

بررسی اثرات ضدباکتریایی و مروری بر ۱۰ گونه گیاهی علیه سوش‌های بیماری‌زای نوکاردیا

سیدسعید اشراقی^{۱*}، غلامرضا امین^۲، اعظم‌اطاری^۳

۱- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروبی‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۲- استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی

تهران، تهران

۳- دانشجوی دکترای داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران، تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران،
دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی، صندوق‌پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۴۶، تلفن: ۸۸۹۹۴۸۲۳ (۰۲۱)،
نمابر: ۸۸۹۵۴۹۱۳ (۰۲۱)

پست الکترونیک: eshraghs@tums.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۸/۴/۳۱

تاریخ دریافت: ۸۶/۴/۲۵

چکیده

مقدمه: یکی از کاربردهای گیاهان دارویی استفاده آن‌ها به عنوان عوامل ضد میکروبی است. مطالعات انجام شده حاکی از این است که عصاره بسیاری از گیاهان قادر به مهار رشد میکروارگانیسم‌ها است. یکی از باکتری‌های بیماری‌زا نوکاردیا می‌باشد که از خانواده مایکوباکتریوم‌ها بوده و قادر است عفونت‌های مزمن خطرناک به صورت فرصت‌طلب در دستگاه تنفسی، پوست و بافت‌های نرم ایجاد نماید. هدف: بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره تام ده گونه گیاهی شامل: خوشاریزه، اکالپیتوس، فرفیون، هوفاریقون، علف چای زوفانی، علف چای دیهیمی، اُرس، اسپند، بارهنگ کبیر و پی‌زر بر سوش‌های بیماری‌زای نوکاردیا.

روش بررسی: جهت بررسی اثر ضدباکتریایی، ابتدا گیاهان مورد نظر جمع‌آوری و نام علمی آنها تعیین شد و پس از تهیه عصاره متانولی بروش پرکولاسیون، غلظت‌های انتخابی عصاره‌های گیاهی شامل ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۵ درصد یا (g/100mL) تهیه و با استفاده از روش‌های انتشار در آگار، تأثیر آنها در مهار رشد نوکاردیاهای مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی نیز به منظور بررسی وجود کیفی آلکالوئید، تانن، ساپونین و فلاونوئید بر روی عصاره تام گیاهان انجام گرفت.

نتایج: نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که عصاره متانلی حداقل ۵ گیاه مورد مطالعه شامل هوفاریقون، علف چای زوفانی، علف چای دیهیمی (هر سه گونه از تیره علف چای)، اُرس و پی‌زر، تأثیر ضد میکروبی قابل توجهی در جلوگیری از رشد نوکاردیا استروئیدس و نوکاردیا برازیلینسس دارند.

نتیجه‌گیری: اگر چه نتایج به دست آمده از بررسی حاضر، اثرات ضد میکروبی عصاره تام گیاهان مورد مطالعه را نشان می‌دهد، لیکن از میان ۱۰ گونه گیاهی ۵ گونه آنها دارای اثرات مهارکنندگی قابل توجه بر علیه سوش‌های نوکاردیا نشان دادند. با مقایسه هاله عدم رشد عصاره گیاهان مورد مطالعه با غلظت ۱۵ درصد به روش دیسک پلیت و غلظت ۱۰ درصد بروش چاهک پلیت، با هاله عدم رشد دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استاندارد، به این نتیجه می‌رسیم که اثرات مهارکنندگی عصاره تام این گیاهان، مشابه تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، آموکسی‌سیلین، سفنازیدیم، سفتری‌زوکسیم (برای نوکاردیا استروئیدس) و سفوتاکسیم (برای نوکاردیا برازیلینسس)، سفالوتین و کوتریموکسازول بر باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد. با توجه به بررسی نتایج فیتوشیمیایی مقدماتی این گونه‌ها به نظر می‌رسد که اثرات ضدباکتریایی گیاهان دارویی فوق مربوط به وجود مواد مؤثره‌ای مانند فلاونوئید، ساپونین و تانن موجود در عصاره متانلی آنها است.

کل واژگان: گیاهان دارویی، آثار ضدباکتریایی و فیتوشیمیایی، نوکاردیا، فلاونوئید، ساپونین، تانن



مقدمه

مطالعات انجام شده در دنیا حاکی از آن است که عصاره بسیاری از گیاهان توانایی مهار رشد میکروارگانیسم‌ها را دارد و به این لحاظ گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضد میکروبی کاربردهای زیادی پیدا نموده‌اند. از طرفی بازگشت دوباره بیماری‌های عفونی که در گذشته مهار شده بودند مانند سل [۱،۲] و شیوع غیرمنتظره بیماری‌های نقص ایمنی و نیز ویروسی مانند ایدز و هپاتیت C [۳،۴]، مصرف مداوم کورتیکواستروئیدها و بیماری‌های ایمنوساپرسیو [۵-۷]، انواع سرطان‌ها [۸،۹]، انجام عمل پیوند اعضا [۱۰،۱۱] و ارتباط این قبیل بیماری‌ها با ضعف سیستم ایمنی میزبان، توجه محققین را به میکروارگانیسم‌های فرصت طلب معطوف کرده است. از جمله می‌توان به نوکاردیا اشاره کرد که یک باکتری فرصت طلب در این گروه می‌باشد که گزارش‌های متعددی درخصوص ایجاد عفونت سخت ریوی در بیماران نقص ایمنی و افراد آسیب‌پذیر در سراسر جهان منتشر شده است [۱۲-۱۴]. این باکتری رشته‌ای شکل، گرم مثبت، هوازی، نیمه اسید دوست، کاتالاز مثبت و از راسته اکتینومایست می‌باشد که همراه با جنس‌های مایکوباکتریوم، کرینه باکتریوم و رودوکوکوس خانواده نوکاردیافرم را تشکیل می‌دهد [۱۵-۱۲]. در پیتیدوگلیکان دیواره سلولی دارای مزو دی آمینوپایمیلیک اسید و قندهای آرابینوز و گالاکتوز می‌باشد [۱۵،۱۲]. جایگاه اصلی نوکاردیا خاک است ولی در آب، فاضلاب و بقایای آلی گیاهان نیز یافت می‌شود. گونه‌های پاتوژن درگرد و خاک منزل، شن و ماسه ساحل، خاک باغچه و استخرهای شنا وجود دارد بیماری نوکاردیوز ریوی اغلب در اثر استنشاق و ورود آئروسول‌های حامل نوکاردیا استروئیدس به دستگاه تنفسی میزبان مستعد به وجود می‌آید [۱۸-۱۶]. این باکتری شایع‌ترین و خطرناک‌ترین گونه پاتوژن انسانی محسوب می‌شود و عامل اصلی عفونت در جهاز تنفسی است که معمولاً با ایجاد آبسه‌های متاستاتیک موجبات سیستمیک شدن بیماری را فراهم می‌کند [۱۳،۱۱،۵]. ضعف سیستم ایمنی و دفاع آسیب دیده ریه‌ها که در طیف وسیعی از افراد آسیب‌پذیر دیده می‌شود، خطر ابتلاء به نوکاردیوز ریوی را افزایش می‌دهد [۱۹، ۷-۴]. نوکاردیا

برازیلینس و نوکاردیا کاویه نیز از گونه دیگر دخیل در ایجاد عفونت‌های انسانی می‌باشند ولی نیاز به ضعف سیستم ایمنی میزبان نداشته و عفونت اولیه ایجاد می‌نمایند [۲۳-۲۰]. عفونت‌های نوکاردیائی معمولاً با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب و گاهی عمل جراحی، درناژ چرک و حذف بافت‌های نکروزه درمان می‌شوند. استفاده از داروهای شیمیایی مانند سولفانامیدها ... برای درمان بیماران نوکاردیوزی بسیار مؤثر است [۲۵،۲۴].

در یکصد سال گذشته گیاه درمانی به عنوان شاخه‌ای از طب سنتی نقش تعیین کننده در درمان بیماری‌ها ایفا می‌کرد. با پیدایش داروهای شیمیایی و صناعی و جایگزینی آنها با داروهای گیاهی به تدریج نقش این داروها کم رنگ شد و داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها به طور وسیعی در درمان بیماری‌های مختلف کاربرد پیدا کرد. در سال‌های اخیر به دلیل توجه و اقبال مردم دنیا به مصرف داروهای گیاهی به دلیل عوارض جانبی کمتر آن نسبت به داروهای شیمیایی، به نظر می‌رسد تعادل مصرف به نفع داروهای گیاهی در حال رقم خوردن است [۲۶]. تا سال ۱۹۹۶ حدود ۵۰۰/۰۰۰ گونه گیاهی در دنیا شناسایی شده است [۲۷] که از این تعداد کمتر از هزار گونه به عنوان گیاه دارویی نام‌گذاری شده است [۲۸]. گزارش کلارک در سال ۱۹۹۶ تصریح دارد که حدود نیم تا یک سوم از فرآورده‌های دارویی موجود در آمریکا منشأ گیاهی دارند [۲۹]. از طرفی مقاومت دارویی تهدیدی جدی برای سلامتی انسان تلقی می‌شود، ضمن اینکه افراد واجد ضعف ایمنی از آسیب‌پذیری بیشتری برخوردارند. تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که عصاره تعداد زیادی از گیاهان دارویی سنتی اثرات بازدارندگی و گاهی کشندگی کامل بر میکروارگانیسم‌های مختلف دارند [۳۵-۳۰].

در مطالعه حاضر اثرات ضدباکتریایی و فیتوشیمیایی عصاره تام ده گونه گیاهی که هر کدام مصارف آنتی‌باکتریال جالب توجهی تاکنون از خود نشان داده‌اند، بر علیه ۴ سوش نوکاردیای بیماری‌زا بررسی شد. در این بررسی ابتدا روی عصاره تام گیاهان مورد مطالعه آزمایش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی انجام شد تا ارتباط اثرات ضدباکتریایی عصاره‌ها و



متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان روشن شود. برای پی‌بردن به این ارتباط بررسی‌های فیتوشیمیایی مقدماتی به صورت کیفی و با جستجوی متابولیت‌های مهمتری نظیر تانن، آلکالوئید، فلاونوئید و ساپونین انجام گرفت تا در مراحل بعد با فراکشنه کردن عصاره تام مؤثر، جستجوی ترکیبات به صورت ریزتر دنبال شود. همچنین مقایسه اثر ضد میکروبی این گیاهان با آنتی‌بیوتیک‌های رایج بر باکتری‌های فوق بررسی شد. این گیاهان عبارت بودند از: خوشاریزه، اکالیپتوس، فریون، هوفاریقون، علف چای زوفائی، علف چای دیهیمی، اُرس، اسپند، بارهنگ کبیر و پیذر که در ذیل به شرح مختصر آن‌ها می‌پردازیم:

۱- خوشاریزه^۱ گیاهی است علفی دو ساله معطر و پایا، به ارتفاع ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر، با پوششی از کرک‌های کوتاه و خوابیده بر هم و ساقه‌ای سخت و ضخیم. این گیاه در خرداد و تیر به گل می‌نشیند که به صورت سستی به عنوان چاشنی غذایی و برای معطر کردن ماست و پنیر مورد استفاده قرار می‌گرفته است [۳۶، ۳۷]. جنس خوشاریزه (*Echinophora* L.) دارای ۱۰ گونه بوده که پراکندگی آن بیشتر در منطقه مدیترانه می‌باشد. گونه *Echinophora platyloba* به عنوان چاشنی غذایی و معطر مصرف می‌شود و به همراه گونه *Echinophora cinerea* انحصاراً در ایران کشت می‌شود [۳۸]. دو گونه دیگر به نام‌های *E. orientalis* و *E. sibthorpiana* علاوه بر ایران در بسیاری از کشورهای دیگر مثل ارمنستان، ترکمنستان، افغانستان، روسیه و غیره نیز می‌رویند [۳۹، ۴۰].

۲- اکالیپتوس^۲ گیاهی است درختی چند ساله و همیشه سبز که در هوای گرم و مرطوب سازگاری خوبی دارد. این گیاه دارای برگ‌هایی چرمی باریک و نوک تیز که در اثر فشردن بوی بسیار نافذی از آن استشمام می‌شود، می‌باشد. از گونه‌های مهم آن می‌توان به *Eucalyptus globulus*،

۳- فریون^۳ گیاهی است پایا با ساقه‌ای ضخیم از تیره فریون^۳ که از جمله خانواده‌های بزرگ و مهم گیاهان گل‌دار دارویی است که نزدیک به ۳۰۰ جنس و ۸۰۰ گونه از آن در جهان شناخته شده است. جنس فریون که زیر مجموعه این تیره می‌باشد با بیش از ۲۰۰۰ گونه یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های این گیاه در دنیا به شمار می‌رود که در سراسر کره زمین، از مناطق گرمسیری، نیمه‌گرمسیری تا معتدله پراکنده هستند. در ایران بیش از ۸۰ گونه آن شناسایی شده که تعدادی از آن‌ها انحصاری کشورمان و جزو گونه‌های نادر و احیاناً در حال انقراض و تعدادی نیز به صورت مهاجم و علف هرز در سراسر ایران پراکنده هستند [۴۲، ۴۳].

۴، ۵، ۶- علف چای^۴ گیاهی است که بیشتر در نواحی گرم از جمله مناطق مدیترانه‌ای می‌روید. این جنس که از تیره‌ای به نام هایپریریکاسه^۵ منشعب شده، دارای حدود ۴۰۰ گونه مختلف می‌باشد. برخی از گونه‌های این جنس در طب سستی به عنوان داروی ضدافسردگی، ضد درد، ضدکرم، مدر، ضد عفونی‌کننده، التیام‌بخش و ترمیم‌کننده زخم و غیره به کار می‌رفته است [۴۴].

یکی از گونه‌های مهم این جنس هوفاریقون^۶ می‌باشد که به همراه دو گونه دیگر علف چای زوفائی^۷ و علف چای دیهیمی^۸ در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. این گیاه بسیار بادوام بوده و به شکل گسترده‌ای در اروپا، آسیا، آفریقای شمالی، ایالات متحده آمریکا و نیز ایران می‌روید [۴۵] ترکیبات مختلفی از این گونه گزارش شده که فعالیت‌های بیولوژیکی

¹ Myrtaceae

² *Euphorbia denticulata* Lam

³ Euphorbiaceae

⁴ *Hypericum*

⁵ Hypericaceae

⁶ *Hypericum perforatum* L.

⁷ *Hypericum hyssopifolium* Chaix.

⁸ *Hypericum scabrum* L.

¹ *Echinophora platyloba* D.C

² *Eucalyptus globulus* L.



خاصی را به آن نسبت می‌دهند مانند هایپریرسین^۱، سودوهایپریرسین^۲، فلاونوئیدهای مختلف مانند کوئرستین^۳، هایپرین^۴، فلورگلوسینول^۵ و اسانس، که اثرات مختلف ضدافسردگی، ضد میکروبی، آنتی اکسیدان و فعالیت ضد التهابی از آنها گزارش شده است [۴۶].

۷- اُرس یا سرو کوهی^۶ که در اصطلاح محلی «ول» نامیده می‌شود گیاهی است درختی دو پایه از خانواده سرو^۷، یکی از معدود سوزنی برگ‌های بومی شمال ایران و درخت مقاوم و زیبای مناطق جنگلی و کوهستانی به ویژه شمال کشور محسوب می‌شود. ناحیه رویشی این درخت از غرب تا شرق در امتداد دامنه‌های جنوبی رشته کوه‌های البرز و از شمال غربی تا جنوب در امتداد ارتفاعات البرز زاگرس (جاده لوشان، هراز، جاده چالوس در دل سنگ‌ها و صخره‌ها) قابل مشاهده است. زیستگاه اصلی اُرس، مناطق بنه بادام بوده و اکنون در بسیاری مناطق کشور جز درختچه‌هایی پراکنده، چیز دیگری از آن دیده نمی‌شود [۴۷]. صبر و مقاومت در برابر خشکی و سرما، قابلیت رویش در ارتفاعات بیش از سه هزار متری از سطح دریا و سرسبزی از ویژگی‌های این درخت زیبا است که توسعه کاشت آن در ارتفاعات، روند فرسایش خاک را در کشور کاهش می‌دهد. اُرس مقاومت زیادی نسبت به حشرات چوب خوار دارد و رطوبت تأثیری بر روی آن نمی‌گذارد، بوی حاصل از درخت اُرس باعث فرار مار، عقرب و حشرات گزنده می‌شود [۴۸]. در دنیا بیش از ۷۰ گونه اُرس شناخته شده که عمدتاً در کشورهای منطقه بالکان، حجاز، افغانستان، یمن، عمان و ایران گزارش شده است [۴۹، ۵۰]. در کشور ترکیه ۸ گونه اُرس شناخته شده [۵۱، ۵۲]. در کشور ما ۵ گونه از جنس اُرس گزارش شده است که همگی بومی ایران هستند [۵۳].

۸- اسپند با نام علمی *Peganum harmala* L. از تیره Zygophyllaceae گیاهی است علفی به رنگ سبز مایل به

آبی که به عنوان علف هرز مزارع ایران معروف است. این گیاه در بیشتر مناطق آسیا نیز می‌روید. میوه کروی اسفند دارای تعداد زیادی دانه برنگ قهوه‌ای یا سیاه و منشوری شکل بوده و دارای بوی نافذ و طعم بسیار تلخ می‌باشد و به عنوان ضد عفونی کننده مصرف عمومی دارد [۴۱]. در طب سنتی ایران از پودر دانه‌های اسپند در درمان تومورهای جلدی و زیر جلدی استفاده می‌شده است [۴۸].

۹- بارهنگ یا بارهنگ کبیر با نام علمی *Plantago major* L. از تیره Plantaginaceae گیاهی است علفی و پایا با ریشه‌ای کوتاه و مخصوص مناطق پر آب که در بیشتر نقاط ایران رویش دارد. دارای برگ‌های پهن و طوقه‌ای با دمبرگ‌های بلند و گل آذین خوشه‌ای. دانه‌های بارهنگ ریز سیاه رنگ و قایقی شکل و در میوه‌ای پوستینه که به صورت کپسول تخم مرغی بوده قرار دارد. دانه‌های بارهنگ را از اواسط فصل بهار به بعد جمع‌آوری می‌نمایند و چنانچه آنها را در آب قرار دهند به علت داشتن لایه موسیلاژ با جذب آب متورم می‌شوند. دانه‌های بارهنگ ضد اسهال بوده و یکی از اعضای چهار تخمه می‌باشد که به عنوان نرم کننده سینه و برطرف کننده سرفه و خارش گلو مصرف سنتی دارد [۴۱].

۱۰- پیژر با نام علمی *Scirpus lacustris* L. از تیره Cyperaceae گیاهی است پایا به ارتفاع ۱-۲ متر با نی ضخیم رونده با ساقه‌ای محکم با مقطع مدور و در قاعده پوشیده از نیام قهوه‌ای. این گیاه در اردیبهشت و خرداد گل می‌دهد. انتشار جغرافیایی آن در ایران عبارت است از غرب تهران، کرج، اطراف بابل، شرق استان خراسان و غیره [۵۴].

مواد و روش‌ها

۱. مواد مصرفی: مواد شیمیایی، معرف‌ها، محیط‌های کشت آزمایشگاهی و دیسک‌های آنتی بیوتیک از نمایندگی‌های شرکت‌های BBL, Difco, Merck, Sigma در ایران تهیه شد.

^۱ Hypericin
^۳ Quercetin
^۵ Phloroglucinol
^۷ Cupressaceae

^۲ Pseudohypericin
^۴ Hyperin
^۶ *Juniperus excelsa* M. B.



الف- آزمایش وجود آلكالويد از طريق استخراج آب و اسيد عصاره تام و سپس استخراج كلروفرمی از محلول قلیایی شده مرحله قبل و به كارگیری معرف های میو و در ژاندرف صورت گرفت.

ب- آزمایش تشخیص وجود تانن با استفاده از نتایج حاصل از واكنش محلول عصاره تام هر گیاه در مجاورت محلول ژلاتین و نیز تغییر رنگ محلول در مجاورت با معرف كلورفریک انجام شد.

ج- آزمایش تشخیص وجود ساپونین از طریق ثبت ارتفاع كف پایدار عصاره تام گیاه در مجاورت با آب تعیین شد.

د- آزمایش تشخیص وجود فلاونوئید به وسیله قرائت شدت رنگ قرمز تا قرمز پررنگ حاصل از واكنش سیانیدین و استخراج آمیل الكلی واكنش رنگی حاصل صورت گرفت.

هـ. بررسی میکروبیولوژیک: برای مشاهده اثر ضدباکتریایی عصاره تام گیاهان مورد مطالعه از روش انتشار در آگار (قطره پلیت، دیسک پلیت و چاهک پلیت) استفاده شده و آزمایش ها طی مراحل ذیل انجام گرفت [65 - 62].

الف- انتخاب محیط های کشت غنی آزمایشگاهی: سویه های نوکاردیا بر روی محیط های غنی آزمایشگاهی شامل: ژلوز خون دار (Blood A)، ژلوز گلوکز عصاره قارچ (GYEA)، ژلوز عصاره قلب و مغز گوساله (BHIA)، ژلوز سابورو دکستروز (SDA)، ژلوز مولر هیتون (MHA)، ژلوز استارچ کازئین (StCA)، ژلوز پیتون عصاره قارچ (PYEA)، ژلوز پارافین (Paraffin A)، ژلوز بنتس (Bennett's A) کشت داده شد. لازم به ذکر است که باکتری در محیط های کشت فوق به خوبی رشد نمود، لیکن در موارد مقایسه قطر هاله عدم رشد عصاره تام گیاهان مورد آزمایش و دیسک های آنتی بیوتیک استاندارد، از محیط کشت های (GYEA, BHIA, SDA, MHA) که برتری نسبی بر سایر محیط های کشت نشان دادند، استفاده شد. یک لیتر محیط کشت GYEA حاوی ۱۰۰ گرم گلوکز، ۱۵ گرم آگار (Oxoid) و ۲۰ میلی لیتر از محلول ۵۰ درصد عصاره قارچ و با اسیدیته نهایی ۷/۲-۷ می باشد.

۲. سویه های باکتریایی: در این بررسی از دو سوش نوکاردیا استروئیدس^۱ جدا شده از دو بیمار مختلف که هر دو آنها دچار نقص ایمنی بوده و مبتلا به نوکاردیوز ریوی شده بودند و نیز دو سوش نوکاردیا برازیلینسس^۲ جدا شده از دو بیمار مختلف که هیچ یک از آنها دچار نقص ایمنی نبوده و هر دو مبتلا به اکتینومایستوما پیشرفته بودند و در بانک میکروبی بخش باکتری شناسی دانشکده بهداشت نگهداری می شود، استفاده شد.

گونه های گیاهی: ۱۰ گونه گیاهی فوق الذکر که همگی در طب سنتی برای درمان ناراحتی های تنفسی و عفونت های مختلف کاربرد داشتند، مورد استفاده قرار گرفتند. این گیاهان از نقاط مختلف کشور به دقت جمع آوری و نام علمی آنها در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران تعیین شد. گیاهان جمع آوری شده پس از تمیز و خشک کردن، توسط آسیاب پودر شده و در ظروف در بسته و به دور از نور و حرارت نگهداری شدند.

۳. تهیه عصاره تام و غلظت های لازم: مقدار ۱۰۰ گرم از پودر هر یک از ۱۰ گونه گیاهی فوق الذکر جداگانه توزین و عصاره گیری با متانل و به روش پرکولاسیون انجام شد [۵۵]. عصاره های به دست آمده پس از تغلیظ توسط دستگاه تقطیر (دمای دستگاه روتاری بین ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد تنظیم شده بود) در خلاء در ظروف شیشه ای رنگی تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. غلظت های انتخابی عصاره های گیاهی شامل ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۵ درصد (w/v) یا (g/100mL) به ترتیب با افزودن ۰/۰۵، ۰/۱۰، ۰/۱۵، ۰/۲۰ و ۰/۳۰ گرم از عصاره تام تغلیظ شده فوق که توسط دستگاه تقطیر در خلاء آماده شده بود، به ۲ میلی لیتر متانل ۸۰ درصد تهیه شد.

۴. بررسی فیتوشیمیایی مقدماتی: برای انجام این آزمایش ها مقدار معینی از عصاره خشک گیاهان مورد مطالعه به منظور بررسی وجود کیفی آلكالويد، تانن، ساپونین، فلاونوئید به شرح ذیل به کار گرفته شد [۶۱ - ۵۶]:

¹ *Nocardia asteroides*

² *Nocardia brasiliensis*



ب- تعیین هویت و کنترل مجدد سویه‌های نوکاردیا: برای حصول اطمینان از خالص بودن باکتری‌های مورد مطالعه تمامی آنها مجدداً در محیط‌های اختصاصی کشت داده شد و با استفاده از سوبستراهای زانتین، هیپوزانتین، تیروزین و کازئین مورد شناسایی مجدد قرار گرفتند [۶۳، ۶۶].

ج- بررسی اثرات ضدباکتریایی گیاهان مورد مطالعه: با استفاده از روش انتشار در آگار عصاره تام گیاهی مورد آزمایش روی محیط کشت جامد که با ضخامت یکنواخت و اسیدیته (pH) تقریباً ثابت تهیه شده بود، قرار داده شد [۶۵، ۶۶]. نتایج پس از گرمخانه‌گذاری در دمای مناسب به صورت هاله عدم رشد نمایان شد و قطر هاله عدم رشد مشاهده و با کولیس اندازه‌گیری شد. قطر هاله‌ها عکس‌العملی از غلظت ماده موثره ماده مورد آزمایش می‌باشد. این پدیده یک ارتباط خطی بین اندازه هاله و لگاریتم غلظت ماده مورد آزمایش می‌باشد که با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه آن با استاندارد مشخص، قدرت ضد میکروبی ماده مورد آزمایش معین می‌شود [۶۷]. از بین روش‌های انتشار در آگار سه روش قطره پلیت^۱، چاهک پلیت^۲ و دیسک پلیت^۳ مورد استفاده قرار گرفت. اثر مهارکنندگی عصاره‌های به دست آمده بر علیه ۲ سویه نوکاردیا استروئیدس و ۲ سویه نوکاردیا برازیلینس به صورت هاله عدم رشد بر روی محیط کشت جامد مشاهده و ثبت شد. لازم به ذکر است سوسپانسیون میکروبی به کار رفته در تمامی مراحل آزمایش دارای کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلین که به نسبت ۰/۰۱ رقیق شده بود، تعیین و آزمون‌های میکروبی حداقل با سه تکرار انجام شد. در این مطالعه روش قطره پلیت به منظور بررسی کیفی و دو روش چاهک و دیسک پلیت به منظور بررسی کمی اثرات ضد میکروبی گیاهان به کار گرفته شد. در روش کیفی (قطره پلیت) یک قطره ($10 \mu\text{L}$) از هر رقت بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد مولر هیتون که قبلاً با سوسپانسیون حاوی سویه نوکارد کاملاً آغشته شده بود، چکانده شد. در حالی که در روش چاهک پلیت (کمی) ($100 \mu\text{L}$) از عصاره

متانلی با رقت‌های موردنظر در چاهک یکنواختی به قطر ۶ میلی‌متر و عمق ۵ میلی‌متر که در سطح آگار پلیت آغشته به باکتری تعبیه شده بود، ریخته شد. در روش دیسک پلیت ابتدا دیسک‌های کاغذی در عصاره متانلی گیاهان مورد مطالعه از غلظت ۲/۵ تا ۱۰ درصد که مناسب‌ترین غلظت‌ها بود به مدت نیم ساعت قرار داده شد. سپس هوادهی و خشک گردانیده شد. مقدار عصاره تام جذب شده توسط یک دیسک کاغذی برای غلظت ۱۰ درصد به مقدار ۲۰ میلی‌گرم، غلظت ۷/۵ درصد به مقدار ۱۵ میلی‌گرم، غلظت ۵ درصد به مقدار ۱۰ میلی‌گرم و غلظت ۲/۵ درصد به مقدار ۵ میلی‌گرم محاسبه شد. بر روی هر محیط کشت آغشته به باکتری یک دیسک حاوی ۲۰ میلی‌گرم عصاره متانلی، یک دیسک آنتی‌بیوتیک استاندارد آمیکاسین به عنوان شاهد مثبت، و در تکرارهای بعد به ترتیب آموکسی‌سیلین، سفنازیدیم، سفتی‌زوکسیم (برای نوکاردیا استروئیدس) و سفوتاکسیم (برای نوکاردیا برازیلینس)، سفالوتین و کوتریموکسازول و در کنار آنها یک دیسک حاوی اتانول ۸۰ درصد به عنوان شاهد منفی با فاصله مناسب قرار داده شد. پس از قراردادن کلیه پلیت‌ها در حرارت مناسب و زمان مشخص برای رشد باکتری، هاله‌های شفاف عدم رشد مشاهده و به کمک کولیس اندازه‌گیری شد.

برای اطمینان از عدم تاثیر ضد میکروبی متانل بر میزان مهارکنندگی گیاهان مورد مطالعه بر نوکاردیاهای، در رقت‌های انتخابی ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۲ درصد (حجم در حجم) از متانل تهیه و برکشت باکتری‌ها اضافه شد، لیکن هیچ اثر مهارکنندگی مشاهده نشد [۱۸].

نتایج

به منظور بررسی وجود کیفی ترکیباتی نظیر: ساپونین، آلکالوئید، فلاونوئید و تانن آزمایش‌های اولیه فیتوشیمیایی انجام گرفت که نتایج آن به همراه مشخصات گیاه‌شناسی گیاهان مورد مطالعه در جدول شماره ۱ آمده است. در بررسی‌های انجام شده در این مطالعه مشخص شد که مناسب‌ترین غلظت‌های عصاره تام گیاهان به ترتیب ۲/۵ تا ۱۵ درصد علیه گونه‌های نوکاردیا در روش دیسک پلیت (جدول

¹ Drop Plate Method

² Cup Plate Method

³ Paper Disk Method



خوشاریزه، اسپند و فرفیون به ترتیب تاثیر کمتر و دو گیاه بارهنگ کبیر و اکالیپتوس کمترین آثار ضدمیکروبی را بر باکتری‌های مورد مطالعه نشان دادند (جدول شماره‌های ۲ و ۳). نتایج به دست آمده از تاثیر ۱۲ نوع دیسک آنتی‌بیوتیکی استاندارد بر نوکاردیا استروئیدس و نوکاردیا برازیلینسس در جدول شماره ۴ درج شده است. مقایسه اثر مهارکنندگی

شماره ۲) و نیز غلظت‌های ۲/۵ تا ۱۰ درصد در روش چاهک پلیت می‌باشد (جدول شماره ۳). همان‌گونه که ملاحظه می‌شود، پنج گونه از گیاهان مورد مطالعه شامل هوفاریقون، علف چای زوفائی، علف چای دیهیمی که هر سه از تیره علف چای می‌باشند و نیز گیاه اُرس و پیذر تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر مهار رشد نوکاردیاه‌ها نشان می‌دهند. سایر گیاهان شامل

جدول شماره ۱- مشخصات گیاه‌شناسی و فیتوشیمیایی ۱۰ گیاه دارویی سنتی مورد مطالعه

نتایج آزمایش فیتوشیمیایی مقدماتی				اندام مورد استفاده	محل جمع‌آوری	تیره یا خانواده Family	نام گیاه دارویی	
تذ	تذ	تذ	تذ				جنس و گونه Genus/species	فارسی یا محلی
-	++	-	+	بخش هوایی	زیاران و صمغ آباد طالقان	Umbelliferae چتریان	<i>Echinophora platyloba</i> D.C.	خوش‌ساریزه، خوش‌ساروز، تیغ توراغ، کشندر
++	+	++	++	برگ‌ها	بندرعباس	Myrtaceae مورد	<i>Eucalyptus globulus</i> L.	اکالیپتوس
-	-	++	+	بخش هوایی	صمغ آباد طالقان	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia denticulata</i> Lam.	فرفیون
+	++	-	++	سرشاخه گل‌دار	لاهیجان	Hypericaceae علف چای	<i>Hypericum perforatum</i> L.	هوفاریقون، علف چای، گل راعی
+++ +	++	-	-	سرشاخه گل‌دار	صمغ آباد طالقان	Hypericaceae علف چای	<i>Hypericum hyssopifolium</i> Chaix.	علف چای زوفایی، زنبیل گلی، زردگل
+	++	-	++	سرشاخه گل‌دار	نیشابور	Hypericaceae علف چای	<i>Hypericum scabrum</i> L.	علف چای دیهیمی
+	-	-	++	سرشاخه	صمغ آباد طالقان	Cupressaceae	<i>Juniperus excelsa</i> M.B.	اُرس
-	-	+++	+	دانه	مشهد	Zygophyllaceae اسفند	<i>Peganum harmala</i> L.	اسپند یا اسفند
+	-	-	-	دانه	تهران	Plantaginaceae بارهنگ	<i>Plantago major</i> L.	بارهنگ کبیر
-	-	-	+	سرشاخه هوایی	صمغ آباد طالقان	Cyperaceae جگن	<i>Scirpus lacustris</i> L.	پیذر



جدول شماره ۲ - مقایسه اثر مهارکنندگی عصاره تام گیاهان دارویی با غلظت‌های ۲/۵ تا ۱۵ درصد (w/v) بر چهار سوش بیماری‌زای نوکاردیا به روش دیسک پلیت

غلظت عصاره تام گیاهی (درصد)										نام فارسی و علمی گیاهان مورد مطالعه	
۱۵	۱۰	۷/۵	۵	۲/۵	۱۵	۱۰	۷/۵	۵	۲/۵		
Nocardia brasiliensis (1)					Nocardia asteroides (1)						میزان مهارکنندگی گونه‌های نوکاردیا
Nocardia brasiliensis (2)					Nocardia asteroides (2)						
قطر کیفی هاله عدم رشد نوکاردیا برازیلینسس					قطر کیفی هاله عدم رشد نوکاردیا استروئیدس						
+++	+++	++	+	+	++	++	++	+	+	Echinophora platyloba D.C.	خوشاریزه
+++	++	+	+	-	++	++	++	+	-		
-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	Eucalyptus globulus L.	اکالیپتوس
-	-	-	-	-	++	+	+	-	-		
++	++	+	-	-	++	++	+	-	-	Euphorbia denticulata Lam.	فرفیون
++	+	+	-	-	++	+	-	-	-		
++++	++++	+++	++	+	++++	+++	++	++	+	Hypericum perforatum L.	هوفاریقون
++++	+++	+++	++	+	+++	+++	++	+	+		
+++	+++	++	-	-	++++	+++	+	+	-	Hypericum hyssopifolium Chaix	علف چای زوفانی
+++	++	+	-	-	+++	++	+	-	-		
++++	+++	++	+	+	++++	+++	+	+	-	Hypericum scabrum L.	علف چای دیهیمی
+++	++	++	+	-	+++	+++	+	-	-		
++++	+++	+++	++	+	+++	+++	++	+	+	Juniperus excelsa M.B.	اُرس
++++	+++	++	++	+	+++	++	++	+	+		
++	++	++	+	+	++	++	++	+	+	Peganum harmala L.	اسپند
++	++	++	+	-	++	++	+	+	-		
++	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Plantago major L.	بارهنک
+	+	-	-	-	+	+	-	-	-		
++++	+++	++	+	+	++++	+++	+++	++	+	Scirpus lacustris L.	کبیر پیزر
++++	+++	++	+	+	+++	+++	++	++	+		
++++ = ۲۰ > میلی‌متر					+++ = ۱۷-۱۹/۹ میلی‌متر					++ = ۱۶/۹-۱۴ میلی‌متر	
										+ = ۱۳/۹-۱۱ میلی‌متر	



جدول شماره ۳- مقایسه اثر مهارکنندگی عصاره تام گیاهان دارویی با غلظت‌های ۲/۵ تا ۱۰ درصد (w/v) بر چهار سوش بیماری‌زای نوکاردیا به روش

چاهک پلیت

غلظت عصاره تام گیاهی (درصد) متناسب با (g/100mL)								نام فارسی و علمی گیاهان مورد مطالعه
۱۵	۱۰	۷/۵	۵	۲/۵	۱۵	۱۰	۷/۵	
<i>Nocardia brasiliensis</i> (1)				<i>Nocardia asteroides</i> (1)				
<i>Nocardia brasiliensis</i> (2)				<i>Nocardia asteroides</i> (2)				
قطر کیفی هاله عدم رشد نوکاردیا برازیلینسس				قطر کیفی هاله عدم رشد نوکاردیا استروئیدس				
+++	++	++	+	+++	+++	++	+	<i>Echinophora platyloba</i> D.C.
+++	++	++	+	+++	++	++	+	
—	—	—	—	+++	++	+	—	<i>Eucalyptus globulus</i> L.
—	—	—	—	+++	++	+	—	
++	++	+	—	++	++	+	—	<i>Euphorbia denticulata</i> Lam.
++	+	—	—	++	+	—	—	
++++	+++	+++	++	++++	++++	+++	++	<i>Hypericum perforatum</i> L.
++++	+++	++	++	++++	+++	++	+	
++++	+++	+	—	++++	++	+	+	<i>Hypericum</i> <i>hyssopifolium</i> Chaix
+++	++	+	—	+++	++	+	—	
++++	+++	++	+	++++	+++	++	+	<i>Hypericum scabrum</i> L.
++++	+++	+++	+	++++	++	+	+	
++++	+++	+++	+	++++	+++	++	+	<i>Juniperus excelsa</i> M.B.
++++	+++	++	++	+++	+++	++	+	
+++	++	++	+	+++	++	++	+	
								<i>Peganum harmala</i> L.
+++	++	+	—	++	++	+	+	
+	+	—	—	++	+	—	—	
								<i>Plantago major</i> L.
++	+	—	—	+	+	—	—	
+++	++	+	+	++++	+++	++	++	
								<i>Scirpus lacustris</i> L.
++++	+++	++	+	++++	+++	++	+	
++++ = ۲۰ > میلی‌متر								+++ = ۱۷-۱۹/۹ میلی‌متر
++ = ۱۴-۱۶/۹ میلی‌متر								+ = ۱۱-۱۳/۹ میلی‌متر



جدول شماره ۴- مقایسه اثر مهارکنندگی دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استاندارد بر دو سوش بیماری‌زای نوکاردیا

ردیف	نام آنتی‌بیوتیک	نوع محیط کشت	قطر هاله عدم رشد کمی (میلی‌متر) و کیفی	
			<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
۱	آمیکاسین Amikacin	GYEA, BHIA	۲۹ (++++)	۲۸ (++++)
۲	آموکسی سیلین Amoxicillin	GYEA, BHIA	۲۲ (++++)	۲۶ (++++)
۳	سفتازیدیم Ceftazidime	GYEA, BHIA, Blood A	۲۳ (++++)	۲۵ (++++)
۴	سفتی زوکسیم / سفوتاکسیم Ceftizoxime/Cefotaxime	GYEA, BHIA, SDA	۲۰ (++++)	۲۱ (++++)
۵	سفالوتین Cephalothin	GYEA, Blood A	۲۲ (++++)	۲۷ (++++)
۶	کلرامفنیکل Chloramphenicol	GYEA, BHIA	۱۴ (++)	۱۵ (++)
۷	کوتریموکسازول Cotrimoxazole	MHA, SDA	۲۵ (++++)	۲۳ (++++)
۸	جنتامایسین/نالیدیکسیک اسید Gentamic/Nalidixic acid	GYEA, BHIA Blood A	۱۲ (-)	۱۱ (-)
۹	کانامایسین Kanamycin	BHIA	۱۱ (-)	۱۳ (-)
۱۰	نئومایسین Neomycin	GYEA, BHIA Blood A	۱۷ (+++)	۱۹ (+++)
۱۱	استرپتومایسین Streptomycin	GYEA	۱۹ (+++)	۱۷ (+++)
۱۲	تتراسیکلین Tetracycline	GYEA, BHIA, MHA	۱۷ (+++)	۱۸ (+++)

ژلوز گلوکز عصاره فارچ (GYEA)، عصاره قلب و مغز گوساله (BHIA)، ژلوز خون‌دار (Blood A)، ژلوز سابورو دکستروز (SDA)، ژلوز مولر هیتون (MHA)

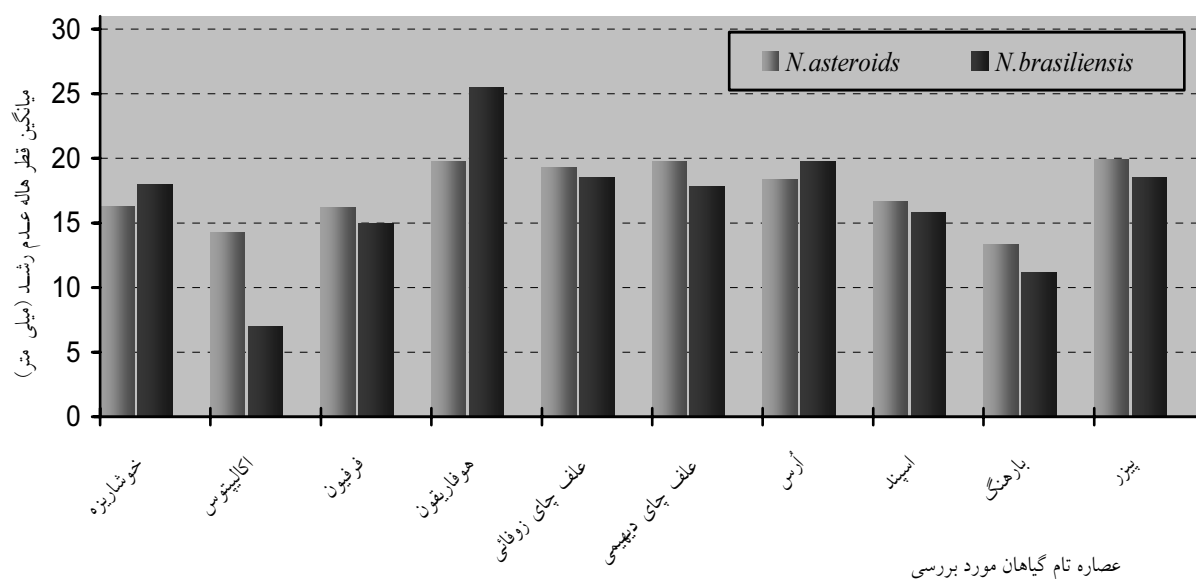
درمان انواع بیماری‌ها مورد توجه مردم بوده و در سال‌های اخیر روند رو به رشدی پیدا کرده است [۲۶]. از طرفی گیاهان دارویی علاوه بر مصارف درمانی، به عنوان طعم‌دهنده و معطرکننده و تقویت‌کننده نیز مصرف سنتی دارد [۴۱، ۴۸]. در تجربه حاضر اثرات ضدباکتریایی و فیتوشیمیایی عصاره تام ده (۱۰) گونه از گیاهان سنتی ایران بر چند سویه از نوکاردیاهای بیماری‌زا با استفاده از روش‌های انتشار در ژلوز مورد بررسی

عصاره تام گیاهان دارویی (با غلظت ۱۰ درصد) بر دو سوش بیماری‌زای نوکاردیا بروش چاهک پلیت در نمودار شماره ۱ و مقایسه مشابه به روش دیسک پلیت در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است.

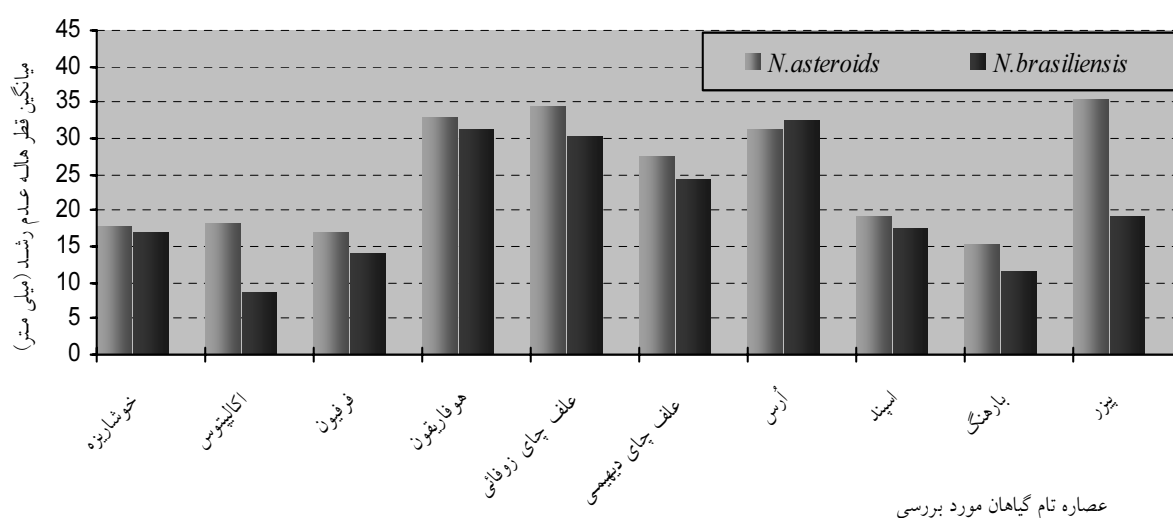
بحث

استفاده از گیاهان دارویی به لحاظ پایین بودن عوارض جانبی آن نسبت به داروهای شیمیایی از گذشته‌های دور برای





نمودار شماره ۱ - مقایسه مهار رشد نوکاردیا استروئیدس و نوکاردیا برازیلینسس به وسیله عصاره متانلی ۱۰ گیاه دارویی به روش چاهک پلیت (غلظت ۱۰ درصد)



نمودار شماره ۲ - مقایسه مهار رشد نوکاردیا استروئیدس و نوکاردیا برازیلینسس به وسیله عصاره متانلی ۱۰ گیاه دارویی به روش دیسک پلیت (غلظت ۱۰ درصد)

تجربه و نتایج حاصل از آن برای تجربیات مراحل بعد یک بررسی غربالگری به حساب می‌آید. در ادامه بررسی، از دو روش چاهک و دیسک پلیت به عنوان بررسی‌های کمی بهره‌گیری شد.

خوشاریزه: نتایج به دست آمده از آزمایش فیتوشیمیایی عصاره تام خوشاریزه وجود مقدار کمی ساپونین و مقادیر

قرارگرفت. نتایج به دست آمده از روش قطره پلیت که یک روش کیفی قابل قبول است، اثرات مهارکنندگی عصاره تام گیاهان موردنظر بر باکتری‌ها را نشان داد، به طوری که در تکرارهای بعدی و استفاده از روش‌های دیگر بسیار راه‌گشا بود. اگر چه روش کیفی قطره پلیت در این مطالعه یک بررسی کیفی اثر ضد میکروبی عصاره تام گیاهان دارویی بود، لیکن این



بیشتری فلاونوئید را نشان می‌دهد (جدول شماره ۱)، که با تاثیر مهارکنندگی عصاره تام گیاه بر باکتری‌های مورد مطالعه هماهنگ است و نشان از توان ضدباکتریایی خوشاریزه دارد (جدول شماره‌های ۲ و ۳). اگر چه خوشاریزه به صورت سنتی به عنوان چاشنی غذایی و برای معطر کردن ماست و پنیر مورد استفاده قرار می‌گرفته است، لیکن اثرات ضد میکروبی آن در مطالعات محدودی که انجام شده گزارش شده است [۶۸]. در مورد اثرات ضد میکروبی خوشاریزه تحقیقاتی بر روی گونه دیگر خوشاریزه به نام *Echinophora tenuifolia* انجام شده که نشان می‌دهد اسانس این گونه نیز فعالیت ضدباکتریایی دارد [۶۹]. در مورد اثرات ضدقارچی خوشاریزه، تحقیقاتی از جمله بررسی اثر ضدقارچی عصاره تام گیاه خوشاریزه روی تعدادی از درماتوفیت‌های شایع در ایران نیز انجام گرفته است [۳۸].

اکالپتوس: اگر چه به علت دارا بودن اسانس قابل استخراج به عنوان گونه دارویی مطرح می‌باشد و بخور اسانس برگ‌های آن در رفع سرماخوردگی و دورکنندگی حشرات مصرف دارد [۴۱] لیکن اثرات مهارکنندگی قابل توجهی در مطالعه ما نشان نداد (جدول شماره‌های ۲ و ۳). اما آثار ضد میکروبی اکالپتوس طی مطالعات متعددی گزارش شده که از آن جمله به اثر ممانعت‌کنندگی عصاره اتانولی گیاه اکالپتوس بر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی‌سیلین [۷۰]، اثر ضدقارچی عصاره تام اکالپتوس بر سوش استاندارد کاندیدا آلبیکانس [۷۱] و مطالعه مشابه در استرالیا [۷۲] می‌توان اشاره کرد.

فرفیون: به عنوان گیاه مهم و گل‌دار دارویی با گونه‌های متعدد در ایران مطرح می‌باشد [۴۲]، معذالک اثرات مهارکنندگی قابل توجهی در مطالعه ما نشان نداد (جدول شماره‌های ۲ و ۳). از طرفی مطالعات غربالی انجام شده بر گونه‌های مختلف فرفیون حاکی از اثرات درمانی سودمند برای درمان بیماری‌های مختلف نظیر سرطان، روماتیسم، آسم، عفونت‌های باکتریایی و دردهای عصبی و علیه تک‌یاخته‌های خونی است [۷۵ - ۷۳].

علف چای: نتایج بررسی ضدباکتریایی در مطالعه پیش رو تاثیر قابل توجه عصاره متانلی گونه‌های علف چای را بر

سوش‌های بیماری‌زای نوکاردیا نشان می‌دهد (جدول شماره‌های ۲ و ۳) که اگر چه باکتری‌های به کار گرفته شده در بررسی ما با سایر مطالعات تفاوت دارد لیکن اثر مهارکنندگی عصاره تام علف چای بر آنها مشابه مطالعات فوق‌الذکر می‌باشد. به نظر می‌رسد بین وجود فلاونوئید در عصاره تام گونه‌های علف چای مورد مطالعه (جدول شماره ۱) و اثرات ضد میکروبی این گیاهان ارتباط وجود داشته باشد. این مطلب در گزارش‌های متعددی آمده که اثرات ضدباکتریایی فلاونوئیدهای حاصل از علف چای برزیلی بر باسیلوس سوبتیلیس و دیگر باکتری‌های گرم مثبت مورد بررسی قرار گرفته است که ارتباط آن به اثبات رسیده است [۷۶، ۷۷]. در مطالعاتی که بر روی گونه‌های مختلف علف چای انجام شد، عصاره متانلی آنها که شامل تاتن، فلاونوئید و اسید فنولیک بود دارای آثار ضد باکتریایی مشخصی بر استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس و هلیکوباکتر پیلوری بودند [۷۸، ۷۹]. ترکیبات مختلفی از این گونه گزارش شده که فعالیت‌های بیولوژیکی خاصی را به آن نسبت می‌دهند مانند هایپرین، سودوهایپرین، فلاونوئیدهای مختلف مانند کوئرستین، هایپرین، فلورگلوکوسینول و اسانس، که اثرات مختلف ضدافسردگی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان و فعالیت ضدالتهابی از آنها گزارش شده است [۴۶، ۸۰]. مطالعه بر روی آثار ضدباکتریایی علف چای به سال‌های دور برمی‌گردد. در سال ۱۹۵۴ دو دانشمند هندی به اثرات ضد میکروبی این گیاه در گزارشی علمی اشاره کردند [۸۱]. این گیاه دارای اثرات فارماکولوژیکی متعددی از جمله اثرات ضددرد، ضدافسردگی و ضدالتهاب، ضدتومور، ضدفرااموشی، ضد اضطراب، ضد زخم معده و ضد اکسیدان است و در طب سنتی مصارف زیادی داشته است و بر این اساس نیز مطالعات زیادی روی آن انجام شده است [۴۴، ۴۶، ۸۲، ۸۴]. به علاوه مطالعات بسیاری نیز درخصوص اثرات ضد میکروبی عصاره گونه‌های مختلف علف چای در داخل و خارج از کشور انجام شده است [۷۷، ۷۹، ۸۱، ۸۵]. در مطالعات انجام شده در کشورمان بیشتر به بررسی اثرات ضدافسردگی، ضدالتهابی، ضد سردرد و میگرنی [۸۶، ۸۷]، ضد تشنجی [۸۸] علف چای پرداخته شده است [۴۶]. در پاره‌ای از بررسی‌ها در دنیا آثار ضد ویروسی به



خصوص علیه ویروس ایدز صورت گرفته است [۸۹،۹۰]. اگرچه در مطالعه حاضر اثرات ضدقارچی علف چای موردنظر نبوده لیکن مطالعات نشان می‌دهد که این گیاه خاصیت ضدقارچی و ضدانگل مالاریا را در بردارد [۷۶،۹۱،۹۲]. با عنایت به این که مطالعات انجام شده در داخل و خارج از کشور دور محور آثار متعدد گیاه علف چای از جمله خواص ضد درد، ضد افسردگی و ضد التهاب، ضد تومور، ضد فراموشی، ضد اضطراب، ضد زخم معده و ضد اکسیدانت و هم چنین آثار ضد میکروبی به خصوص بر میکروارگانیسم‌های گرم مثبت دور می‌زند، نوکاردیها نیز به عنوان باکتری‌های گرم مثبت بیماری‌زا مدنظر قرار گرفتند. ضمن این که مطالعه مشخصی مبنی بر تاثیر عصاره علف چای بر نوکاردیها تا به حال یافت نشده است و به نظر می‌رسد این مطالعه کاملاً جدید می‌باشد. بنابراین اثرات کاملاً مشخص عصاره الکلی سه گونه علف چای که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند، ضمن این که مبنای مقایسه پایایی با مطالعات دیگر محققین نیست، لیکن به عنوان پایه برای مطالعات می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

اُرس یا سرو کوهی: به علت مقاومت در برابر خشکی و سرما، بوی نامطبوع آن که باعث فرار مار، عقرب و حشرات گزنده می‌شود و خواص ضد میکروبی آن بسیار مورد توجه می‌باشد. سرشاخه‌های آن دارای اسانس به نام سابین است که به شدت محرک پوست و مخاط می‌باشد. مطالعات انجام شده روی اسانس اُرس بر گونه‌های متعددی از قارچ‌های بیماری‌زا خاصیت مهارکنندگی آنرا بر این میکروارگانیسم‌ها نشان داد [۹۳]. اُرس در حجاز برای معالجه بیماری سل ریوی و یرقان مصرف سنتی داشته است و عصاره برگ و دانه آن علیه باکتری‌های گرم مثبت بیماری‌زا مانند *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* تاثیر قابل توجهی داشته است [۹۴]. از خواص ضد میکروبی اُرس می‌توان به تاثیر آن علیه *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* و همچنین *Staphylococcus durans* نیز اشاره کرد [۹۵]. عصاره الکلی و متانلی اُرس بر باسیل سل استاندارد *Mycobacterium tuberculosis* H37RV اثر مهارکنندگی قابل ملاحظه‌ای را نشان داد [۹۶].

نتایج بررسی ضدباکتریایی در مطالعه پیش رو تاثیر قابل توجه عصاره متانلی اُرس بر سوش‌های بیماری‌زای نوکاردیها نشان می‌دهد (جدول شماره ۲ و ۳) اگر چه بررسی فیتوشیمیایی انجام شده روی اُرس هیچ فلاونوئیدی نشان نداد، ولی وجود ساپونین و مقدار کمی تانن می‌توانند خواص ضدباکتریایی آنرا توجیه کند (جدول شماره ۱). نکته قابل توجه این است که مطالعات انجام شده روی عصاره این گیاه همگی روی باکتری‌های گرم مثبت و عمدتاً خانواده مایکوباکتریاسیه بوده است که باکتری‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر از این راسته می‌باشند. بنابراین نتایج مطالعات فوق‌الذکر به نوعی بر نتایج به دست آمده صحه می‌گذارند.

اسپند: به عنوان یک دانه گیاهی ضد عفونی‌کننده مصرف عمومی دارد و در طب سنتی ایران از پودر دانه‌های اسپند در درمان تومورهای جلدی و زیرجلدی استفاده می‌شده است [۴۸]. در مطالعه حاضر نتایج نسبتاً خوب عصاره اسپند بر نوکاردیها در (جدول شماره‌های ۲ و ۳) نشان داده شده است. از طرفی وجود مقدار نسبتاً زیاد آلکالوئید موجود در عصاره اسپند رابطه این ماده را با اثرات ضد میکروبی آن آشکار می‌کند (جدول شماره ۱). در بررسی‌های متعدد در دنیا آثار ضد میکروبی و ضد ویروسی اسپند بر میکروارگانیسم‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است [۹۷،۹۸]. ضمن اینکه آلکالوئید فراوانی که در اسپند وجود دارد توجه محققین را به رابطه تاثیر این ماده با اثرات ضد میکروبی آن جلب کرده است [۹۹]. در بررسی ما نیز وجود آلکالوئید می‌تواند موجب اثر مهارکنندگی نوکاردیها باشد. در مطالعه‌ای که در داخل کشور انجام شد، مشخص گردید که عصاره ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی گرم اسپند اثر ضدباکتریایی نسبتاً خوبی بر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی‌سیلین داشته است [۷۰].

بارهنگ کبیر: اثر ضد میکروبی مشخصی را در مطالعه ما نشان نداد (جدول شماره‌های ۲ و ۳). پیزر: این گیاه اگر چه در دنیا شناخته شده است لیکن مطالعات چندانی در خصوص اثرات ضد میکروبی آن در منابع



گیاهان دارویی فوق مربوط به وجود مواد موثره‌ای مانند فلاونوئید، ساپونین، آلکالوئید و تانن در عصاره متانلی گیاهان مورد مطالعه باشد. اگر چه تجربه حاضر در محیط غیرزنده (*in-vitro*) و بر روی محیط‌های کشت جامد انجام شده، لیکن به دلیل نتایج قابل قبول به دست آمده به نظر می‌رسد این یافته‌ها زمینه بسیار مناسبی برای بررسی‌های بیشتر به صورت (*in-vivo*) بر روی حیوانات آزمایشگاهی و همچنین جهت تاثیر ضد میکروبی فراکشن‌های این گیاهان بر نوکاردیها باشد.

داخلی یافت نشد و در منابع خارجی بیشتر در زمینه تصفیه طبیعی فاضلاب و فعالیت ضد میکروبی این گیاه در زمین هاب باتلاقی گزارش شده است که نمی‌تواند مبنای مقایسه پایایی با مطالعه ما روی نوکاردیا باشد [۱۰۰، ۱۰۱]. ولی در مطالعه ما عصاره متانلی این گیاه بر سوش‌های نوکاردیا بسیار قابل توجه می‌باشد به طوری که در غلظت ۱۰ درصد قطر هاله عدم رشد بیش از ۲۰ میلی‌متر را نشان داد (جدول شماره‌های ۲ و ۳).

نتیجه‌گیری

با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد اثرات ضدباکتریایی

منابع

1. Valenzuela-Tovar JF, Contreras-Perez C, Shibayama-Hernandez H, Chavez-Gonzalez L, Vazquez-Chacon CA, Olivera-Diaz H: Biochemical Identification and Molecular Characterization (PCR-RFLP) of Nocardia Isolates from Sputum. *Archives of Medical Res.* 2005; 36: 356 - 61.
2. Vera-Cabrera L, Gonzalez E, Rendon A, Ocampo-Candiani J, Welsh O, Velazquez-Moreno VM, Hak Choi S, Molina-Torres C: In Vitro Activities of DA-7157 and DA-7218 against Mycobacterium tuberculosis and Nocardia brasiliensis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50: 3170 - 2.
3. Soto-Hernandez JL, Moreno-Andrade T, Gngora-Rivera F, Ramirez-Crescencio MA: Nocardia abscess during treatment of brain toxoplasmosis in a patient with aids, utility of proton MR spectroscopy and diffusion-weighted imaging in diagnosis. *Clinical Neur. and Neurosurgery* 2006; 108: 493 - 8.
4. Jinno S, Jirakulaporn T, Bankowski MJ, Kim W, Wong R: Rare case of Nocardia asteroides pericarditis in a human immunodeficiency virus-infected patient. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 2330 - 3.
5. Chow E, Moore T, Deville J, Nielsen K. Nocardia asteroides brain abscesses and meningitis in an immunocompromized 10-year-old child. *Scand J. Infect Dis.* 2005; 37: 511 - 3.
6. Baldi BG, Santana ANC, Takagaki TY: Pulmonary and cutaneous nocardiosis in a patient treated with corticosteroids. *J. Brasileiro de Pneumologia* 2006; 32: 592 - 5.
7. Everett CM, Dhillon H, Samarasinghe D, Berry L, Warwick S, Turner B: A case of cerebral nocardiosis following brief immunosuppression. *European J. of Neur.* 2006; 13: 431 - 2.
8. Ansari SR, Han XY, O'Brien S, Safdar A: Nocardia veterana bloodstream infection in a patient with cancer and a summary of reported cases. *Inter. J. of Infectious Diseases* 2006; 10: 483 - 6.
9. Enomoto M., Yamasawa H, Sawai T, Bando M, Ohno S, Sugiyama Y. Pulmonary nocardiosis with bilateral diffuse granular lung shadows in a patient with subcutaneous panniculitic T-cell lymphoma. *Intern Med.* 2002; 41: 986 - 9.
10. Laurence AD: Cerebral and pulmonary nocardia in a bone marrow transplant patient. *British J. of Haematol.* 2005; 129: 711-2.
11. Ozturk S, Tufan F, Alisir S, Gorcin S, Guven



- D, Cagatay A, Turkmen A: A case of isolated *Nocardia asteroides* brain abscess in a kidney transplant recipient. *Transplant Proc.* 2006; 38: 3121 - 4.
12. Forbes BAS, Daniel F./ Weissfeld, Alice S./ Brown,: *Nocardia*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Oerskovia*, and Similar Organisms In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Edited by Forbes BAS, Daniel F./ Weissfeld, Alice S./ Brown,: Elsevier; 2007, pp: 311 - 22.
13. Kilincer C, Hamamcioglu MK, Simsek O, Hidonmez T, Aydoslu B, Tansel O, Tiryaki M, Soy M, Tatman-Otkun M, Cobanoglu S. Nocardial brain abscess: Review of clinical management. *J. of Clinical Neuroscience* 2006; 13: 481 - 5.
14. Eshraghi S, Amin M. Pulmonary Nocardiosis associated with Cushing's syndrome. *Pak J. Med. Sci.* 2004; 20: 18 - 23.
15. Conville P. Nocardian and other aerobic actinomycetes. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, edn 10th. Edited by Borriello SP, Murray PR, Funke G: Hodder Arnold, 2005, vol 2 1137 - 80.
16. Yamamura H, Hayakawa M, Nakagawa Y, Iimura Y. Characterization of *Nocardia asteroides* Isolates from Different Ecological Habitats on the Basis of Repetitive Extragenic Palindromic-PCR Fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 3149 - 51.
17. Eshraghi S, Sarrafnejad AF, Roudsari HT: A diagnostic study of Nocardiosis patients being confined in Shareati Training Hospital in Tehran, using cultural & serological methods. *Pak J. Med. Sci.* 2005; 21 (3): 345 - 51.
18. Shaikh MA, Byrd Jr RP, Roy TM: Pulmonary nocardiosis: an unusual cause of a solitary pulmonary nodule. *J. Ky Med. Assoc.* 2006; 104: 184 - 9.
19. Soto-Hernandez JL, Moreno-Andrade T, G'ngora-Rivera F, Ramirez-Crescencio MA. *Nocardia* abscess during treatment of brain toxoplasmosis in a patient with aids, utility of proton MR spectroscopy and diffusion-weighted imaging in diagnosis. *Clinical Neurol. and Neurosurgery* 2006; 108: 493 - 8.
20. Ahmed AAO, van de Sande WWJ, Fahal A, Bakker-Woudenberg I, Verbrugh H, van Belkum A: Management of mycetoma: major challenge in tropical mycoses with limited international recognition. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2007; 20: 146 - 7.
21. Perez-Camarero E, Marti J, Idigoras I, Anton E: Pulmonary nocardiosis in non-immunocompromised patient. *Enferm Infecc Microbiol. Clin.* 1999; 17: 476 - 7.
22. Sharma M, Gilbert BC, Benz RL, Santoro J: Disseminated *Nocardia otitidiscaviarum* infection in a woman with sickle cell anemia and end-stage renal disease. *Am. J. Med. Sci.* 2007; 333: 372 - 5.
23. Salinas-Carmona MC, Perez-Rivera I: Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun* 2004; 72: 5597 - 604.
24. Sorrell TC, Mitchell DH, Iredell JR. Nocardiosis In Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Edited by Mandell GL, Bennett JE, Dolin R: Churchill Livingstone, New York; 2005, vol 2. pp: 2916 - 24.
25. Filice GA. Nocardiosis. In Harrison's Principles of Internal Medicine (16th ed.). Edited by D.L.Kasper ASF, D.L. Longo, E. Braunwald, S.L. Hauser, and J. L. Jameson, McGraw- Hill; 2005, 934 - 7.
26. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiol. Rev.* 1999; 12: 564 - 82.
27. Borris RP. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J. of Ethnopharmacol.* 1996; 51: 29 - 38.
28. Schultes RE: The kingdom of plants. Medicines from the Earth. McGraw-Hill Book Co. New York, NY 1978: 208 - 9.
29. Clark AM. Natural products as a resource for new drugs. *Pharm. Res.* 1996; 13: 1133 - 44.
30. Amagase H. Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic 1. Edited by: Am Soc



Nutrition; 2006, vol 136. 716 - 25.

31. Dakhili M ZST, Torabi Goodarzi M. Evaluation of Antimicrobial Effects of 4 Medicinal Plants against *Salmonella typhimurium* and Comparison them with Common Antibiotics in Veterinary Medicine. *Pharmaceutical Biol.* 2006; 5: 21 - 6.
32. Shirazi MH FM, Sultan Dallal MM, Eshraghi S, Jamalifar H, Alamulhoda E. A comparative study on the antimicrobial effect of some medicinal herbal extracts and selective antibiotics against the clinical isolates of *Helicobacter Pylori* *J. of Med. Plants* 2003; 7: 53 - 60.
33. Haghighati F JS, Momen Beitollahi J. Comparison of antimicrobial effects of ten herbal extracts with Chlorhexidine on three different oral pathogens: An in vitro study *Hakim Res. J.* 2003; 3: 71 - 6.
34. Fazeli MR, Amin G, Attari MMA, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi N. Antimicrobial activities of iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food control* 2007; 18: 646 - 9.
35. Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE, Kozukue N. Antimicrobial Activities of Tea Catechins and Theaflavins and Tea Extracts against *Bacillus cereus*. *J. of Food Protection* 2006; 69: 354 - 61.
36. Asghari Gh.R, Sajadi SE, Sadraei H, Kh Y. Essential oil constituents of *Echinophora Platyloba* DC *J. Res. In Medical Sci.* 2003; 4: 97 - 9.
37. Sadraei H, Asghari Gh.R, Kh Y. Study of the effect of hydro-Alcoholic and essential oil of *Echinophora Platyloba* on rat isolated ileum contractions in vitro *J. Res. In Medical Sci.* 2003; 4: 150 - 5.
38. Avijgan M SM, Nilforoosh Zadeh MA, Hafizi M, K. Ant- fungal effect of *Echinophora Platyloba* extract on some common Dermatophytes. *J. of Medicinal Plants* 2006; 5th year: 10 - 6.
39. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names: Latin, English, Persian: Farhang Mo'aser; 1966.
40. Mozaffarian V. The family of Umbelliferae in Iran: keys and distribution. Tehran: Ministry of Agriculture, Research Organization of Agriculture and Natural Resources, Research Institute of Forest and Rangelands 387p.-illus., keys. En (Pe) Icones. Geog 1983, pp: 2 - 3.
41. Amin Gh. Popular Medicinal plants of Iran. In Medicinal plants of Iran. Edited by Amin G: Vice-chancellorship of Research, TUMS; 2005, pp: 44-64.
42. Ayatollahi SAM, SAR M: Phytochemical study of *Euphorbia Microsciadia*. *FEYZ, KASHAN UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES & HEALTH SERVICES* 2004, 29: 51 - 6.
43. Tyler E, Brady R, E. R. Pharmacognost, 9th ed. Edited by: Lea and Febiger; 1998, 441 - 2.
44. Trovato A, Raneri E, Kouladis M, Tzakou O, Taviano MF, Galati EM: Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* Willd.(Guttiferae). *Il Farmaco* 2001; 56: 455 - 7.
45. Gambarana C, Ghiglieri O, Tolu P, De Montis MG, Giachetti D, Bombardelli E, Tagliamonte A. Efficacy of an *Hypericum perforatum* (St. John's wort) extract in preventing and reverting a condition of escape deficit in rats. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21: 247 - 57.
46. Mukherjee PK, Verpoorte R, Suresh B: Evaluation of in-vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. *J. of Ethnopharmacol.* 2000; 70: 315 - 21.
47. Salehi Shanjani P, M M: Seasonal variation of the leaf and cone oil of *Juniperus Excelsa* M.B *J. of Medicinal Plants* 2006; 17 (5): 50 - 8.
48. Zargary A. Medicinal plants. 5th Edition, 1801/4, edn 5th Edition: Tehran University Publications, 1993.
49. Krussmann G: Die Nadelgeholzein Berlin and Hamburg. Edited by: P. Barey (Ed.); 1960.
50. Kerfoot O, Lavranos JJ. Notes Royal Botanical Garden Edinburg, 1984, pp: 483 - 4.
51. Coode MJE, Cullen J: Flora of Turkey and the



- East Aegean Islands. Edited by Davis PH: Edinburg: University Press; 1965, vol 1. 78 – 84.
52. Baytop A. Trakya florasına yeni ilaveler. *Türk Biyoloji Dergisi* 1970, 20: 128 - 31.
53. Assadi M. Flora of Iran. Technical Publication of Research Institute of Forests and Rangelands, Iran 1997, pp: 19 - 22.
54. Clevering OA. Germination and seedling emergence of *Scirpus lacustris* L. and *Scirpus maritimus* L. with special reference to the restoration of wetlands. *Aquatic Botany* 1995; 50: 63 - 78.
55. Samsam Shariat H: Detection and extraction of medicinal plants using pecculation method. Isfahan: Kafee Press; 1992.
56. Ajali U, Chukwurah BKC: Antimicrobial activity of *Securidaca longipedunculata*. *Phytomedicine* 2004, 11: 701 - 3.
57. Aynehchi Y, Sormaghi MHS, Amin GH, Ghahreman A: Survey of Iranian Plants for Saponins, Alkaloids, Flavonoids and Tannins. I. *Pharmaceutical Biol.* 1981; 19: 53 - 63.
58. Aynehchi Y, Sormaghi MHS, Amin GH, Soltani A, Qumehr N. Survey of Iranian Plants for Saponins, Alkaloids, Flavonoids and Tannins. II. *Quarterly J. of Crude Drug Res.: Vierteljährliche Zeitschrift Für Drogen-Forschung. Revue Trimestrielle Des Recherches Sur Les Matières Premières* 1981; 20: 61 - 70.
59. Okwu DE, Josiah C. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. *African J. of Biotechnol.* 2006; 5: 357 - 61.
60. Sabahi M, Ramezani M, Jaffari G, Heravi G, Bahaeddini F, Aynehchi Y. Survey of Iranian Plants for Saponins, Alkaloids, Flavonoids, and Tannins. IV. The Plants of Kerman Province. *Pharmaceutical Biol.* 1985; 23: 165 - 75.
61. Reginatto FH, Gosmann G, Schripsema J, Schenkel EP. Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. *Phytochemical Analysis* 2004; 15: 195 - 7.
62. Eshraghi S. An evaluation of the potent inhibitory effects of royal jelly fractions against *Streptomyces* bacteria. *Pakistan J. of Medical Sci.* 2005; 21: 63 - 8.
63. Eshraghi S, Valafar S. Evaluation of inhibitory effects of Iranian propolis against filamentous bacteria. *Pak J. Med. Sci.* 2008; 24: 56 - 60.
64. Jorgensen JH, Hindler JF, Reller LB and Weinstein MP. New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. *Clinical Infectious Diseases.* 2006; 44, 280-286.
65. Kamal F. Microbial quality control of medicinal products, vol 1: Tehran University Press 1993; pp: 2144.
66. Shawar R. Aerobes Gram-Positive Bacilli. In: *Textbook of diagnostic microbiology*, Third Edition. Edited by Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G: Saunders; 2007, 425 - 37.
67. Neef H, Declercq P, Laekeman G. Hypoglycaemic activity of selected European plants. *Phytother Res.* 1995; 9: 45 - 8.
68. Nazirizadeh M, Katouli M. Study of *Echinophora platyloba*: *Antimicrobial activity Pl. Med* 1989; 55: 96 - 7.
69. Arldogan BC, Baydar H, Kaya S, Demirci M, Ozbasar D, Mumcu E. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Some Essential Oils. *Archives of Pharmacol Res.* 2002; 25: 860 - 4.
70. Dadgar T GE, Bazueri M, Asmar M, Mazandarani M, Saifi A, Bayat H. The antibacterial effects of 20 herbal plants on methicillin resistant and sensitive *S. aureus* in Golestan province. *J. of Gorgan University* 2007; 1: 55 - 62.
71. Atai Z, Ansari M, Mousavi AA, Mirzaei A. In-vitro study of antifungal effects of selected herbal extracts on standard and wild strains of *Candida albicans*. *J. Dentistry, Dentists association* 2005; 2: 91 - 7.
72. Wilkinson JM, Cavanagh HMA. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytotherapy Res.* 2005; 19: 643 - 4.



73. Ayatollahi SAM, Ahmed Z, Malik A, Afza N, Badar Y. Cycloclarkeanol, a New Triterpene from *Euphorbia clarkeana*. *J. of Natural Products* 1992; 55: 959 - 62.
74. Jafari MR, Behravan J, Bodagh Abadi A, M R. Evaluation of Leishmanicidal effect of *Euphorbia Myrsinites* extract by in vitro anti-Leishmanial assay using Promastigote of *Leishmania Major* *Iranian J. of Basic Medical Sci.* 2006; 4: 295 - 8.
75. Vijaya K, Ananthan S, Nalini R. Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp. a cell culture study. *J. of Ethnopharmacol.* 1995; 49: 115 - 8.
76. Fenner R, Sortino M, Kuze Rates SM, Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, N.r C, von Poser G, Schapoval E. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine* 2005; 12: 236 - 40.
77. Rocha L, Marston A, Potterat O, Kaplan MAC, Stoeckli-Evans H, Hostettmann K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense* *Phytochem.* 1995; 40: 1447 - 52.
78. Reichling J, Weseler A, Saller R. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry Supplement* 2001; 34: 116 - 8.
79. Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, N.r C, Sarmento L, Lamb L, Hass M, von Poser G, Schapoval EES. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine* 2003; 10: 511 - 6.
80. Jean D, Poulignon M, Henriot AC. Pharmacological activity of three commercial *Hypericum perforatum* preparations in mice. *Phytotherapy Res.* 2006; 20: 653 - 4.
81. Gaiind KN, Ganjoo TN. Antibacterial principle of *Hypericum perforatum*. L. *Indian J. Pharm.* 1959; 21: 172 - 5.
82. Wang W, Hu X, Zhao Z, Liu P, Hu Y, Zhou J, Zhou D, Wang Z, Guo D, Guo H. Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in the forced swimming test and tail suspension test in mice. *Progress in Neuropsychopharmacology&Biological Psychiatry* 2008.
83. Cervo L, Rozio M, Ekalle-Soppo C, Guiso G, Morazzoni P, Caccia S. Role of hyperforin in the antidepressant-like activity of *Hypericum perforatum* extracts. *Psychopharmacol.* 2002; 164: 423 - 8.
84. Snow JM. *Hypericum perforatum* L. (Hypericeae), PROTOCOL. *J. Bot. Med.* 1996; 2: 16 - 23.
85. Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schoepf E, Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet* 1999; 353: 2129 - 10.
86. Mahmoudi M, Morteza-Semnani K, Saeedi M, Javanmardi A. Hypercins content, anti-inflammatory and analgesic activity of Iranian *Hypericum perforatum*. 2006.
87. Khandaghi R, Taher Aghdam AA, MF. Assessment of *Hypericum* effects in prophylaxis of Migraine and comparison of it with Amitriptyline and Propranolol in Iman Khomeini Medical Center, Tabriz PHARMACEUTICAL SCIENCES, *J. of Faculty of Pharmacy* 2000; 4: 37 - 44.
88. Hossein Zadeh H, Karimi Gh R, M RZ. Anticonvulsant effects of aqueous and Ethanolic extracts of *Hypericum perforatum* L. in mice; *J. of Medicinal Plants* 2004; 10: 23 - 30.
89. Lavie D, Freeman D, Bock H, Fleischer J, van Kranenburg K, Ittah Y, Mazur Y, Lavie G, Liebesb L, Meruelob D. Hypericin, a potential anti-AIDS drug. Blackwell Science Inc: 1992, pp: 321 - 2.
90. Axarlis S, Mentis A, Demetzos C, Mitaku S, Skaltsounis AL, Marselos M, Malamas M. Antiviral In vitro Activity of *Hypericum perforatum* L. Extract on the Human Cytomegalovirus (HCMV). *Phytotherapy Res.* 1998; 12: 507 - 11.
91. Decosterd LA, Hoffmann E, Kyburz R, Bray D, Hostettmann K. A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with



- antifungal and in vitro antimalarial activity. *Planta Med.* 1991; 57: 548 - 51.
- 92.** Decosterd L, Stoeckli-Evans H, Msonthi JD, Hostettmann K. A New Antifungal Chromene and a Related Di-chromene from *Hypericum revolutum*. *Planta Med.* 1986; 52: 429 - 30.
- 93.** Sokovic MD, Ristic M, Grubisic D. Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil from *Juniperus excelsa* Berries. *Pharmaceutical Biol.* 2004; 42: 328 - 31.
- 94.** Muhammad I, Mossa JS, El-Feraly FS. Antibacterial diterpenes from the leaves and seeds of *Juniperus excelsa* M. Bieb. *Phytotherapy Research*,. 1992, 6: 261-2.
- 95.** Tsitsin NV, Kovtunenkov VF, Polyakov DK, Khaidarov KM: *Znshch. Rust. Ured. Bolez* 1973; 2.
- 96.** Topçu G, Erenler R, İakmak O, Johansson CB, Lelik C, Chai H-B, Pezzuto JM. Diterpenes from the berries of *Juniperus excelsa*. *Phytochem.* 1999; 50: 1195 - 9.
- 97.** Sokmen A, Jones BM, Erturk M. The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *J. of Ethnopharmacol.* 1999; 67: 79 - 86.
- 98.** Rashan LJ, Adaaym H, Al-Khazraji AL. In Vitro antiviral activity of the aqueous extracts from the seeds of *Peganum harmala* [J]. *Fitoterapia* 1989; 60: 365 - 7.
- 99.** Al-Shamma A, Mitscher LA. Comprehensive Survey of Indigenous Iraqi Plants for Potential Economic Value. 1. Screening Results of 327 Species for Alkaloids and Antimicrobial Agents. *J. of Natural Products* 1979; 42: 633 - 42.
- 100.** Stottmeister U, Wießner A, Kusch P, Kappelmeyer U, Kastner M, Bederski O, Müller RA, Moormann H: Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol. Advances* 2003; 22: 93 - 117.
- 101.** Garcia M, Soto F, González JM, Bécáres E. A comparison of bacterial removal efficiencies in constructed wetlands and algae-based systems. *Ecological Engineering* 2008; 32: 238 - 43.

