magiran.com

مقایسه اثر ضدباکتریایی عصارهٔ متانولی جفت دانهٔ بلوط با آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی روده‌ای

دکتر آذردخت خسروی[1]، دکتر آتوسا بهزادی[2]

چکیده

مقدمه: افزایش سریع مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌خصوص در بین باکتری‌های گرم منفی، محققین را تشویق به یافتن جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های غیرمؤثر نموده است و در این مورد گیاهان دارویی که تأثیر ضدمیکروبی آنان از قبل شناخته شده است، انتخاب مناسبی به‌نظر می‌رسند. از آنجا که جفت دانه بلوط سالها است در طب سنتی برای درمان اسهال به‌کار می‌رود، لذا هدف مطالعه بررسی تأثیر عصارهٔ متانولی این گیاه بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی روده‌ای و مقایسهٔ آن با برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج بود.

روش کار: عمل عصاره‌گیری از جفت دانهٔ بلوط با استفاده از حلال متانول و با روش خیساندن انجام شد. عصارهٔ حاصل توسط دستگاه تقطیر در خلاء، تغلیظ شده و رقت‌های مورد آزمایش از عصارهٔ خشک تهیه گردید. سپس اثر ضدمیکروبی رقت‌های تهیه شده به دو روش حداقل غلظت مهارکننده و انتشار دیسک، بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی، شیگلا، سالمونلا و پروتئوس مورد بررسی قرار گرفت. پس از آن اثر ضدمیکروبی گیاه با سه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید مقایسه گردید.

نتایج: تأثیر این عصاره بر باکتری‌های پروتئوس و اشریشیاکلی متناسب با افزایش غلظت، افزایش یافته بود. حال آنکه تأثیر عصاره بر باکتری‌های شیگلا و سالمونلا رابطهٔ معنی‌داری با افزایش غلظت آن نداشت. بررسی‌های انجام شده نشان داد که عصارهٔ جفت دانهٔ بلوط، در برخی غلظت‌ها دارای تأثیر بیشتر یا مشابهی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و کوتریموکسازول می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در یک نگاه کلی اگرچه خاصیت ضدمیکروبی قابل توجه جفت دانهٔ بلوط مورد توجه است، براساس مطالعات، تأثیر آن در درمان آسیب‌های گوارشی می‌تواند در ارتباط با وجود تانن‌ها نیز باشد که موجب جذب آب و رسوب پروتئین‌ها در روده می‌گردند.

واژگان کلیدی: جفت دانه بلوط، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سالمونلا، پروتئوس، اشریشیاکلی

مقدمه:

تحقیقات بسیار در قرن بیستم زمینه‌ساز تهیه صدها آنتی‌بیوتیکی شده است که امروزه به‌طور وسیع مصرف می‌گردند (۳و۲و۱). علی‌رغم ارزش برجسته بالینی آنتی‌بیوتیک‌ها، پیدایش مقاومت (۷و۶و۵و۴) و نیز عوارض حاصله از آنتی‌بیوتیک‌ها، مصرف آنان را محدود نموده و لزوم تهیه‌مواد ضدمیکروبی درمانی با خواص فارماکوکینتیک بهتر را ایجاب نموده است (۸و۷). از دهه ۱۹۵۰، باکتری‌های بیماری‌زای متعددی به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند و میزان مقاومت در طول زمان در حال افزایش است (۹). گیاهان عالی می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند. بشر نیز از دیرباز به دنبال شناسایی گیاهان و چگونگی استفاده از آنان بوده است تا بتواند گیاهانی را که مفید یا مضر بوده‌اند از یکدیگر تفکیک نماید (۱۰). گیاهان نه تنها قسمت وسیعی از

۱ـ استادیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اهواز.
۲ـ دکترای داروسازی.

magiran.com

پوشش گیاهی جهان را تشکیل می‌دهند بلکه از نظر اقتصادی نیز مقرون به‌صرفه بوده و عوارض جانبی و مشکلات کمتری به همراه دارند به همین دلیل بررسی در این زمینه در مراکز علمی و پژوهشی متعددی ادامه دارد(۱۱).

این تحقیق باتوجه به موارد فوق و ارزش اثرات ضدباکتریایی گیاهان، روی گیاه بلوط انجام گرفت. گیاه بلوط دارای جنس‌های متعددی است که معروف‌ترین آنها عبارت از فاگوس با ۱۰ گونه، کاستانیا با ۱۲ گونه و کوئروس با ۴۵ گونه می‌باشد که اکثر این جنس‌ها، گستردگی زیادی در جنگل‌های شمال البرز و جنگل‌های زاگرس دارند. جنگل‌های زاگرس غالباً از گونه‌های مختلف بلوط تشکیل یافته و در بسیاری از نقاط به‌صورت جامعهٔ خالص رویش دارد. گونهٔ کوئروس برانتی در جنگل‌های منطقهٔ چهارمحال و بختیاری مستقر است و گونهٔ غالب این جنگل‌ها را تشکیل می‌دهد (۱۲). از جفت دانهٔ این گونه از گیاه بلوط، به عنوان داروی درمان کنندهٔ اسهال به طریق سنتی در ایران به‌خصوص در جنوب و غرب کشور استفاده می‌گردد (۱۳). باتوجه به این‌که اصلی‌ترین مادهٔ مؤثر موجود در جفت دانهٔ بلوط (تانن)، دارای خاصیت قابض و نیز ضدعفونی کننده می‌باشد و تاکنون تحقیقی در مورد اثر ضدمیکروبی این گیاه در جهان و ایران انجام نشده است لذا این تحقیق برای نخستین‌بار به بررسی اثر ضدمیکروبی عصارهٔ جفت دانهٔ بلوط می‌پردازد.

روش کار

در این تحقیق میوه‌های گیاه بلوط در ماههای مهر و آبان از منطقهٔ لردگان واقع در استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری گردید. پس از شستشو و خشک کردن و جداکردن جفت دانه‌ها، ۵۰ گرم از آن به قطعات کوچک خرد شده و پس از توزین مجدد، عصاره‌گیری به روش ماسراسیون سرد[1] (۱۴) یا خیساندن در دمای پائین انجام گرفت. بدین‌ترتیب که به قطعات جفت دانه، ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درجه اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در محل ثابتی، در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از این مدت عصاره با عبور از کاغذ صافی واتمن شماره ۳ صاف گردیده و با انتقال به دستگاه تقطیر در خلاء با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، تغلیظ گردید و برای خشک شدن کامل، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. رقت‌های مختلف ۱، ۳۰، ۶۰، ۸۰ درصد (به ترتیب ۲/۸، ۸۴، ۱۶۸، ۲۲۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از عصاره با حل مقادیر محاسبه شده از عصارهٔ خشک در متانول ۷۰ درجه تهیه گردید. عصاره‌های تهیه شده جهت جلوگیری از تبخیر حلال، در ظروف استریل با درپوش پارافین در یخچال نگهداری شدند. جهت تهیه دیسک‌های حاوی رقت‌های مختلف عصاره، دیسک‌های کاغذی بلانک (شرکت پادتن طب) از عصاره اشباع گردیده و جهت تبخیر حلال، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. این دیسک‌ها تا زمان استفاده در شیشه‌های استریل درپیچ‌دار نگهداری گردیدند.

سویه‌های میکروبی مورد مطالعه عبارت از اشریشیا کلی، سالمونلا، شیگلا و پروتئوس میرابیلیس بودند که از هر سویه ۵نمونه از آزمایشگاه بیمارستان گلستان اهواز گرفته شده و به گروه میکروب‌شناسی منتقل گردید. این باکتری‌ها توسط روش‌های استاندارد کشت و تست‌های بیوشیمیایی، مورد تأیید مجدد قرار گرفتند(۱۵).

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی مورد استفاده در تست حساسیت، چند کلونی میکروبی به محیط آبگوشتی تریپتیکاز سوی براث[2] منتقل گردیده و به مدت ۶-۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت با مقایسه و تنظیم کدورت آن با استاندارد مک‌فارلند[3] ۰/۵ (۱۵)، سوسپانسیون برای انجام تست حساسیت کمی و برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده[4] و کشنده[5] عصاره و نیز تست حساسیت کیفی انتشار در آگار[6] آماده گردید.

1. Cold maceration.
2. Tripticase soy broth (TSB).
3. Mc Farland.
4. Minimal Inhibitory Concentration (MIC).
5. Minimal Bacteriocidal Concentration (MBC).
6. Disc diffusion method.

magiran.com

جهت انجام تست حساسیت برای تعیین MIC و MBC، از غلظت خاص عصاره، رقت‌های مختلف تهیه گردید و سپس از سوسپانسیون میکروبی استاندارد شده یک‌میلی‌لیتر (حاوی $1/5\times10^8$ میکروارگانیسم) به هر لوله اضافه گردید و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت اولین لوله‌ای که عدم رشد را نشان داد به عنوان غلظت MIC عصاره تلقی گردید. جهت تعیین MBC، لوله‌هائی که عدم رشد را نشان داده بودند بر روی محیط مولرهینتون آگار[1] کشت گردیده و پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد غلظتی که به‌طور کامل عدم رشد را نشان داد به عنوان MBC عصاره ثبت گردید.

پس از تهیه غلظت‌های مختلف از عصارهٔ متانولی جفت دانهٔ بلوط، غلظت‌های ۸۰ درصد، ۶۰ درصد و ۳۰ درصد برای انجام تست MIC مناسب تشخیص داده نشدند زیرا با محیط کشت ایجاد رسوب شیری رنگ می‌نمودند پس برای تعیین غلظت مناسبی که ایجاد رسوب ننماید عمل رقیق‌سازی انجام گرفت که نهایتاً در غلظت ۱ درصد رسوبی مشاهده نشد و لذا تست MIC و MBC، با این غلظت عصاره انجام شد.

تست آنتی‌بیوگرام انتشار در آگار به روش کربای‌بایر[2] انجام گرفت. از سوسپانسیون میکروبی بر روی دو محیط کشت مولرهینتون، کشت به روش سفره‌ای انجام گرفت و بر روی یکی از آنان دیسک‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره و در روی محیط کشت دیگر دیسک‌های آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید، کوتریموکسازول و جنتامایسین به‌منظور مقایسه اثر ضدمیکروبی قرار داده شد و هردو محیط کشت گرماگذاری گردیدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون با اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد و مقایسه آن با مقادیر تعیین شده در جداول استاندارد آنتی‌بیوگرام، حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موردنظر تعیین شد(۱۵). جهت حصول اطمینان کامل از صحت نتایج به‌دست آمده، آزمایش‌ها برای هر سویه باکتریایی پنج‌بار تکرار گردید.

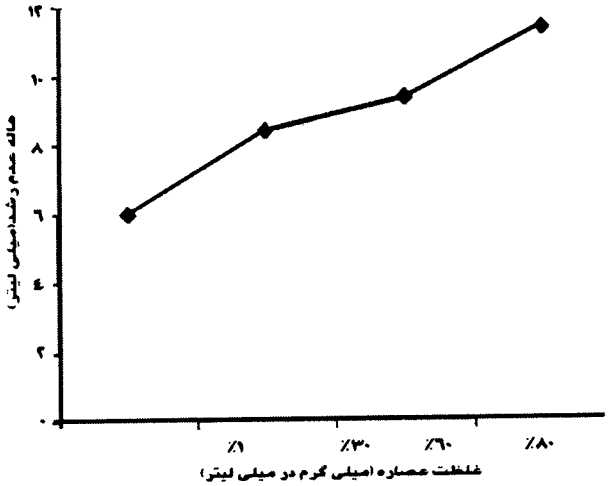
محاسبهٔ میانگین نتایج، انحراف معیار و بررسی اختلاف‌های معنی‌دار نتایج، توسط نرم‌افزار SPSS و آزمون t انجام پذیرفت.

نتایج

نتایج حاصل از تست MIC و MBC نشان داد که غلظت ۱٪ عصارهٔ متانولی جفت دانهٔ بلوط بر روی کلیه باکتری‌های مورد مطالعه اثر مهاری داشته و فاقد قدرت باکتریوسیدی می‌باشد.

نتایج به‌دست آمده از روش انتشار در آگار که از دیسک‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره استفاده گردید، نشان دهندهٔ این بود که افزایش قطر هاله عدم رشد در باکتری اشریشیاکلی در غلظت ۸۰ درصد معنی‌دار می‌باشد ($p<0/05$) ولی این افزایش قطر در غلظت‌های ۳۰ و ۶۰ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار است و نیز مشخص شد که عصارهٔ ۱ درصد، روی این باکتری بی‌تأثیر است (نمودار ۱).

نمودار ۱: مقایسه قطر هاله‌های ایجاد شده در اثر مصرف ۱/۰ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصارهٔ متانولی جفت دانهٔ بلوط بر روی باکتری اشریشیاکلی با روش انتشار دیسک



در مورد پروتئوس میرابیلیس هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در افزایش قطر هاله عدم رشد در اثر استفاده از غلظت‌های ۳۰

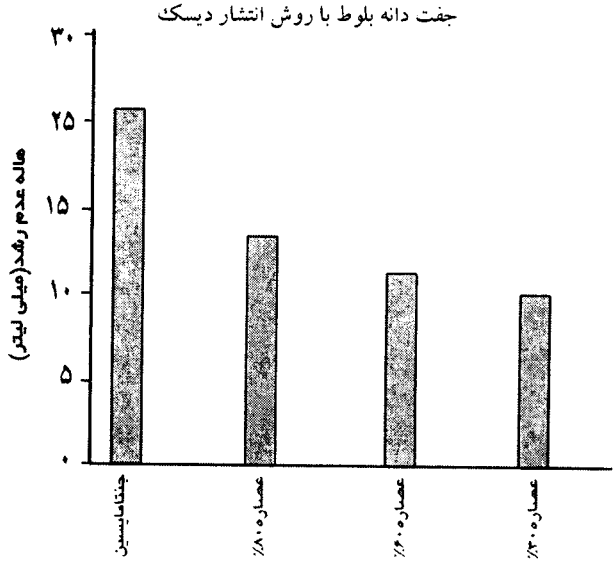
1.Muller Hinton agar.

2. Kirby Bauer.

magiran.com

و ۶۰ درصد مشاهده نشد ولی افزایش قطر هاله عدم رشد در غلظت ۸۰ % دارای اختلاف معنی‌داری است ($p<0/01$). (شکل ۱).

شکل ۱: مقایسه قطر هاله‌های ایجاد شده در باکتری پروتئوس براثر استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و غلظت‌های مختلف عصارهٔ متانولی جفت دانه بلوط با روش انتشار دیسک



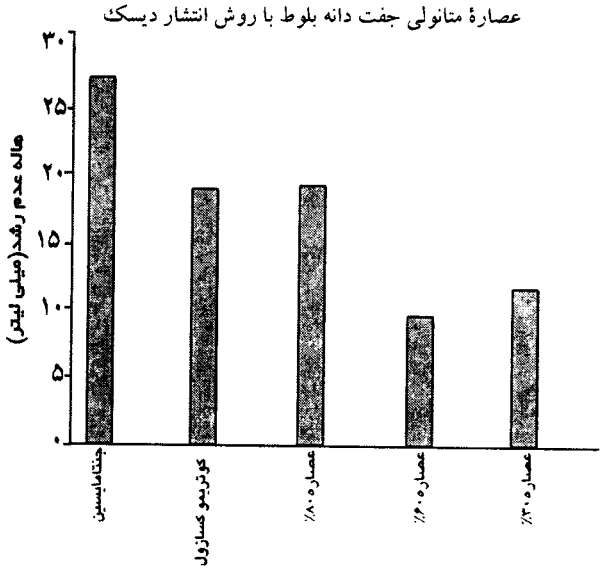
افزایش قطر هاله عدم رشد در سالمونلا در اثر غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ درصد معنی‌دار است ($p<0/01$). در تأثیر غلظت‌های ۶۰ و ۳۰ درصد عصاره، برشیگلا اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و عصاره‌های ۸۰ درصد و ۱ درصد نیز فاقد تأثیر برشیگلا می باشند.

در ادامهٔ تحقیق اثر سه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید روی باکتری‌های موردنظر بررسی گردید و با تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره مقایسه شد.

نتایج نشان داد که هرچهار باکتری مورد آزمایش، دارای مقاومت بالائی نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند به‌طوری که مثلاً در باکتری اشریشیا کلی در مورد آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و کوتریموکسازول هیچ‌گونه هاله عدم رشدی ملاحظه نشد و در رابطه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نیز هاله ایجاد شده از میزان استاندارد لازم برای تعیین حساسیت باکتری بسیار کمتر بود که در مجموع مبین مقاومت این باکتری به هر سه آنتی‌بیوتیک است.

در مورد باکتری سالمونلا افزایش قطر هاله عدم رشد برای جنتامایسین نسبت به غلظت ۸۰ درصد عصاره، دارای اختلاف معنی‌داری است ($p<0/01$) (شکل ۲) و در مقایسه، همین غلظت عصاره با اثر کوتریموکسازول بر روی سالمونلا فاقد اختلاف معنی‌دار بود. افزایش قطر هاله عدم رشد در سالمونلا، در رابطه با جنتامایسین و کوتریموکسازول نسبت به غلظت‌های ۶۰ درصد و ۳۰ درصد عصاره، اختلاف معنی‌داری دارد ($p<0/01$).

شکل ۲: مقایسه قطر هاله‌های ایجاد شده در باکتری سالمونلا براثر استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و کوتریموکسازول و غلظت‌های مختلف عصارهٔ متانولی جفت دانه بلوط با روش انتشار دیسک



دربارهٔ شیگلا نتایج نشان می‌دهد که هیچ‌یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده روی آن مؤثر نیستند. در رابطه با پروتئوس میرابیلیس اثر جنتامایسین در مقایسه با عصاره‌های ۸۰ درصد و ۳۰ درصد گیاه، دارای اختلاف معنی‌داری است ($p<0/01$) و نیز افزایش قطر هاله عدم رشد در اثر جنتامایسین نسبت به عصارهٔ ۶۰ درصد نیز اختلاف معنی‌داری دارد ($p<0/05$). این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و کوتریموکسازول مقاومت نشان داد.

magiran.com

بحث

با توجه به اثرات مختلف جفت دانهٔ بلوط، از جمله اثر ضدمیکروبی آن در منابع مهم پزشکی سنتی (۱۲)، اثر ضدمیکروبی عصارهٔ متانولی این گیاه بر چهار باکتری سالمونلا، اشریشیاکلی، شیگلا و پروتئوس مورد بررسی قرار گرفت.

تأثیر عصارهٔ جفت دانه بلوط بر باکتری اشریشیاکلی متناسب با افزایش غلظت، افزایش یافته بود. همین‌طور در مورد باکتری پروتئوس با افزایش غلظت عصاره، افزایش اثر مشاهده گردید. ولی در باکتری‌های شیگلا و سالمونلا افزایش تأثیر عصاره، نامتناسب با افزایش غلظت آن بود. با توجه به بکاربردن شرایط کاملاً یکسان برای هرچهار باکتری در ارزیابی تأثیر عصارهٔ گیاهی بر آنان، شاید بتوان علت به‌دست آوردن نتایج متفاوت را در ماهیت باکتری و نحوهٔ رشد و تکثیر آنها جستجو کرد که اثبات این فرضیه خود می‌تواند گامی دیگر در ادامهٔ این تحقیق باشد.

در انتخاب آنتی‌بیوتیک‌ها جهت مقایسه با عصارهٔ گیاهی، سعی بر آن شد از آنتی‌بیوتیک‌هایی استفاده شود که در بیشتر نسخ دارویی، جهت درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی به چشم می‌خورد. در این تحقیق باکتری‌های گرم منفی مورد آزمایش، مقاومت دور از انتظاری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید و کوتریموکسازول نشان دادند که این خود می‌تواند دلیلی بر شکست درمان دارویی در مقابله با عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها باشد و باتوجه به تحقیقات انجام شده، سفالوسپورین‌ها و ترجیحاً سفالوسپورین‌های نسل سوم می‌توانند داروهای مناسب‌تر و مؤثرتری در درمان این‌گونه عفونت‌ها باشند (۱۶).

براساس نتایج حاصل، عصارهٔ جفت دانهٔ بلوط در کلیهٔ غلظت‌های به‌کار گرفته شده دارای تأثیر بیشتر یا مشابهی (تأثیر عصاره ۸۰ درصد بر سالمونلا مشابه باکوتریموکسازول بود) نسبت به دو آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید و کوتریموکسازول می‌باشد. ولی تأثیر همین غلظت عصاره، در باکتری‌های سالمونلا و پروتئوس در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین قابل توجه نیست.

باتوجه به مطالعاتی که پیش از این دربارهٔ مواد مؤثر موجود در جفت دانهٔ بلوط انجام شده است (۱۳)، می‌توان تانن را به عنوان فراوان‌ترین ترکیب موجود در آن درنظر گرفت که مهم‌ترین خاصیت آنها رسوب پروتئین‌ها است. تانن‌ها به حالت آزاد و به مقدار زیاد، مخاط را تحریک می‌نمایند و با مقادیر کم، پروتئین‌ها را در آستر مخاطی رسوب داده و در نتیجه از نفوذ سایر محرک‌ها به لایه‌های عمقی‌تر مخاط آسیب دیده، جلوگیری می‌کنند و بدین‌ترتیب به بهبود آنها کمک می‌نمایند. به خاطر این خاصیت، تانن‌ها به عنوان ضداسهال و نیز برای درمان برخی از سوختگی‌ها به‌کار می‌روند. همچنین با عمل مشابهی از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کنند زیرا پروتئین‌های لازم برای تغذیه باکتری‌ها از دسترسشان خارج شده و پروتئین‌های آنها نیز رسوب می‌نمایند(۱۷).

باتوجه به خصوصیات اصلی تانن‌ها، در این تحقیق می‌توان به علت ایجاد رسوب، با افزودن عصارهٔ گیاه به آبگوشت TSB پی برد. در این محیط همان‌گونه که اشاره شد، پروتئین به‌کار رفته پپتون می‌باشد که تانن موجود در عصاره به عنوان عامل رسوب آن، در نهایت سبب تشکیل رسوب شیری رنگی در لوله گردیده است. به این ترتیب با بررسی‌های انجام شده در این تحقیق می‌توان خاصیت جفت دانهٔ بلوط را در درمان ناراحتی‌های گوارشی به‌ویژه اسهال، در نتیجهٔ هردو ویژگی تانن یعنی رسوب دادن پروتئین‌ها و همچنین تأثیر ضدمیکروبی آن دانست.

از آنجاکه این تحقیق به صورت آزمایشگاهی انجام شده است و بنابراین تأثیر عصاره و آنتی‌بیوتیک بدون حضور و دخالت عوامل فیزیکی (مانند حرکات لولهٔ گوارش) و اثرات شیمیایی (مانند حضور آنزیمها، اسید معده، موکوس و غیره) در بدن به‌ویژه در دستگاه گوارش انسان صورت گرفته است لذا تفاوت‌هایی با محیط لولهٔ گوارش وجود دارد لذا پیشنهاد

magiran.com

می‌گردد، در ادامه این تحقیق، تأثیر این عصاره بر روی دستگاه گوارش موجودات زنده و سپس انسان مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

۱ـ عبقری ش. و همکاران (مترجمین). اصول طب داخلی هاریسون، عفونت‌های باکتریال، انتشارات آینده‌سازان، تهران، ۱۳۶۳: ۱۳-۱۱.

2. Osler. W. Chemotherapy, in: Thomas. C.G.A: Medical Microbiology, 8th ed., London: Baillier Tindall. 1983: 192.

۳ـ شفیعی ع. و همکاران، مبانی آنتی‌بیوتیک‌ها، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۱: ۶-۵.

4. Jensen G., Wandall DA., Garsler K. and et al. Antibiotic resistance in Shigella and Salmonella in region of Lithunia, Eur.- J.- Clin.- Microbiol.- Infect.- Dis. 1996; 15: 872-6.

5. Aseffa A., Gedlu E., Asmelash T., Antibiotic resistance of prevalent Salmonella and Shigella strains in Northwest Ethiopia. East.- Afr.- Med.- J.- 1997; 74: 708-13.

6. Guyoi A., Antibiotic resistance of Shigella in Monrovia. Trop.- Doct. 1996; 26: 70-1.

7. Yurdakok k., Sahin N., Ozmert E. and et al. Shigella gastroenteritis. Acta.- pediatr.- Jpn. 1997; 39: 681-3.

8. Niekel LG., Antimicrobial activity of vascular plants. Econ.- Bot. 1993; 13: 225.

9. Neu H.C., The cricis of antibiotic resistance,. Science 1992; 257: 1061-9.

۱۰ـ شریعت ص. و همکاران، گیاهان و داروهای طبیعی (مفردات پزشکی) چاپ اول، انتشارات مشعل، ۱۳۷۰: ۱۳۳-۱۳.

11. Reminton S., Pharmaceutical Sciences. 17 th ed., Eastan: Mack publishing Co., 1991: 932-8.

۱۲ـ زرگری ع.، گیاهان دارویی، چاپ دوم، جلد اول، انتشارات امیرکبیر، تهران، ۱۳۶۷: ۱۲-۱۰.

۱۳ـ امین غ.، گیاهان دارویی سنتی ایران، چاپ اول، انتشارات معاونت پژوهشی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، ۱۳۷۰: ۱۰-۸.

۱۴ـ شریعت ص.، عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی آنها، چاپ اول، انتشارات مانی، تهران، ۱۳۷۱: ۱۳-۳.

15. Finegold M.S., Diagnostic Microbiology, 9th ed., C. V. Mosby Co. 1994: 731-9.

16. Gross U., Tsehape H., Bednarek I. and et al, Antibiotic resistance in Salmonella enterica serotype typhimurium. Eur.- J.- Clin.- Microbiol.- Infect.- Dis. 1998; 17: 385-7.

۱۷ـ آزادبخت م.، رده‌بندی گیاهان دارویی بی‌گلبرگان، چاپ اول، نشر طبیب، تهران، ۱۳۷۸: ۶۳-۶۱.