Investigation of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the Aqueous and Ethanolic *Avicennia Marina* Extracts on Gram Positive and Gram Negative Bacteria *"in Vitro"*

Behrooz Alizadeh Behbahani[1*], Farideh Tabatabaei Yazdi[2], Fakhri Shahidi[3], Mohebbat Mohebbi[2], Hossein Zanganeh[4]

[1]Ph.D. Student of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
[3]Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
[4]M.Sc. Student of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

Background: Medicinal plants which are used for treating diseases have very few side effects compared to synthetic drugs. *Avicennia marina* plant extracts have been used for centuries as a popular method for treating several health disorders. The present study aimed to determine the antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic extracts of *Avicennia marina* on *Listeria monocytogenes* PTCC 1297, *Bacillus cereus* PTCC 1154, *Enterobacter aerogenes* PTCC 1221, *Enterococcus faecalis* PTCC 1237, and *Salmonella typhi PTCC* 1609 *"in vitro"*.

Methods: In this study, the antimicrobial effect of the extracts was evaluated by two methods, "Collins method" (spreading the extract on medium surface) and "disk agar diffusion method". The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for both species were determined by using dilution method. Finally, the data were entered into the SPSS statistical software (version 18) and analyzed by t-test and Duncan's test.

Results: The results showed that in "disk agar diffusion test", ethanolic extract had inhibition effects on *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*. MIC of *Avicenna marina* leaves of the aqueous and ethanolic extracts for *Enterobacter aerogenes* was 128 and 32 mg/ml, respectively. Besides, the MBC of aqueous and ethanolic extracts of *Avicenna marina* leaves for *Enterobacter aerogenes* was 256 and 64 mg/ml, respectively. Moreover, *Enterobacter aerogenes* was most resistant to the aqueous and ethanolic *Avicenna marina* extracts.

Conclusions: The ethanolic extract of *Avicenna marina* leaves *"in vitro"* has a significant antimicrobial effect on *Enterobacter aerogenes* and *Salmonella typhi (*gram-negative bacteria*)* and *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus,* and *Enterococcus faecalis (*gram-positive bacteria).

Keywords: *Avicenna marina*, Extract, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration.

Sadra Med Sci J 2014; 2(2): 123-134
Received: Nov. 23rd, 2013
Accepted: Jan. 11th, 2014

[*]Corresponding Author: **Alizadeh Behbahani, B.** Ph.D. Student of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, behrooz66behbahani@gmail.com

مجـــــله علمی علـــــوم پزشکی صدرا
دوره ۲، شماره ۲، بهار ۱۳۹۳، صفحات ۱۲۳ تا ۱۳۴
تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۲۱ تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۰۲

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی اثر بازدارندگی و کشندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا (*Avicennia Marina*) بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی

بهروز علیزاده بهبهانی*[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۲]، فخری شهیدی[۳]، محبت محبی[۲]، حسین زنگانه[۴]

[۱]دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
[۲]دانشیار و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
[۳]استاد و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
[۴]دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

مقدمه: گیاهان دارویی که در درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود دارای عوارض جانبی بسیار کمتری در مقایسه با داروهای سینتتیک است. بشر در قرن‌های متمادی از عصاره گیاه حرا برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌کرده است. هدف از این پژوهش بررسی اثر ضد - میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا بر *لیستریا مونوسایتوژنز* PTCC 1297 ، *باسیلوس سرئوس* PTCC 1154، *انتروباکتر ائروژینوزا* PTCC 1221 ، *انتروکوکوس فکالیس* PTCC 1237 و *سالمونلا تیفی* PTCC 1609 در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: اثر ضد میکروبی عصاره به دو روش پخش عصاره در سطح محیط کشت و انتشار در آگار (دیسک) مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. در انتها داده‌ها با استفاده از نر م افزارSPPS ویرایش ۱۸ و به کمک آزمون‌های آماری t و دانکن تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: در روش انتشار در آگار همه غلظت‌های عصاره اتانولی بر *باسیلوس سرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* اثر بازدارندگی داشت. MIC عصاره آبی و اتانولی برای *انتروباکتر ائروژینوزا* به *ترتیب* mg/ml ۱۲۸ و۳۲ و MBC عصاره آبی و اتانولی نیز در خصوص *انتروباکتر ائروژینوزا به ترتیب* mg/ml ۲۵۶ و ۶۴ بود. *انتروباکتر ائروژینوزا* بیشترین مقاومت را در برابر عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه حرا نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی گیاه حرا در شرایط آزمایشگاهی دارای اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه ای بر *انتروباکتر ائروژینوزا* و *سالمونلا تیفی* به عنوان باکتری گرم منفی و *لیستریا مونوسایتوژنز* ، *باسیلوس سرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* به عنوان باکتری‌های گرم مثبت نشان داد.

واژگان کلیدی: گیاه حرا، عصاره، حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی

* نویسنده مسئول: **بهروز علیزاده بهبهانی**، دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران،
behrooz66behbahani@gmail.com

مقدمه

پیشرفت‌های علمی و فن آوری طی سه دهه اخیر اهمیت و نقش سازنده گیاهان دارویی را در تامین نیازهای بشر به ویژه در حیطه دارو و درمان دو چندان ساخته است (۱). ایجاد مقاومت در مقابل داروها و توانایی میکروارگانیسم‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد سبب شده است تا تمایل به بررسی اثر ضد میکروبی گیاهان دارویی ایجاد گردد.

گیاه حرا با نام علمی *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh رایج‌ترین گونه این گیاهان در جنگل‌های مانگرو ایران است. گیاه حرا به عنوان یکی از غالب‌ترین گونه‌های گیاهی اکوسیستم مانگرو دارای توانایی‌های بالقوه‌ای می‌باشد (۲). این گیاه به صورت بوته‌ای یا درختچه‌ای با ارتفاع‌های متغیر بین ۱ تا ۱۰ متر یافت می‌شود. پوسته این گیاه به رنگ سفید، خاکستری یا سبز مایل به زرد می‌باشد. برگ‌ها معمولا به شکل بیضی یا نوک تیز بوده، در قسمت رویی حالت چرمی و به رنگ سبز روشن و در قسمت‌های زیرین به رنگ سفید مایل به خاکستری و پرز دار هستند (۳). گل‌ها نیز حالت لوله‌ای شکل داشته و دارای گلبرگ‌های چهار تایی به رنگ سفید یا زرد مایل به نارنجی می‌باشند.

تاکنون متابولیت‌های فراوانی که بعضی از آن‌ها دارای ساختارهای شیمیایی جدید و متعلق به کلاس‌های شیمیایی مختلفی می‌باشند، از گیاهان مانگرو و وابستگان به آن‌ها شناسایی شده‌اند. اسیدها و الکل‌های آلیفاتیک، آمینواسیدها و آلکالوئیدها، کربوهیدرات‌ها، کاروتنوئیدها، هیدروکربن‌ها و اسیدهای چرب آزاد که شامل اسیدهای چرب بلند زنجیر غیر اشباع می‌باشند. چربی‌ها، فرومون‌ها، استرهای فوربول، فنولیک‌ها و ترکیبات وابسته به آن‌ها، استروئیدها، گیلوکوزیدها، تانین‌ها، سایر ترپن‌ها و ترکیبات وابسته به آن‌ها از جمله ترکیبات شناخته شده این گیاهان به حساب می‌آیند (۴). این گیاه به طور وسیع توسط پزشکان سنتی برای درمان رماتیسم، التیام زخم ها، درمان التهاب و آبله استفاده می شده است.

علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۲) اثر ضد میکروبی عصاره-های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا را بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استرپتوکوکوس پایوژنز* و *پسودوموناس آئروژینوزا* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا بر روی هر سه میکروارگانیسم دارای اثر بازدارندگی بود و بیشترین مقاومت را در برابر عصاره برگ گیاه حرا باکتری گرم منفی *پسودوموناس آئروزینوزا* نشان داد (۵).

علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳) اثر ضد میکروبی عصاره-های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا را بر دو گونه ی قارچ بیماری زا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا از رشد قارچ‌های بیماری زا در محیط کشت جلوگیری به عمل آورد (۶).

باکتری‌ها عمومی‌ترین عامل در ارتباط با مسمومیت‌ها و عفونت‌ها می باشند. *لیستریا مونوسایتوژنز* عامل بیماری لیستریوز است، تمایل *لیستریا مونوسایتوژنز* به سیستم عصبی مرکزی منجر به بیماری حاد می‌شود که معمولاً میزان کشندگی آن بالاست به نحوی که در موارد اپیدمیک عفونت مواد غذایی میزان مرگ و میر ۳۰ تا ۴۰ درصد و در افراد مستعد تا ۷۵ درصد هم گزارش شده است (۷). *باسیلوس سرئوس* مولد انتروتوکسین‌های مولد اسهال و تهوع بوده و قادر به ایجاد سندرم اسهال و سندرم تهوع است. *انترو باکتر آئروژنزا* عامل عفونت‌های رحمی و بندرت عامل سندرم تورم پستان می باشد. *انتروباکتر آئروژنزا* کپسول کوچکی داشته و ممکن است به صورت آزاد یا در داخل روده یافت شود و می‌تواند عفونت‌های ادراری ایجاد کند. یکی از بیماری‌هایی که از طریق *سالمونلا تیفی* ایجاد می‌شود تب تیفوئید یا همان حصبه می‌باشد که بیشتر از طریق آب و غذای آلوده سرایت می‌کند. *انتروکوکوس فکالیس* در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی نقش دارد(۸). این باکتری بطور ذاتی به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم است.

اهدف مورد نظر برای انجام این پژوهش شامل:

۱- تعیین قدرت ضدمیکروبی عصاره به صورت محلول

۲- تعیین حساسیت یک میکروب خاص نسبت به غلظت‌های مشخص عصاره‌های آبی و اتانولی

۳- بررسی رابطه بین حلال مورد استفاده در عصاره‌گیری و قدرت ضدمیکروبی عصاره‌های استخراج شده

مواد و روش

این پژوهش آزمایشگاهی در فاصله آبان ماه ۱۳۹۱ تا بهمن ماه ۱۳۹۱ در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی و فناوری‌های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. سویه های میکروبی مورد آزمایش در این پژوهش شامل *لیستریا مونوسایتوژنز* PTCC 1297 ، *باسیلوس سرئوس* PTCC 1154، *انتروباکتر ائروژینوزا* PTCC 1221، *انتروکوکوس فکالیس* PTCC 1237 و *سالمونلا تیفی* PTCC 1609 بود. برگ‌های تازه گیاه حرا در شهریور ماه ۱۳۹۱ از جزیره قشم (استان هرمزگان) جمع آوری و بعد از شناسایی و تایید نام علمی گیاه با استفاده از کلیدهای شناسایی و هماهنگی‌های لازم با هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، برگ‌های گیاه حرا در حرارت معمولی و در سایه خشک شدند. بدین صورت که برگ گیاه مورد نظر را پس از جمع آوری در سایه و در حرارت معمولی به مدت چند روز قرار داده تا کاملاً خشک شود و بعد قطعات خشک شده گیاهان ذکر شده را به وسیله آسیاب برقی مدل WARING خرد شد.

مهم ترین و اساسی ترین عاملی که باید درهنگام استخراج مواد متشکله گیاهان مورد توجه قرار گیرد، حلال مناسب است که انتخاب آن به قسمت‌های مختلف یک گیاه و نیز به مواد متشکله آن بستگی دارد. جهت تهیه عصاره های آبی و اتانولی، ۱۰۰ گرم از برگ های پودر شده برگ گیاه حرا به ارلن حاوی۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درجه و آب مقطر اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه همزن مغناطیسی به آرامی مخلوط شد تا استخراج عصاره به طور کامل انجام گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط کاغذ صافی جنس واتمن از هم جدا شد تا عصاره‌های اولیه به دست آید. مایع رویی پس از جمع آوری با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس از صافیμ ۰/۴۵ عبور داده و جهت حذف آلودگی های میکروبی از فیلتر سرنگی استفاده شد و در نهایت عصاره‌های اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) شد و عصاره های تغلیظ شده به دست آمد. عصاره-های تغلیظ شده در ظروف تیره استریل آلومینیمی ریخته شد و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۹، ۱۰).

جهت استاندارد کردن روش و تکرار پذیری و به منظور مقایسه و ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره‌های استخراج شده به وسیله آب مقطر و اتانول ۹۶ درجه، وزن خشک عصاره‌ها تعیین شد. بدین طریق که برای هر کدام از عصاره‌ها یک لوله آزمایش خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس(۰/۰۰۰۱) وزن شد، سپس از عصاره تغلیظ شده ۱ میلی لیتر به لوله اضافه و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی گراد) محتوی لوله‌ها در دمای اتاق خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره، وزن لوله آزمایش مجددا تعیین شد. اختلاف وزن لوله معادل با وزنml ۱ از عصاره های آبی یا اتانولی بود. میانگین سه بار تکرار، به عنوان وزن خشک عصاره محاسبه گردید (۱۱، ۱۲).

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت تازه از هر میکروارگانیسم بود. بنابراین ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیبدار نوترینت آگار تلقیح انجام شد، سپس کشت مربوطه توسط محلول رینگر شستشو و سوسپانسیون میکروبی تهیه گردید. مقداری از این سوسپانسیون میکروبی در لوله آزمایش حاوی محلول رینگر استریل ریخته شد و کدورت آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شد. و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق شد. سوسپانسیون تولیدی باید حاوی 1.5×10^{8} CFU/ml باکتری باشد (۱۳).

فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا با استفاده از دو روش پخش عصاره در سطح محیط کشت (تمام ظرف) و روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی شد. در روش تمام ظرف ۰/۲ گرم از عصاره آبی و اتانولی به ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و برای یکنواخت شدن به

کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. سپس ۱ میلی لیتر از این محلول به ظرف های پتری استریل اضافه و غلظت نهایی عصاره در این حالت به mg/ml ۲ می‌رسد (۱۴). در مرحله بعد محیط کشت استریل مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به ظرف-های پتری اضافه شده و در دمای اتاق قرار گرفت تا اینکه محیط کشت‌ها ببندند. یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. از محیط دارای عصاره و بدون باکتری نیز به عنوان کنترل استفاده گردید (۱۴). در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط‌ها کشت داده شد سپس دیسک‌های کاغذی (جنس صافی واتمن و به قطر ۶ میلی متر) با غلظت های mg/ml ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ عصاره‌ها درآب مقطر استریل تهیه و با عصاره حرا آغشته گشت و توسط پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شد و با کمی فشار بر روی محیط کشت ثابت گردید. بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد با استفاده از خط کش به طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. تمامی آزمایشات با ۳ تکرار انجام گرفت (۱۵).

با استفاده از روش رقت لوله‌ای، حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا تعیین گردید. برای تعیین MIC برای هر عصاره از یک سری ۸ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۷ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنترل بکار رفت. پس از کشت تمام لوله های آزمایش به مدت ۲۴ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردیدند. پس از طی زمان گرمخانه گذاری لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم‌های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، این روش برای هر دو عصاره آبی و اتانولی و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد (۱۶).

حداقل غلظت کشندگی(MBC) با استفاده از روش رقت لوله-ای برای عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا تعیین گردید. برای تعیین MBC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت های مختلف از هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنترل بکار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از طی زمان گرمخانه گذاری لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم‌های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، از تمام لوله‌های که هیچ رشدی در آن‌ها مشاهده نشده بود نمونه برداری و جهت تعیین MBC کشت داده شدند. لوله‌ای که حاوی کم‌ترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد. این روش برای هر دو عصاره آبی و اتانولی و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار گردید (۱۷).

برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری SPSS تحت نسخه ۱۸ استفاده شد، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) جهت مقایسه میانگین‌ها و از آزمون Duncanجهت بررسی اختلاف بین میانگین‌ها در سطح $p < ۰/۰۵$ استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی به روش پخش عصاره در سطح محیط کشت (تمام ظرف) در (جدول ۱) آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره اتانولی درغلظت mg/ml ۲ بر *سالمونلا تیفی*، *لیستریا مونوسایتوژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* کاملا موثر بوده و از رشد آن‌ها بر محیط کشت جلوگیری به عمل آورد، اما عصاره اتانولی بر *انتروباکتر ائروژینوزا* اثر بازدارندگی را در غلظت mg/ml۲ نشان نداد. عصاره آبی برگ گیاه حرا درغلظت mg/ml ۲ بر *باسیلوس سرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* تاثیر داشت و از رشد آن‌ها بر محیط کشت جلوگیری به عمل آورد اما بر *انتروباکتر ائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی* و *لیستریا مونوسایتوژنز* اثر بازدارندگی نشان نداد.

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا به روش انتشار در آگار در (جدول ۲) آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره اتانولی

برگ گیاه حرا در تمامی غلظت‌ها (mg/ml ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و۴۰) بر *باسیلوس سرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* اثر بازدارندگی داشت، اما عصاره اتانولی برگ گیاه حرا در غلظت‌های (mg/ml ۵، ۱۰ و ۱۵) فاقد اثر بازدارندگی بر *سالمونلا تیفی* و *لیستریا مونوسایتوژنز* بود، همچنین عصاره اتانولی برگ گیاه حرا فقط در غلظت‌های (mg/ml ۳۰، ۳۵ و۴۰) داری اثر بازدارندگی بر *انتروباکتر ائروژینوزا* داشت و در سایر غلظت‌ها هاله بازدارندگی مشاهده نشد. عصاره آبی برگ گیاه حرا در غلظت‌های (mg/ml ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰) بر *باسیلوس سرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* موثر بود و از رشد این باکتری‌ها جلوگیری کرد، اما در غلظت‌هایmg/ml ۵ و ۱۰ اثر بازدارندگی مشاهده نشد. عصاره آبی برگ گیاه حرا در غلظتmg/ml ۴۰ اثر ضد باکتریایی بر *انتروباکتر ائروژینوزا* نشان داد و در سایر غلظت‌ها هیچ اثر بازدارندگی مشاهده نشد. همچنین عصاره آبی برگ گیاه حرا در غلظت‌های (mg/ml ۲۵، ۳۰، ۳۵ و۴۰) بر *سالمونلا تیفی* و *لیستریا مونوسایتوژنز* موثر بود و توانست از رشد این باکتری‌ها روی محیط کشت جلوگیری کند.

نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا در (جدول ۳) آورده شده است. نتایج نشان می دهد MIC عصاره اتانولی برگ گیاه حرا برای *باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی و انتروباکتر ائروژینوزا* به ترتیب mg/ml ۴، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ بود، در حالی که MIC عصاره آبی برای *باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی و انتروباکتر ائروژینوزا* به ترتیب به ترتیب mg/ml ۸، ۸، ۱۶، ۶۴ و ۱۲۸ بود.

نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی عصاره های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا در (جدول ۴) آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد MBC عصاره اتانولی برگ گیاه حرا برای *باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی و انتروباکتر ائروژینوزا* به ترتیب mg/ml ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ بود، در حالی که MBC عصاره آبی برای *باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی و انتروباکتر ائروژینوزا* به ترتیب به ترتیب mg/ml۸، ۱۶، ۳۲، ۱۲۸ و ۲۵۶ بود.

جدول ۱. اثر ضد میکروبی غلظت mg/ml ۲ عصاره های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا بر *باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی و انتروباکتر ائروژینوزا* (روش پخش در سطح محیط کشت)

میکروارگانیسم	عصاره آبی برگ گیاه حرا
باسیلوس سرئوس PTCC 1154	+
انتروکوکوس فکالیس PTCC 1237	+
لیستریا مونوسایتوژنز PTCC 1297	-
سالمونلا تیفی PTCC 1609	-
انتروباکتر ائروژینوزا PTCC 1221	-

میکروارگانیسم	عصاره اتانولی برگ گیاه حرا
باسیلوس سرئوس PTCC 1154	+
انتروکوکوس فکالیس PTCC 1237	+
لیستریا مونوسایتوژنز PTCC 1297	+
سالمونلا تیفی PTCC 1609	+
انتروباکتر ائروژینوزا PTCC 1221	-

- علامت (+) نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم بر محیط کشت و وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا می باشد.
- علامت (-) نشان دهنده رشد میکروارگانیسم بر محیط کشت و عدم وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا می باشد.

جدول۲. میانگین قطر هاله عدم رشد بر *باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی و انتروباکتر ائروژینوزا* برحسب میلی متر در حضور عصاره های اتانولی و آبی برگ گیاه حرا (انتشار در آگار)

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه حرا (mg/ml)							
		۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
اتانولی	*باسیلوس سرئوس*	^{a}۰/۵۷±۸/۱۰	^{b}۰/۵۷±۱۰/۲۰	^{c}۰/۵۷±۱۲/۶۰	^{d}۰/۵۰±۱۴/۹۰	^{e}۰/۵۷±۱۶/۴۰	^{f}۰/۵۰±۱۸/۸۰	^{g}۰/۵۷±۲۰/۹۰	^{h}۰/۵۲±۲۲/۷۰
اتانولی	*انتروکوکوس فکالیس*	^{a}۰/۵۷±۸/۰۰	^{b}۰/۲۸±۹/۸۰	^{c}۰/۵۲±۱۱/۶۰	^{d}۰/۵۰±۱۳/۵۰	^{e}۰/۵۷±۱۵/۰۰	^{f}۰/۵۰±۱۶/۸۰	^{g}۰/۵۲±۱۹/۰۰	^{h}۰/۵۰±۲۱/۰۰
اتانولی	*لیستریا مونوسایتوژنز*	-	-	-	^{a}۰/۵۷±۸/۳۰	^{b}۰/۵۷±۹/۹۰	^{c}۰/۵۳±۱۱/۷۰	^{d}۰/۵۷±۱۴/۰۰	^{e}۰/۵۰±۱۵/۸۰
اتانولی	*سالمونلا تیفی*	-	-	-	^{a}۰/۵۲±۸/۰۰	^{b}۰/۵۷±۹/۸۰	^{c}۰/۵۳±۱۱/۵۰	^{d}۰/۵۳±۱۳/۳۰	^{e}۰/۵۳±۱۴/۹۰
اتانولی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	^{a}۰/۵۳±۷/۵۰	^{a}۰/۵۳±۸/۸۰	^{a}۰/۵۳±۹/۹۰
آبی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	^{a}۰/۵۷±۷/۶۰	^{b}۰/۵۲±۹/۳۰	^{c}۰/۵۷±۱۱/۱۰	^{d}۰/۵۰±۱۳/۰۰	^{e}۰/۵۷±۱۴/۸۰	^{f}۰/۵۲±۱۶/۶۰
آبی	*انتروکوکوس فکالیس*	-	-	^{a}۰/۲۸±۷/۲۰	^{b}۰/۵۷±۸/۸۰	^{c}۰/۵۷±۱۰/۵۰	^{d}۰/۵۰±۱۲/۱۰	^{e}۰/۵۷±۱۴/۰۰	^{f}۰/۵۰±۱۵/۹۰
آبی	*لیستریا مونوسایتوژنز*	-	-	-	-	^{a}۰/۵۷±۸/۰۰	^{b}۰/۵۳±۱۰/۱۰	^{c}۰/۵۷±۱۲/۰۰	^{d}۰/۵۰±۱۳/۸۰
آبی	*سالمونلا تیفی*	-	-	-	-	^{a}۰/۵۷±۷/۳۰	^{b}۰/۵۷±۸/۹۰	^{b}۰/۵۷±۹/۶۰	^{b}۰/۵۷±۱۰/۹۰
آبی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	-	^{a}۰/۵۷±۷/۹۰

- علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا می باشد.
- حروف مشابه در یک ردیف نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار بودن در سطح $p < 0/05$ است.

جدول۳. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره های اتانولی و آبی عصاره برگ گیاه حرا بر *باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی و انتروباکتر ائروژینوزا*

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه حرا (mg/ml)							
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	کنترل
اتانولی	*باسیلوس سرئوس*	-	+	+	+	+	+	+	-
اتانولی	*انتروکوکوس فکالیس*	-	+	+	+	+	+	+	-
اتانولی	*لیستریا مونوسایتوژنز*	-	-	+	+	+	+	+	-
اتانولی	*سالمونلا تیفی*	-	-	-	+	+	+	+	-
اتانولی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	+	+	+	-
آبی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	+	+	+	+	+	-
آبی	*انتروکوکوس فکالیس*	-	-	+	+	+	+	+	-
آبی	*لیستریا مونوسایتوژنز*	-	-	-	+	+	+	+	-
آبی	*سالمونلا تیفی*	-	-	-	-	-	+	+	-
آبی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	+	-

+ : عدم رشد

- : رشد

جدول۴- نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های اتانولی و آبی عصاره برگ گیاه حرا بر *باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی و انتروباکتر ائروژینوزا*

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه حرا (mg/ml)								
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
اتانولی	*باسیلوس سرئوس*	-	+	+	+	+	+	+	+	-
اتانولی	*انتروکوکوس فکالیس*	-	-	+	+	+	+	+	+	-
اتانولی	*لیستریا مونوسایتوژنز*	-	-	-	+	+	+	+	+	-
اتانولی	*سالمونلا تیفی*	-	-	-	-	+	+	+	+	-
اتانولی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	+	+	+	-
آبی	*باسیلوس سرئوس*	-	-	+	+	+	+	+	+	-
آبی	*انتروکوکوس فکالیس*	-	-	-	+	+	+	+	+	-
آبی	*لیستریا مونوسایتوژنز*	-	-	-	-	+	+	+	+	-
آبی	*سالمونلا تیفی*	-	-	-	-	-	-	+	+	-
آبی	*انتروباکتر ائروژینوزا*	-	-	-	-	-	-	-	+	-

+ : عدم رشد

- : رشد

بحث

علی رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه بهداشت و کاربرد تکنیک‌های نوین، یکی از مهم‌ترین چالش‌های درمانی مقابله با عوامل ایجاد کننده بیماری‌های عفونی و مسمومیت به دلیل شیوع و گسترش بالای آن می‌باشد (۱۸). افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، بشر را مجبور به استفاده ازترکیبات ضد میکروبی طبیعی و جدید کرده است. لذا در این پژوهش آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی و کشندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا (بومی مناطق جنوب ایران) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا داری اثر بازدارندگی و کشندگی مناسبی بر روی تعدادی از باکتری‌های عامل عفونت و مسمومیت دارد، به نحوی که نتایج تجزیه آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) نشان داد، که با افزایش غلظت هریک از عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا، هاله بازدارندگی به طور معنی داری در سطح $p < ۰/۰۵$ افزایش پیدا کرد، به طوری که نتایج مقایسه دو به دو میانگین غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه حرا نشان داد، که میان کلیه سوش‌های باکتریایی مورد بررسی در این پژوهش به استثنا باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژینوزا* اختلاف معتی داری وجود دارد (جدول ۲). سدیک و همکاران (۲۰۰۲) فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های مریم گلی، آویشن، پونه کوهی و زیره سبز را بر رشد *اشرشیا کلی* مورد مطالعه قرار دادند. برای این منظور از آزمون دیسک‌های کاغذی و محیط کشت مایع استفاده شد. آن‌ها دریافتند میزان بازدارندگی و اثر ضد باکتریایی این اسانس‌ها با میزان غلظت آن‌ها تغییر می‌کند. به طوری که با افزایش غلظت‌ها هاله بازدارندگی و در نتیجه اثر کشندگی اسانس‌ها افزایش پیدا می‌کند نتایج این پژوهشگران با یافته‌های این پژوهش همخوانی داشت (۱۹).

اثر ضد میکروبی هر دو عصاره اتانولی و آبی بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود، به طوری که باکتری‌های گرم مثبت *لیستریا مونوسایتوژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* نسبت به باکتری‌های گرم منفی *انتروباکتر ائروژینوزا* و *سالمونلا تیفی* حساسیت بیشتری را نشان دادند (جدول ۱ و ۲) و در غلظت کمتری از عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا اثر بازدارندگی نشان دادند. این نتایج با نتایج پژوهشی که توسط طباطبایی یزدی و علیزاده بهبهانی (۲۰۱۳) در رابطه با اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه کلپوره بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انجام گرفت همخوانی داشت، این پژوهشگران بیان داشتند که به طور کلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی داری حساسیت بیشتری نسبت به عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه کلپوره دارا هستند و علت آن را اختلاف ساختمانی دیواره باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی ذکر کردند (۲۰).

نتایج نشان می دهد که عصاره اتانولی برگ گیاه حرا در مقایسه با عصاره آبی برگ گیاه حرا اثر بازدارندگی بیشتری روی سوش های مورد مطالعه دارد. که علت آن را می‌توان به درصد استحصال بیشتر عصاره اتانولی برگ گیاه حرا نسبت به عصاره آبی برگ گیاه حرا و در نتیجه استخراج بیشتر مواد موثر در برگ گیاه حرا توسط حلال اتانول باشد. این نتایج با نتایج مطالعه‌ای که توسط علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۲) در رابطه با بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و گلیسرینی برگ گیاه حرا بر *پنی سیلیوم دیجیتاتوم* انجام گرفت همخوانی دارد، این پژوهشگران گزارش دادند که به دلیل استخراج بیشتر عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ گیاه حرا توسط این دو حلال و در نتیجه استخراج بیشتر مواد موثر و به دنبال آن افزایش وزن خشک عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ گیاه حرا به مراتب اثر بازدارندگی و کشندگی بیشتری بر سویه مورد مطالعه دارد (۲۱). همچنین این نتایج با نتایج مطالعه‌ای که توسط علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳) در مورد بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ *اکالیپتوس کامالدونسیس* بر میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت در شرایط آزمایشگاهی انجام پذیرفت همخوانی داشت (۲۲).

نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا نشان داد که بیشترین مقاومت را نسبت به عصاره‌های آبی و اتانولی مربوط به باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژینوز* می-

باشد. به نحوی که MIC عصاره آبی و اتانولی به *ترتیب* mg/ml ۱۲۸ و۳۲ و MBC عصاره آبی و اتانولی نیز در خصوص *انتروباکتر ائروژینوزا به ترتیب* mg/ml ۲۵۶ و ۶۴ بود. علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۲) اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا (*Avicennia marina*) بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس پایوژنز* و *پسودوموناس آئروژینوزا* در شرایط آزمایشگاهی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که MIC عصاره اتانولی برگ گیاه حرا برای *استرپتوکوکوس پایوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب mg/ml ۸، ۸ و ۱۶ بود، در حالی که MIC عصاره آبی برای *استرپتوکوکوس پایوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب mg/ml ۱۶، ۱۶ و ۳۲ بود. همچنین MBC عصاره اتانولی برگ گیاه حرا برای *استرپتوکوکوس پایوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب mg/ml ۱۶، ۱۶ و ۳۲ بود، در حالی که MBC عصاره آبی برای *استرپتوکوکوس پایوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب mg/ml ۳۲، ۳۲ و ۶۴ بود. این محققان گزارش دادند که بیشترین مقاومت نسبت به عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا مربوط به باکتری گرم منفی *پسودوموناس آئروژینوزا* است که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد (۵).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا در شرایط *"in vitro"* اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر سویه‌های مورد مطالعه داشت. در ادامه لازم است مطالعات وسیع‌تر و دامنه داری در شرایط *"in vivo"* انجام گیرد، لذا تعیین فراکسیون‌های تشکیل دهنده اجزا برگ گیاه حرا و بررسی اثر ضد میکروبی هریک از این اجزاء و تعیین دوز مؤثر این عصاره لازم و ضروری به نظر می رسد و در نهایت بتوان از عصاره این گیاه به عنوان یک ماده ضد میکروبی طبیعی و جدید در زمینه پزشکی و دارویی بهره برد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از خانم مهندس حیدری سورشجانی و خانم مهندس خادمی پور که در انجام آزمایش‌ها و جمع آوری نمونه‌ها ما را یاری نمودند، قدردانی می‌شود. مقاله علمی-پژوهشی حاضر مستخرج از پایان نامه دانشجویی با عنوان بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا در شرایط آزمایشگاهی با کد ۳/۲۴۱۵۸ در گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد.

منابع

1- Basak Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology 2004; 94: 223-53.

2- Badola R, Hussain S. Valuing ecosystem functions: an empirical study on the storm protection function of Bhitarkanika mangrove ecosystem, India. Environmental Conservation 2005; 32: 85-92.

3- Tajbakhsh S, Mahmoud pour M, Haghighi MA. Antimicrobial effect of Avicennia marina extract on Staphylococcus aureus, Escherichia coli and pseudomonas aeruginosa (Persian). Iranian South Medical Journal 2005; 8: 1-7.

4- Chen JD, Feng DQ, Yang ZW, Wang ZC, Qiu Y, Lin YM. Antifouling metabolites from the mangrove plant Ceriops tagal. Molecules 2008; 13: 212-9.

5- Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M. Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic Avicennia marina extracts on Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes and Pseudomonas aeruginosa" in vitro" (Persian). Iranian South Medical Journal, Article in Press.

6- Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M. Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus “in vitro”. International Journal of Agronomy and Plant Production 2013; 4:1652-8.
7- Aguado V, Vitas A, Garcıa-Jalón I. Characterization of Listeria monocytogenes and Listeria innocua from a vegetable processing plant by RAPD and REA. International Journal of Food Microbiology 2004; 90: 341-7.
8- Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food microbiology: fundamentals and frontiers: ASM Press Washington, DC; 2001, 1-200.
9- Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. Journal Ethnopharmaco 2001; 74: 113-23.
10- Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Shahidi F, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of Satureja bachtiarica extracts aqueous and ethanolic on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Scientific Journal of Biological Sciences 2013; 2: 24-31.
11- Sattari M, Shahbazi A, Najarpyrayh SH. Antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts of eucalyptus on Pseudomonas aeruginosa (Persian). Modares journal Medical Science 1384; 8: 19-23.
12- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mortazavi A. Antimicrobial effects of Lavandula stoechas L. and Rosmarinus officinalis L. extracts on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Scientific Journal of Microbiology 2013; 2: 15-22.
13- Valero M, Salmeron M. Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. International Journal of Food Microbiology. 2003; 85(1): 73-81.
14- Babayi H, Kolo I, Okogun J, Ijah U. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. Biokemistri 2004; 16(2): 106-11.
15- Bauer A, Kirby W, Sherris JC, turck, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American journal of Clinical Pathology. 1966; 45(4): 493-6.
16- Benger S, Townsend P, Ashford RL, Lambert P. An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of Melaleuca alternifolia against the dermatophyte Trichophyton rubrum. The Foot. 2004; 14(2): 86-91.
17- Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for Aspergillus spp.: NCCLS collaborative study. Journal of Clinical Microbiology. 2002; 40(9): 3204-8.
18- Trick WE, Weinstein RA, DeMarais PL. Colonization of skilled-care facility residents with antimicrobial-resistant pathogens. Journal of the American Geriatrics Society 2001; 49: 270-6.
19- Sagdic O, Kuscu A, Ozcan M, Ozcelik S. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of Escherichia coli O157: H7. Food Microbiology 2002; 19: 473-80.
20- Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic Teucrium polium L. extracts on gram positive and gram negative bacteria

"in vitro". Journal of Paramedical Sciences 2013; 4: 2008-4978.

21- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. Antimicrobial activity of Avicennia marina extracts ethanol, methanol & glycerin against Penicillium digitatum (citrus green mold). Scientific Journal of Microbiology 2012; 1: 147-51.

22- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM, Vasiee A. Effect of aqueous and ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis L. on food infection and intoxication microorganisms "in vitro". Journal of Paramedical Sciences 2013; 4: 2008-4978.