشیت و سیاه سرفه استفاده می‌شوند (۵،۴). اثرهای خلط‌آوری، تسکین‌دهندگی و نرم‌کنندگی گل ماهور به‌وجود ساپونین و موسیلاژ نسبت داده می‌شود، در حالی‌که اثرهای ضدالتهابی، ضد میکروبی و فعالیت مدر آن به دلیل وجود ترکیب‌های فنلی موجود در اندام‌های مختلف آن است (۶). از ترکیب‌های اصلی این گیاه، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، ایریدوئیدها، فنیل اتانوئید گلیکوزید، مونوترپن گلوکوزید، استروئید، اسپرمن آلکالوئید، اسیدفنل، اسید چرب، تانن، کاروتن و غیره را می‌توان نام برد (۷).

امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی برای درمان کمکی عفونت‌های میکروبی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف کرده است. اگرچه تاکنون تعداد زیادی از گیاهان عالی برای یافتن مواد ضد میکروب بررسی شده اند، اما هیچ‌یک از ترکیب‌های ضد میکروب حاصل از آن‌ها قادر به رقابت با آنتی‌بیوتیک‌های رایج نبوده و جست‌وجو برای یافتن عوامل گیاهی ضد میکروب هم‌چنان ادامه دارد (۸). امروزه مسئله مقاومت دارویی و عدم تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها با سرعت زیادی در حال پیشرفت است (۹). یکی از مشکلات کنونی درمان عفونت‌های باکتریایی افزایش مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها است (۱۰).

¹ *Escherichia coli*

² *Staphylococcus aureus*

³ *Bacillus cereus*

هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بجنورد شناسایی و نام علمی آن تأیید گردید.

عصاره‌گیری از گیاه

گیاه مورد مطالعه پس از جمع آوری و خشک کردن در سایه پودر شد و ۱۰۰ گرم از گیاه پودر شده با استفاده از حلال متانول به روش خیساندن به مدت ۴۸ ساعت، استخراج و با استفاده از تبخیر کننده چرخان (روتاری) تغلیظ شده و سپس به مدت ۴۸ ساعت در آون خشک گردید و تا زمان آزمایش در یخچال (+۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید.

تهیه ارگانیسیم‌های مورد آزمایش

در این مطالعه ۲ باکتری گرم مثبت شامل *باسیلوس سرئوس* (PTCC ۱۲۴۷) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۶۵۳۸) و یک باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* (ATCC ۸۷۳۹) از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید و ۱۸-۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش‌ها به صورت کشت تازه بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck, MHA, آلمان) تهیه شدند.

تست‌های ضدباکتریایی

روش دیسک دیفیوژن

آزمایش آنتی‌بیوگرام به روش انتشار دیسک به این صورت انجام شد که دیسک‌های آغشته به عصاره اکوتیپ‌های مختلف گل ماهور با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، دیسک کاغذی (پادتن طب، ایران) حاوی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (سینا دارو، ایران) با غلظت ۰/۳ درصد به‌عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی دی‌متیل سولفوکساید به‌عنوان کنترل منفی به مدت یک ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا خشک گردند و بر روی محیط کشت که پیش‌تر توسط تلقیح میکروبی (*اشریشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) آغشته شده، در فواصل مناسب قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار نگهداری شدند. در ادامه اثر دیسک حاوی عصاره با دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک از لحاظ قطر هاله عدم رشد با خط‌کش بر حسب میلی‌متر مقایسه گردید (۱۵).

روش چاهک پلیت

در این روش از پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار که آغشته به باکتری‌ها (*اشریشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) بودند استفاده گردید. توسط یک پیپت پاستور استریل یک حفره در محیط کشت ایجاد و داخل هر چاهک با سمپلر ۵۰ میکرولیتر از عصاره با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌طور جداگانه اضافه گردید. سپس

پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از آن قطر هاله‌های عدم رشد هر چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس میلی‌متر با خط‌کش محاسبه گردید. از چاهک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین با غلظت ۰/۳ درصد به عنوان کنترل مثبت و دی‌متیل سولفوکساید به‌عنوان کنترل منفی به مقدار ۵۰ میکرولیتر استفاده شد (۱۵).

تعیین میزان اثر مهارکنندگی و بازدارندگی رشد عصاره‌های مختلف

در این روش مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۲۵۶ و ۰/۱۲۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره اکوتیپ‌های (آشخانه، بجنورد و شیروان) و ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی به خانه‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. به‌عنوان کنترل مثبت، در تعدادی از خانه‌های پلیت، ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت اختصاصی، ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و از خانه‌های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و ۲۰ میکرولیتر باکتری به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این مدت به تمام خانه‌های هر پلیت ۵۰ میکرولیتر از معرف تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید اضافه شد و دوباره به مدت ۳ ساعت در گرمخانه قرار داده شد. پس از خروج از گرمخانه، در هر ردیف مربوط به غلظت‌های مختلف یک عصاره، اولین غلظتی که در آن رنگ قرمز تشکیل نشده باشد، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) در نظر گرفته شد (۱۵).

برای به‌دست آوردن مقادیر تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC: Minimum Bactericidal Concentration) از کلیه خانه‌هایی که رنگ قرمز در آن‌ها تشکیل نشده باشد، یک لوپ به پلیت‌های حاوی محیط کشت آگار اختصاصی منتقل شد. اولین غلظتی از عصاره که در پلیت مربوط به آن رشد مشاهده نشده باشد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۵).

آنالیز واریانس داده‌ها

آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید و برای تجزیه واریانس داده‌ها (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت گرفت و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

یافته‌ها

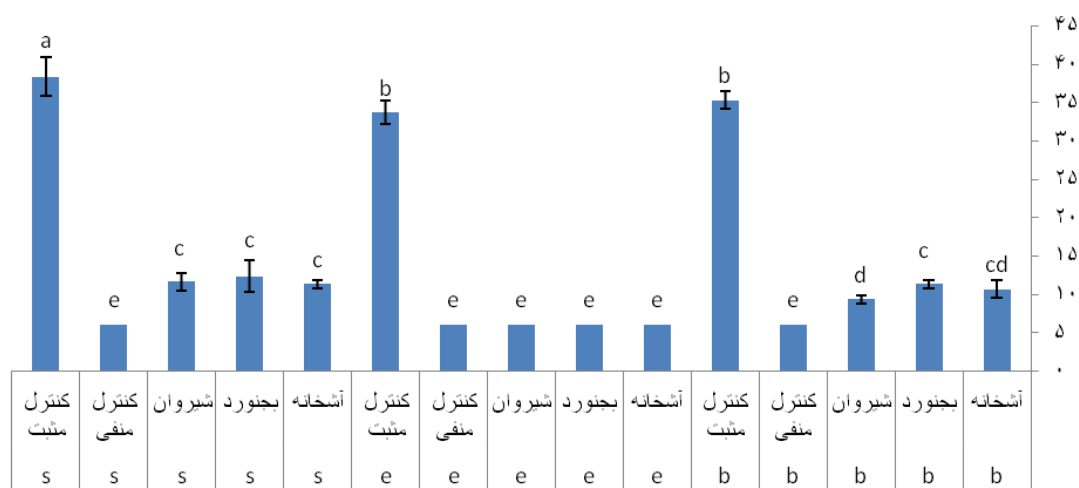
روش انتشار دیسک

اورئوس باز نسبت به باسیلوس سرئوس در هر سه منطقه (آشخانه، بجنورد و شیروان) هاله بیش‌تری نسبت به عصاره‌ها نشان داده که نشان از ضعیف بودن این باکتری و اثر مهارى بالاتر عصاره‌های سه منطقه بر این باکتری است به طوری که عصاره متانولی گل ماهور منطقه بجنورد، بیش‌ترین هاله عدم رشد را به ترتیب بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* برابر با ۱۲/۳ و ۱۱/۳ میلی‌متر و عصاره متانولی گل ماهور منطقه شیروان و آشخانه کم‌ترین هاله عدم رشد را داشته است (جدول ۱).

مقایسه میانگین و انحراف معیار (شکل ۱) نشان داد تفاوت معنی‌داری بین عصاره متانولی گل ماهور اکوتیپ‌های (آشخانه، بجنورد و شیروان) و باکتری‌های (*باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی*) بر قطر هاله عدم رشد در روش دیسک وجود دارد ($p=0/003$). طبق نتایج به‌دست آمده، عصاره گل ماهور سه منطقه (آشخانه، بجنورد و شیروان) بر روی باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* هیچ‌گونه اثر مهارى نداشته و فقط بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) اثر ضدباکتریایی از خود نشان داده است که از بین این دو، باکتری *استافیلوکوکوس*

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد عصاره اکوتیپ‌های مختلف گل ماهور خراسان شمالی به روش دیسک

| قطر هاله عدم رشد (میلی متر) | | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|
| باکتری | عصاره متانولی گل ماهور منطقه آشخانه | عصاره متانولی گل ماهور منطقه بجنورد | عصاره متانولی منطقه شیروان | آنتی بیوتیک سپیروفلوکساسین | دی متیل سولفوکساید |
| استافیلوکوکوس اورئوس | ۱۱/۳±۰/۶ | ۱۲/۳±۰/۱ | ۱۱/۶±۰/۲ | ۳۸/۳±۰/۵ | ۶±۰ |
| باسیلوس سرئوس | ۱۰/۶±۰/۱ | ۱۱/۳±۰/۵ | ۹/۳±۰/۵ | ۳۵/۳±۰/۱ | ۶±۰ |
| اشریشیا کلی | ۶±۰ | ۶±۰ | ۶±۰ | ۳۳/۶±۰/۵ | ۶±۰ |



b- باکتری باسیلوس سرئوس
e- باکتری اشریشیا
s- باکتری استافیلوکوکوس اورئوس
کنترل مثبت: آنتی بیوتیک سپیروفلوکساسین
کنترل منفی: دی متیل سولفوکساید
هاله عدم رشد بر حسب میلی متر است

شکل ۱. مقایسه میانگین خواص آنتی باکتری عصاره اکوتیپ‌های مختلف گل ماهور خراسان شمالی به روش انتشار دیسک در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با یکدیگر ندارند ($p < 0/05$).

در روش چاهک وجود دارد ($p=0/013$). طبق نتایج به‌دست آمده، عصاره گل ماهور سه منطقه (آشخانه، بجنورد و شیروان) بر روی باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* هیچ‌گونه اثر مهارى نداشته و فقط بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) اثر ضدباکتریایی از خود

روش چاهک

مقایسه میانگین و انحراف معیار (شکل ۲) نشان داد تفاوت معنی‌داری بین عصاره متانولی گل ماهور اکوتیپ‌های (آشخانه، بجنورد و شیروان) و باکتری‌های (*باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی*) بر قطر هاله عدم رشد

نشان داده است که از بین این دو، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* باز نسبت به *باسیلوس سرئوس* در هر سه منطقه (آشخانه، بجنورد و شیروان) هاله بیش‌تری نسبت به عصاره‌ها نشان داده که نشان از ضعیف بودن این باکتری و اثر مهاری بالاتر عصاره‌های سه منطقه بر این باکتری است به طوری که عصاره متانولی گل ماهور منطقه بجنورد، بیش‌ترین هاله عدم رشد را به ترتیب بر باکتری‌های (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*) برابر با ۱۴/۶ و ۱۳/۶ میلی‌متر و عصاره متانولی گل ماهور منطقه شیروان و آشخانه کم‌ترین هاله عدم رشد را داشته است (جدول ۲).

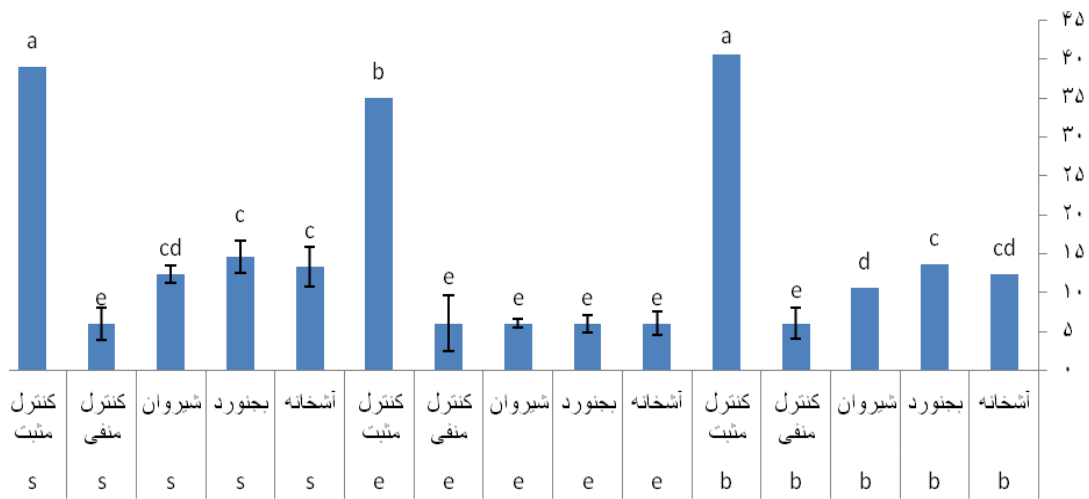
نتایج تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی

مقایسه میانگین و انحراف معیار (شکل ۳) نشان داد تفاوت معنی‌داری بین عصاره متانولی گل ماهور اکوتیپ‌های (آشخانه،

بجنورد و شیروان) در سطح ۵ درصد ($p=0.0268$) و بین باکتری‌های (*باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی*) در سطح ۱ درصد ($p<0.0001$) بر خواص آنتی‌باکتری به روش MIC وجود دارد. نتایج نشان داد بین عصاره متانولی گل ماهور اکوتیپ‌های (آشخانه، بجنورد و شیروان)، عصاره متانولی منطقه بجنورد نسبت به سایر عصاره‌ها در غلظت کم‌تر (۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) توانسته باعث مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت گردد که بر *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثرتر است و مانع ادامه رشد آن در غلظت کم‌تر شده است بعد آن عصاره آشخانه و سپس شیروان همین اثر را از خود نشان دادند. ولی بررسی‌ها نشان داد که سه عصاره در بالاترین غلظت نتوانسته باعث مهار رشد باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* گردد (جدول ۳).

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد عصاره اکوتیپ‌های مختلف گل ماهور خراسان شمالی به روش چاهک پلیت

| قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) | | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|
| باکتری | عصاره متانولی گل ماهور منطقه آشخانه | عصاره متانولی گل ماهور منطقه بجنورد | عصاره متانولی منطقه شیروان | آنتی بیوتیک سپیروفلوکسازین | دی متیل سولفوکساید |
| استافیلوکوکوس اورئوس | ۱۲/۳±۱/۵ | ۱۴/۶±۱/۱ | ۱۲/۳±۰/۶ | ۳۹±۳/۶ | ۶±۰ |
| باسیلوس سرئوس | ۱۲/۳±۲/۵ | ۱۳/۶±۲/۹ | ۱۰/۶±۱/۱ | ۴۰/۶±۲/۹ | ۶±۰ |
| اشریشیاکلی | ۶±۰ | ۶±۰ | ۶±۰ | ۳۵±۲ | ۶±۰ |

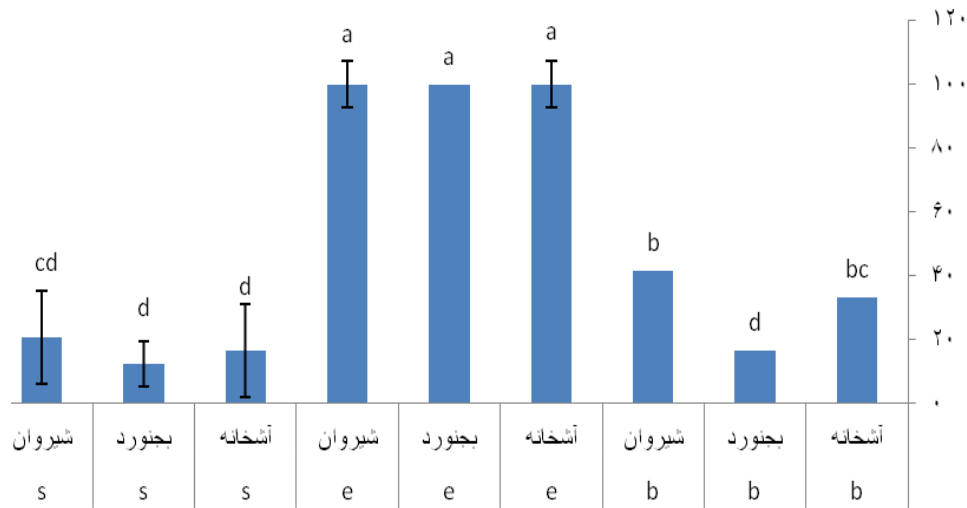


b- باکتری *باسیلوس سرئوس*
 e- باکتری *اشریشیاکلی*
 s- باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*
 کنترل مثبت: آنتی بیوتیک سپیروفلوکسازین
 کنترل منفی: دی متیل سولفوکساید
 هاله عدم رشد بر حسب میلی متر است

شکل ۲. مقایسه میانگین خواص آنتی‌باکتری عصاره اکوتیپ‌های مختلف گل ماهور خراسان شمالی به روش چاهک پلیت در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ یا یکدیگر ندارند ($p<0.05$).

جدول ۳. میانگین و انحراف معیار حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اکوتیپ‌های مختلف گل ماهور خراسان شمالی

| حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی گرم بر میلی لیتر) | | | |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| باکتری | عصاره متانولی گل ماهور منطقه آسخانه | عصاره متانولی گل ماهور منطقه بجنورد | عصاره متانولی منطقه شیروان |
| استافیلوکوکوس اورئوس | ۱۶/۶±۷/۲ | ۱۲/۵±۰ | ۲۰/۸±۲۸/۸ |
| باسیلوس سرئوس | ۳۳/۳±۰ | ۱۶/۶±۰ | ۴۱/۶±۰ |
| اشرشیاکلی | ۱۰۰±۰ | ۱۰۰±۰ | ۱۰۰±۰ |



حداقل غلظت مهارکنندگی بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر است

b-باکتری باسیلوس سرئوس

e-باکتری اشرشیا

s-باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

شکل ۳. مقایسه میانگین خواص آنتی‌باکتری عصاره اکوتیپ‌های مختلف گل ماهور خراسان شمالی روش MIC

در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با یکدیگر ندارند ($p < 0.05$).

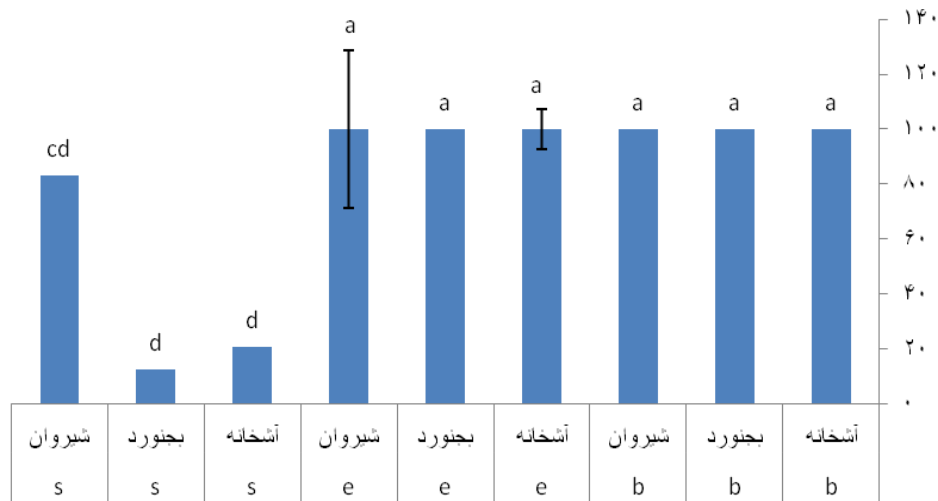
نتایج تعیین حداقل غلظت کشندگی

توانسته فقط بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اثر و باعث حذف این باکتری گردد که باز هم اکوتیپ بجنورد در غلظت کم‌تر (۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مؤثرتر و بعد آسخانه و در انتها شیروان بهتر عمل نمودند. سه عصاره برای کشتن باسیلوس سرئوس و اشریشیاکلی نیاز به غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارند (جدول ۴).

مقایسه میانگین و انحراف معیار (شکل ۴) نشان داد تفاوت معنی‌داری بین عصاره متانولی گل ماهور اکوتیپ‌های (آسخانه، بجنورد و شیروان) و باکتری‌های (باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی) بر خواص آنتی‌باکتری به روش MBC وجود دارد. ($p = < 0.0001$). نتایج نشان داد عصاره متانولی سه منطقه (آسخانه، بجنورد و شیروان)،

جدول ۴. میانگین و انحراف معیار حداقل غلظت کشندگی عصاره اکوتیپ‌های مختلف گل ماهور خراسان شمالی

| حداقل غلظت کشندگی (میلی گرم بر میلی لیتر) | | | |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| باکتری | عصاره متانولی گل ماهور منطقه آسخانه | عصاره متانولی گل ماهور منطقه بجنورد | عصاره متانولی منطقه شیروان |
| استافیلوکوکوس اورئوس | ۲۰/۸±۷/۲ | ۱۲/۵±۰ | ۸۲/۳±۷/۲ |
| باسیلوس سرئوس | ۱۰۰±۱۴/۴ | ۱۰۰±۷/۲۱ | ۱۰۰±۱۴/۴ |
| اشرشیاکلی | ۱۰۰±۰ | ۱۰۰±۰ | ۱۰۰±۰ |



شکل ۴. مقایسه میانگین خواص آنتی‌باکتری عصاره اکوتیپ‌های مختلف گل ماهور خراسان شمالی به روش MBC در هر ستون، میانگین های دارای حداقل یک حرف مشابه، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با یکدیگر ندارند ($p < 0.05$).
 b- باکتری باسیلوس سرئوس
 e- باکتری اشرشیا
 s- باکتری استافیلوکوکوس اورئوس
 حداقل غلظت کشتندگی بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر است

شکل ۴. مقایسه میانگین خواص آنتی‌باکتری عصاره اکوتیپ‌های مختلف گل ماهور خراسان شمالی به روش MBC در هر ستون، میانگین های دارای حداقل یک حرف مشابه، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با یکدیگر ندارند ($p < 0.05$).

بحث

مثبت نشان می‌دهد اما در برابر باکتری‌های گرم منفی، پتانسیل بازدارندگی کمتری دارد (۱۷). که در نتایج ما نیز باکتری گرم منفی مقاومت بیش‌تری نسبت به سایر باکتری‌های گرم مثبت از خود نشان داد.

نتایج مطالعه ما بر روی عصاره متانولی گیاه گل ماهور اکوتیپ‌های (آشخانه، بجنورد و شیروان) مشخص کرد که عصاره متانولی این گیاه اثر ضد باکتری بر روی باکتری‌های (باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس) داشته است. مقایسه نتایج ما نشان داد بین اکوتیپ‌های مختلف، منطقه بجنورد بیش‌ترین هاله عدم رشد را در روش‌های دیسک و چاهک و حداقل غلظت مهارکنندگی و کشتندگی را داشته است.

هم‌چنین Karamian و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر عصاره متانولی گل ماهور گونه‌های *V. sinuatum*, *V. speciosum* و *V. nudicaule* بر باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس را مورد آزمایش قرار دادند که نتایج آن‌ها برای حداقل غلظت بازدارندگی برابر با ۱۴، ۱۱ و ۱۱ mg/ml بوده است (۱۸) که نتایج این محققین با مطالعه‌های ما مطابقت دارد و حداقل غلظت بازدارندگی عصاره متانولی گل ماهور منطقه بجنورد برابر با ۱۶ mg/ml است.

Amirnia و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه‌های خود بر روی خواص ضدباکتری گل ماهور گونه *V. speciosum* بر سه گونه باکتری (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*) گزارش کردند که عصاره آبی و اتانولی این گونه در تمام غلظت‌های اعمال شده خاصیت ضدباکتری نشان می‌دهد و با افزایش غلظت، این خاصیت نیز افزایش می‌یابد (۱۶). نتایج به‌دست آمده از تحقیق ما نیز اثر ضدباکتری گیاه گل ماهور بر گونه *Bacillus cereus* را نشان می‌دهد ولی با اثر ضدباکتری *Escherichia coli* مطابقت ندارد که این اختلاف به‌احتمال ناشی از نوع گونه، مکان جغرافیایی و نوع حلال به‌کار رفته بوده است.

در مطالعه Rozman و همکاران (۲۰۰۹) اثر عصاره رزماری روی گونه‌های مختلف لیستریا را بررسی شد و MIC بین ۶۲۵ تا ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. هم‌چنین در این مطالعه مشخص شد مقاومت لیستریا به عصاره رزماری، به عصاره انتخاب شده، گونه‌های مختلف لیستریا و غلظت‌های مختلف عصاره بستگی دارد (۱۹).

Senatore و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که گونه *V. sinuatum* بیش‌ترین بازدارندگی را در برابر باکتری‌های گرم

نتایج حاصل از مطالعه Pierre Bernat (۲۰۱۸) نشان داد که اسانس گیاه مرزنگوش اثر ممانعت‌کننده قوی بر روی *شریشیاکلای* داشت و اغلب *شریشیاکلای*‌های جدا شده در

متلاشی شدن دیواره سلولی می‌شوند (۳۷) که این نتایج با یافته‌های محققان دیگر نیز مطابقت دارد (۲۳، ۲۹، ۳۸).

نتیجه گیری

نتایج این بررسی نشان داد اکوتیپ‌های مختلف عصاره گل ماهور مناطق (آشخانه، بجنورد و شیروان) و همچنین نوع باکتری در تشکیل هاله عدم رشد، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی تأثیرگذار است که در بین اکوتیپ‌های مختلف، منطقه بجنورد بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد را در باکتری‌های (*باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) و حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی را باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت که می‌تواند به دلیل شرایط اقلیمی، ارتفاع، زمان برداشت و نوع باکتری باشد و از آنجا که اثرهای ضدباکتریایی عصاره گل ماهور در تحقیقات بر روی گونه *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به اثبات رسیده است، بنابراین جمع-آوری سایر اکوتیپ‌های گیاه گل ماهور، روش‌های مختلف عصاره‌گیری، استفاده از حلال‌های قطبی و غیر قطبی، استفاده از عصاره در درمان عفونت‌ها، جهت حفظ و نگهداری مواد غذایی و در داروسازی به‌عنوان عامل درمانی جدید علیه بیماری‌ها و عفونت‌های میکروبی قابل توصیه است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از سازمان منابع طبیعی و آبخیزداری، دانشگاه علوم پزشکی و مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی خراسان شمالی که در جمع‌آوری گیاه و اجرای طرح یاری نمودند کمال سپاس و تشکر را دارم.

رقت ۴۰۰ (چاهک سوم) از بین رفتند. با توجه به این مطالعه و پژوهش‌های قبلی به‌عمل آمده گیاه مرزنگوش به دلیل دارا بودن اجزا ترپنی مثل کارواکرول و تیمول می‌تواند به‌عنوان یک داروی آنتی‌باکتریال در آینده استفاده شود (۲۰).

در سال ۲۰۰۷ در تحقیقی که Fu بر روی اثرهای ضد میکروبی اسانس رزماری انجام داد، مشخص کرد که میزان هاله عدم رشد این اسانس بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱۸ میلی متر و MIC برابر ۰/۱۲۵ است (۲۱).

Kiaei و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر عصاره اتانولی گزنه را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند این گیاه دارای خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است (۲۲).

گیاه گل ماهور حاوی فلاونوئید بوده که بهترین حلال برای استخراج فلاونوئیدها متانول است (۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶). از طرفی، عصاره‌های متانولی علاوه بر فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها، آنتراکینون‌ها، ترپن‌ها را نیز استخراج می‌کنند (۲۸، ۲۹، ۳۰). به نظر می‌رسد که خواص ضد میکروبی عصاره‌های متانولی را می‌توان به‌طور کلی به حضور متابولیت‌های ثانویه به‌خصوص در درجه اول فلاونوئیدها، در درجه دوم ترپن‌ها و در درجه سوم به ساپونین‌ها نسبت داد (۲۹، ۳۰، ۳۱).

در مطالعه ما بین سه باکتری، باکتری *اشریشیاکلی* به‌عنوان قوی‌ترین باکتری (به‌خاطر تفاوت در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و منفی و نفوذپذیری سخت دیواره گرم منفی‌ها به ترکیب‌های خارجی) با کم‌ترین هاله عدم رشد مشاهده شد. همان‌گونه که در قسمت نتایج مشخص گردید عصاره متانولی برگ و گل این گیاه اثرهای قابل توجهی علیه باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* داشته و بر باکتری گرم منفی *اشریشیا* این تأثیر ضعیف‌تر بوده است، لیپو پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی به‌احتمالاً مانع از رسیدن ترکیب‌های فعال اسانس و عصاره به غشای سیتوپلاسمی در باکتری‌های گرم منفی می‌شوند (۲۳، ۲۸، ۳۲). به‌طور کلی فرآورده‌های گیاهی منجر به گرانوله شدن سیتوپلاسم (۳۳)، گسیختگی غشای سیتوپلاسمی (۳۴، ۳۵)، غیرفعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون سلولی و برون سلولی (۳۶) و

1. Omidbaigi R. Production and processing of medicinal plants. Astan Godesa Razavei Pub; 2005.link
2. Zargari A, Medicinal plants, Tehran: Tehran Univ Pub; 1989. Vol.3P.527-8[persian].link
3. Mirhaidar H. Plant sciences, Nashre Farhange Eslami.2005; 418-423 (Persian).
4. Blumenthal, M., Goldberg, A. and Brinckmann, J., 2000. Herbal Medicine: Expanded Commission Emonographs. Integrative Medicine Communications, 519p.link
5. Turker, A.U. and Gurel, E., 2005. Common mullein (*Verbascum thapsus* L.): recent advances in research. Phytotherapy Research, 19: 733-739. DOI:10.1002/ptr.1653
6. Armatu, A., Bodirlau, R., Nechita, C.B., Niculaua, M., Teaca, C.A., Ichim, M. and Spiridon, I., 2011. Characterization of biological active compounds from *Verbascum phlomoides* by chromatography techniques. I. Gas chromatography. Romanian Biotechnological Letters, 16(4): 6297-6304.link
7. Tatli I, Akdemir Z, Chemical constituents of *Verbascum L*, Species, Fabad J Pharm Sci. 2004;29:93-107.link
8. Hamburger M, Hostettmann K. 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochemistry. 1991; 30(12): 3864-3874. doi.org/10.1016/0031-9422(91)83425-K
9. Mcadam AJ, Hooper DC, DeMaria A ,Limbago BM, O'Brien TF, McCaughey B .Antibiotic resistance how serious is the problem and what can be done? Lab Med2013;3:124-7. PMID: 22634378 doi: 10.1373/clinchem.2011.181636.
10. Hanberger H, Walther S, Leone M, Barie PS, Rello J, Lipman J, et al. Increased mortality associated with meticillin resistant *Staphylococcus aureus* infection in the intensive care unit results from the EPIC II study. Int JAntimicrob Age 2011;38:331-5. PMID: 21798720 doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.05.013.
11. Yano Y, Satomi M, Oikawa H. Antimicrobial effect ofspices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. Int J Foo Microbiol. 2006;111(1):6-11.
12. Chaudhry NMA, Tariq P. Anti-microbial activity of *Cinnamomum Cassia* against diverse microbial flora with itsnutritional and medicinal impacts. Pak J Bot. 2006; 38(1):169-74.
13. EBADI M, SRINIVASAN SK, BAXI MD. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease, Progress in neurobiology 1996; 48: 1-19.
14. Sharifi A, Seifi T, Mohammadzadeh A, Hammoun Navard S, Pajohialamoti MR. [Antibacterial activity of alcoholic extract of *ferulagoangolata*]. JIUMS 2015;23:202-8. (Persian).link
15. Zarghami Moghaddam, P., Mohammadi, A., Feyzi, P. and Alesheikh, p. *In vitro* antioxidant and antibacterial activity of various extracts from exocarps and endocarps of walnut , Pak J Pharm Sci. 2017 Sep;30(5):1725-1731. PMID: 29084695
16. Amirnia, R., Khoshnud, H., Alahyay, P., Ghiyasi, M., Tajbakhsh, M. and Valizadegan, O. 2011. Antimicrobial activity of *Verbascum speciosum* against three bacteria strains. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20: 690-693.link
17. Senatore, F., Rigano, D., Formisano, C., Grassia, A., Basile, A. and Sorbo, S., 2007. Phytogrowth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*. *Fitoterapia*, 78:244-247. DOI:10.1016/j.fitote.2006.11.010

18. Karamian, R. and Ghasemlou, F. 2013. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of three *Verbascum* species from Iran. *Medicinal Plants and By- Products*, 2(1): 43-51. DOI: 10.22092/jmpb.2013.108489
19. Rožman T, Jeršek B. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis L.*) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*. 2009;93(1):51-8. DOI:10.2478/v10014-009-0007-z
20. Pierre Bernat (2018). "Steps of preparation of *Origanum vulgare* essential oil and investigation of its antibacterial properties against *Escherichia coli*." *Veterinary Laboratory Research 10* (Special Issue No. 2 of the Twelfth Iranian Veterinary Congress): 218-218.
21. Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, et al. Antimicrobial activity of clove and *rosemary* essential oils alone and in combination. *Phytotherapy research* : PTR.2007;21(10):989-94. PMID: 17562569 DOI: 10.1002/ptr.2179
22. Kiaei A, Mazandarani M, Ghaemi A. Effect of ethanolic extract of 7 species of medicinal plant against isolated bacteria Of Patients with Urinary Tract Infection in Gorgan. 2011; 9(34): 74-83. (Persian).link
23. Duraipandiyar V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Animicrobial Activity of Some Ethnomedicinal Plants Used by Paliyar Tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complement Altern Med* 2006;6:35. doi.org/10.1186/1472-6882-6-35
24. Mary Tolulope O. Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Methanolic Extract of *Hibiscus Sabdariffa*. *J Med Plan Res* 2007;1(1):9-13.link
25. Nazemi A, Hashemi M, Khatamineghad MR, Pourshamsiyan K. The Effect of Antimicrobial of Methanol and Aqueous Extracts on *Heracleum Persicum*. *Islamic Azad Univer of Med Scien J* 2005;15(2):91-94. [Full Text in Persian].link
26. Ojo OO, Ajayi AO, Anibijuwon II. Antibacterial Potency of Methanol Extracts of Lower Plants. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007;8(3):189-191. PMID: 17323431 doi: 10.1631/jzus.2007.B0189
27. Sokmen A, Sokmen M, Daferera D, Polissiou M, Candan F, Unlu M, Akpulat HA. The in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oil and Methanol Extract of *Achillea Biebersteini Afan.* (Asteraceae). *Phytother Res* 2004;18(6):451-6. PMID: 15287068 DOI: 10.1002/ptr.1438
28. Olaleye M. Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Methanolic Extract of *Hibiscus Sabdaviffa*. *J Med Plan Res* 2007;1(1):9-13.link
29. Mothana R, Lindequist U, Geraenert R, Bednarski P. Studies of the in Vitro Anticancer, Antimicrobial and Antioxidant Potentials of Selected Yemeni Medicinial Plants from the Island Soqotra. *BMC Complement Altern Med* 2009;9:7.PMID: 19320966 DOI: 10.1186/1472-6882-9-7
30. Stojanovic G, Radulovic N, Hashimoo T, Palic R. In Vitro Antimicrobial Activity of Extracts of four *Achillea* Species:The Composition of *Achillea Clavennae L.* (Asteraceae) Extract. *J Etnopharmacol* 2005;101(1-3):185-190. PMID: 15978758 DOI: 10.1016/j.jep.2005.04.026
31. Eleyinmi AF. Chemical Composition and Antibacterial of *Gongronema Latifolium*. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007;8(5):352-358. [doi:10.1016/S0308-8146(99)00207-1]
32. Mckeegan KS, Borges Walmsley MI, Walmsley AR. Microbial and Viral Drug Resistance Mechanisms. *Tends Microbiol* 2002;10:85-745. doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02429-0
33. Cox SD, Mann CM, Markam JL. The Mode of Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Melaleuca Alternifolia*(Tea Tree oil). *J Appl Microbiol* 2002;88:770-75. PMID: 10735256 DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x

34. Caccioni DLR, Guizzardi Biondi DM, Renda A, Roberto G. Relationships between Volatile Components of Citrus Fruit Essential Oil and Antimicrobial Action on *Pencillium Digitatum* and *Penicillium Italicum*. *Inter J Food Microbial* 2000;88:770-75. PMID: 9761340 DOI: 10.1016/s0168-1605(98)00099-3
35. Jurven BJ, Kanner J, Sched F, Weisslowics H. Factors that Interact with the Antibacterial of Thyme and Essential Oil and Its Active Constituents. *J Appl Microbiol* 1994;76:626-31. DOI:10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x
36. Brull S, Coote P. Preservative Agents in Foods Mode of Action and Microbial Resistance Mechanisms. *Inter J Food Microbiol* 1999;50:1-17. PMID: 10488839 DOI: 10.1016/s0168-1605(99)00072-0
37. Kraft K, Hobbs C. *Pocket Guide to Herbal Medicine*. New York: Thieme Stuttgart; 2004. p. 61-62.link
38. Komailizadeh H, Hakemivala M, Kamalineghad M, Neshatashofteh S. The Effect of Antimicrobial of *Triticum Sativum Lam*. Chemical and Aqueous Extracts on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *J Med Plan* 2008;4(28):105-111. link