دو فصلنامه
بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی
سال سوم، شماره ۱ و ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۳

مقایسه اثرات ضد میکروبی ساقه و برگ *Daphne oleoides* در دو فصل بهار و تابستان بر سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923)

محمد مهدی دهشیری[۱]، محسن میرزایی[۲]، سارا اشرف زاده*[۳]

[۱] دانشیار گیاه شناسی، گروه میکروبیولوژی ، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
[۲] استادیار باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
[۳] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، باشگاه پژوهشگران و نخبگان جوان، بروجرد، ایران

چکیده

مقدمه: گیاهان دارویی به دلیل طبیعی بودن، خطرات و عوارض کم، در دسترس و ارزان بودن نسبت به داروهای سنتتیک، مصرف زیادی توسط مردم دارند. بروز مقاومت های دارویی علیه داروهای ضد میکروبی شیمیایی، سبب شده است که در سال‌های اخیر به استفاده از گیاهان دارویی در درمان عفونت‌ها توجه زیادی شود. هدف از این تحقیق، بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی و متانولی *Daphne oleoides* است (مقاله برگرفته از پایان نامه دانشجویی).

مواد و روش‌ها: پس از جمع آوری و تهیه ساقه و برگ در دو فصل بهار و تابستان، عصاره های اتانولی و متانولی گیاه تهیه گردید و اثرات ضد میکروبی عصاره ها با استفاده از روش های دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهارکننده رشد میکروب‌ها (MIC) تعیین شد. این مطالعه بر روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923) انجام گرفت. آزمایش ها سه بار تکرار شد و داده‌ها با استفاده از تست ANOVA و میانگین آن ها با استفاده از آزمون دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: هر دو عصاره اتانولی و متانولی ساقه و برگ *D. oleoides* دارای اثرات ضد میکروبی بودند اما عصاره اتانولی ساقه بهار بیش ترین خاصیت ضد میکروبی را در دو روش مورد آزمایش نشان داد.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل از آزمایشات می توان نتیجه گرفت عصاره اتانولی ساقه بهار *D. oleoides* دارای بیش‌ترین خاصیت ضد میکروبی است که می تواند به عنوان منبع بالقوه برای ترکیبات جدید ضد میکروبی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: *Daphne oleoides*، عصاره، سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس

مقدمه

با توجه به مشکلات زیست محیطی و قیمت بالای برخی آنتی‌بیوتیک‌ها گرایش به جایگزینی آن‌ها با مواد کم ضررتر تقویت شده است (۱). امروزه استقبال گسترده‌ای از طب سنتی و داروهای گیاهی در زمینه‌های مختلف علوم پزشکی صورت گرفته است که علت آن کاربرد گیاهان به عنوان دارو از

* **مسئول مکاتبات:** sa_mic1987@yahoo.com

قرن‌های پیشین می‌باشد. بهره گیری از طب سنتی یکی از راه های دستیابی به داروهای جدید می‌باشد. در حال حاضر ۱۱۹ دارو با منشاء گیاهی وجود دارد که تنها ۹۰ گونه از بین ۲۵۰۰۰۰ گونه شناخته شده بدست آمده است (۲). صدها گیاه در سراسر جهان در درمان سنتی عفونت‌های باکتریال استفاده می‌شوند و اثرات ضدمیکروبی آن ها در شرایط آزمایشگاهی اثبات شده است (۳). تعداد زیادی از گیاهان خانواده دافنه (Thymelaeaceae) در بین این گیاهان دارویی قرار گرفته اند. از این خانواده می توان به جنس دافنه اشاره کرد که بیش از پنجاه گونه گیاهی دارد (۴). این خانواده شامل گیاهان درختچه‌ای یا بوته‌ای، چند ساله، به ندرت علفی و یک ساله هستند. پوست ساقه نازک، برگ‌ها متناوب، کامل، ساده، بدون دم برگ یا دارای دم برگ کوتاه، علفی یا چرمی هستند. فصل گل دهی و میوه دهی اواسط بهار و اوایل تابستان است و گیاه متعلق به منطقه ایران- تورانی می‌باشد (۵). یکی از گونه‌های دافنه، *Daphne oleoides* می‌باشد (شکل- ۱) که دارای اثرات ضد میکروبی است (۶) مطالعات فیتوشیمیایی گزارش داده است که

شکل ۱- گیاه *D. oleoides* مورد استفاده در تحقیق حاضر

این گیاه شامل ترکیبات ترپنوئید، استرول، کومارین، لیگنان، فلاوونوئید و ترکیبات معطر در میان دیگر گونه‌ها است (۷). با توجه به نقش بسزای استافیلوکوکوس اورئوس در بروز عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه، در این تحقیق به بررسی و مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ و ساقه این گیاه بر سویه استاندارد این پاتوژن باکتریایی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد نظر در اوایل اردیبهشت و تیرماه ۱۳۹۳ از استان لرستان، بزرگراه خرم آباد- اندیمشک، ۶۰ کیلومتری خرم آباد، واقع در روستای قلعه نصیر جمع‌آوری و توسط بخش گیاه شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد با توجه به مشخصات ظاهری و توصیفات گیاه شناسی به عنوان *D. oleoides* تشخیص داده شد. قسمت‌های مختلف آن شامل برگ و ساقه به خوبی از یکدیگر تفکیک و پس از تمیز کردن و شستن، در محلی تاریک و بدون رطوبت خشک شدند. خشک کردن گیاهان دارویی به منظور جلوگیری از عمل آنزیم‌ها و رشد باکتری‌ها و در نتیجه جلوگیری از کپک زدن و تغییرات شیمیایی گیاه صورت می‌گیرد (۸). بعد از پودر کردن گیاه، آن را از الک ریز عبور داده تا به صورت پودر یکنواخت درآید. آن گاه درون ظروف شیشه ای تیره و دربسته در یخچال نگهداری شد. برای تهیه عصاره از روش خیساندن (Maceration) استفاده شد. مقدار ۳ گرم از پودرهای آسیاب شده برگ بهار، برگ تابستان، ساقه بهار و ساقه تابستان را به وسیله ترازوی دیجیتال وزن کرده و هر کدام را به طور جداگانه با ۳۰ سی‌سی از حلال‌های خالص اتانول (مرک آلمان) و متانول (مرک آلمان) (نسبت ۱ به ۱۰) مخلوط کرده سپس به مدت

۴۸ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه شیکر (با سرعت rpm ۱۳۰) (بهداد/ ایران) مخلوط و پس از آن هر یک از نمونه‌ها به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر گردیدند. بعد از عصاره گیری و صاف کردن ترکیب حاصله، جداسازی حلال از عصاره‌ها توسط دستگاه روتاری (heidolph/ آلمان) و با کمک پمپ خلاء (تقطیر در خلاء) انجام گرفت (۹). در نهایت عصاره های بدست آمده از گیاه مذکور در ظروف استریل تیره و در بسته ریخته شدند. در پایان عصاره های بدست آمده به صورت تازه و در همان روز برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. باکتری مورد استفاده در این پژوهش، سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923) بود که مقداری از باکتری لیوفیلیزه در زیر هود لامینار (ژال تجهیز/ ایران) و در شرایط استریل باز شده و به محیط کشت مایع مولر هینتون براث (Muller Hinton Broth) انتقال یافت، سپس به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد (ژال تجهیز/ ایران) قرار داده شد. از محیط کشت ۲۴ ساعته بر روی محیط حاوی مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar) کشت خطی انجام گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد به انکوباتور منتقل شد تا به عنوان منبع باکتری استفاده شود (۱۰). از سوی دیگر برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت ۲۴ ساعته از باکتری می‌باشد که برای این منظور از باکتری های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط کشت مولر هینتون براث در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد سوسپانسیونی با کدورت معادل استاندارد نیم مک فارلند (۱×۱۰^{۸} Cfu/ml) از باکتری‌ها تهیه و سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر از آن به طور یکنواخت بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار پخش شد (۱۱).

روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion Method): مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌های اتانولی و متانولی ساقه و برگ را بر روی دیسک های بلانک استریل (پاتن طب) تزریق کرده و پس از خشک شدن دیسک‌ها، با پنس استریل در فاصله معینی از یکدیگر و از لبه پلیت، بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار آغشته با باکتری مورد نظر که به صورت چمنی کشت شده بود قرار داده شد (تعداد کل دیسک‌ها در یک پلیت چهار عدد بود که به صورت سه تکرار و یکی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد) آن گاه پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. عملیات مذکور در مورد هر نمونه (گیاه و حلال) سه بار تکرار شد و پس از آن میزان مناطق مهاری مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس میلی متر محاسبه شد و میانگین آن ها ثبت گردید (۱۲).

روش حداقل غلظت مهاری یا MIC (Minimum Inhibitory Concentration Method): به منظور تهیه حداقل غلظت مهاری، ابتدا به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه مقدار ۵۰ میکرولیتر محیط مایع مولرهینتون ریخته سپس ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های اتانولی و متانولی را به صورت جداگانه به آن اضافه کرده و پس از چند بار پر و خالی کردن از خانه اول به خانه دوم و از خانه دوم به خانه سوم به صورت سریالی تا خانه شماره ۱۰ انتقال داده شد تا محیط مولر هینتون براث با عصاره مورد نظر به خوبی مخلوط گردند. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سویه استاندارد باکتری تهیه شده که معادل ۰/۵ مک فارلند

است به خانه ها افزوده شد. خانه های شماره ۱۱ و ۱۲ به عنوان کنترل منفی (محیط کشت حاوی عصاره بدون باکتری) و کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری) در نظر گرفته شد، سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. حداقل غلظتی از باکتری که هیچ گونه رشد قابل مشاهده ای ندارد به عنوان MIC در نظر گرفته شد (۱۳). جهت حصول اطمینان از نتایج بدست آمده عصاره‌ها، آزمایشات دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهاری سه بار تکرار شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS ورژن ۱۷ استفاده شد، از تست ANOVA جهت مقایسه میانگین ها و از آزمون دانکن جهت بررسی اختلاف بین میانگین‌ها در سطح $P<۰/۵$ استفاده گردید.

یافته‌ها

در روش دیسک دیفیوژن، هر یک از عصاره های اتانولی و متانولی ساقه و برگ *D. oleoides* در دو فصل بهار و تابستان تاثیرات ضد باکتریایی متفاوتی را بر سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923) در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از خود نشان دادند. به این ترتیب که میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره های اتانولی برگ بهار ۱۰ میلی متر، برگ تابستان ۹ میلی‌متر، ساقه بهار ۱۷ میلی‌متر، ساقه تابستان ۱۳ میلی‌متر و میانگین قطر هاله عدم رشد برای عصاره های متانولی برگ بهار ۱۰ میلی‌متر، برگ تابستان ۱۰ میلی‌متر، ساقه بهار فاقد هاله و ساقه تابستان ۱۳ میلی‌متر را نشان دادند. جدول شماره ۱ نتایج حاصل از این آزمایش را نشان می‌دهد. در روش حداقل غلظت مهار کننده میزان MIC هر یک از عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ و ساقه این گیاه در دو فصل بهار و تابستان در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923) محاسبه شد. عصاره‌های اتانولی برگ بهار۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، برگ تابستان ۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر، ساقه بهار ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر، ساقه تابستان ۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر بود و برای عصاره‌های متانولی برگ بهار ۵۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر، برگ تابستان ۳۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، ساقه بهار ۳۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و ساقه تابستان ۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر مشاهده شد. جدول شماره ۲ نتایج حاصل از این آزمایش را نشان می‌دهد. برای صحت انجام کار، هر یک از آزمایشات فوق سه بار تکرار شدند و میانگین حاصل از نتایج دیسک دیفیوژن در نمودار ۱ و میانگین حاصل از نتایج حداقل غلظت مهاری در نمودار ۲ آمده است.

جدول۱. میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره های گیاهی D. oleoides به روش دیسک دیفیوژن (غلظت ۱۰۰mg/ml) بر سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923)

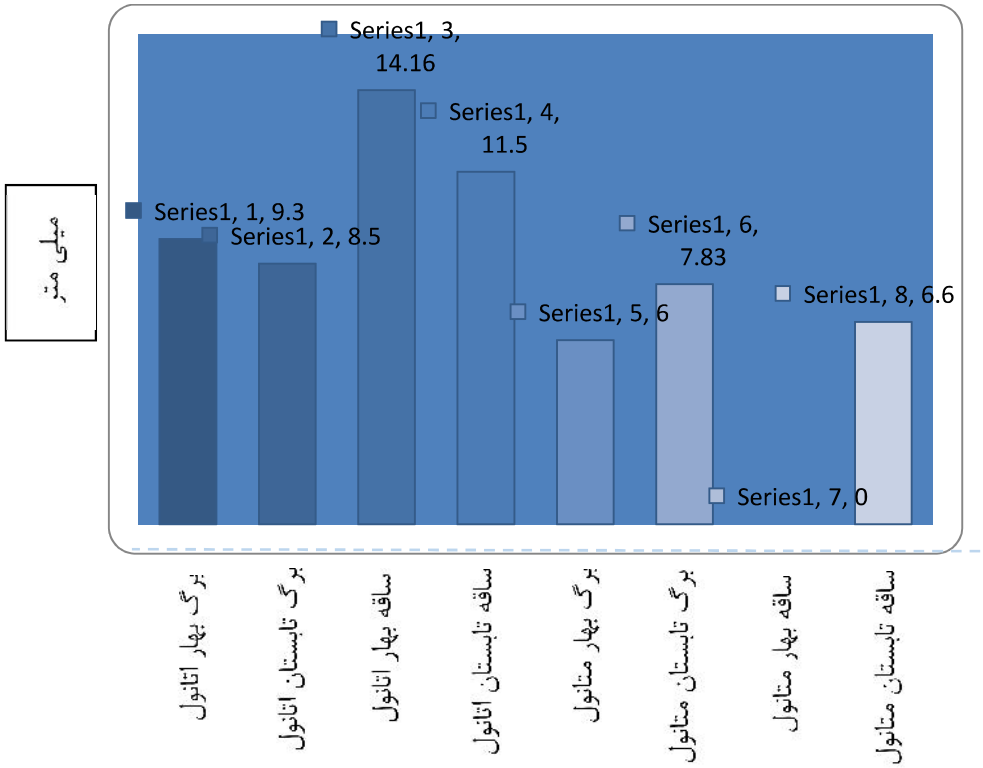
گیاه / حلال	اتانول	متانول
برگ بهار	mm۱۰	mm۱۰
برگ تابستان	mm۹	mm۱۰
ساقه بهار	mm۱۷	عدم تشکیل هاله
ساقه تابستان	mm۱۳	mm۱۳

برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری SPSS ورژن ۱۷ استفاده شد.

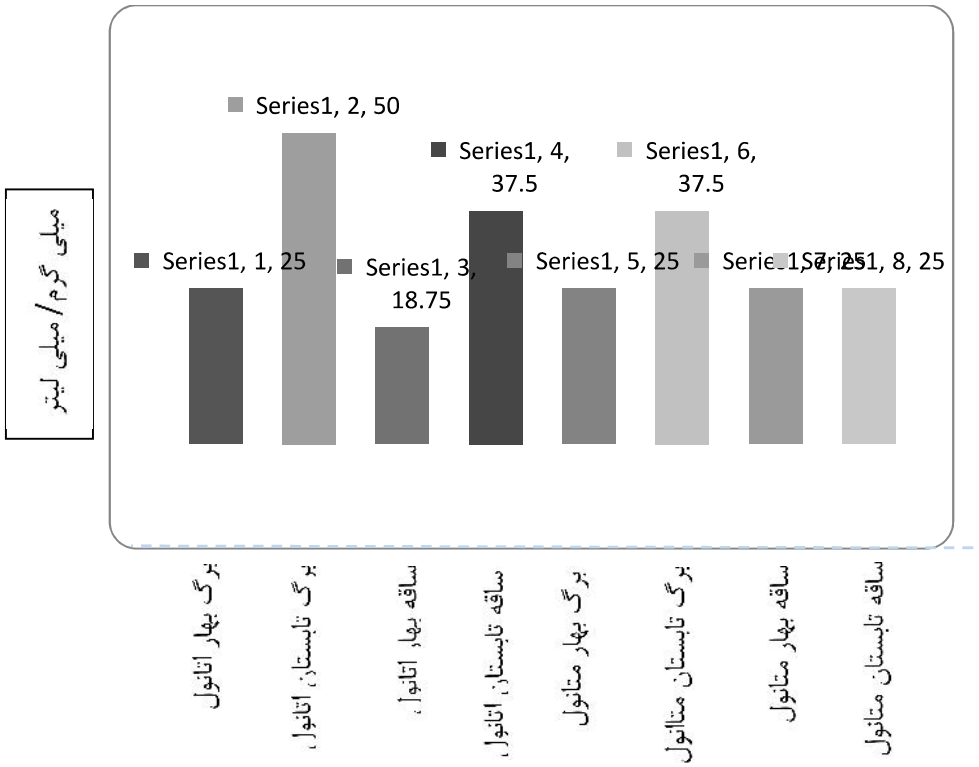
جدول ۲. میانگین حداقل غلظت مهارکننده عصاره های گیاهی *D. oleoides* (غلظت ۵۰mg/ml) بر سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923)

گیاه / حلال	اتانول	متانول
برگ بهار	mg/ml۲۵	mg/ml۵۰
برگ تابستان	mg/ml۲۵	۳۷/۵ mg/ml
ساقه بهار	۱۲/۵ mg/ml	۳۷/۵ mg/ml
ساقه تابستان	mg/ml۲۵	mg/ml۲۵

برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری SPSS ورژن ۱۷ استفاده شد.



نمودار۱. میانگین قطر هاله عدم رشد سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب میلی متر، ناشی از عصاره های گیاهی *D. oleoides* (غلظت ۱۰۰ mg/ml) که به ترتیب از سمت چپ شامل برگ بهار اتانول، برگ تابستان اتانول، ساقه بهار اتانول، ساقه تابستان اتانول، برگ بهار متانول، برگ تابستان متانول، ساقه بهار متانول، ساقه تابستان متانول.



نمودار ۲. میانگین قطر هاله عدم رشد سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر، ناشی از عصاره‌های گیاهی *D. oleoides* (غلظت ۵۰mg/ml) که به ترتیب از سمت چپ شامل برگ بهار اتانول، برگ تابستان اتانول، ساقه بهار اتانول، ساقه تابستان اتانول، برگ بهار متانول، برگ تابستان متانول، ساقه بهار متانول، ساقه تابستان متانول.

بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان انواع مختلفی از مواد زیست فعال تولید می کنند که آن ها را به عنوان یک منبع غنی از مواد دارویی معرفی می‌کند. مطالعات انجام شده در دنیا بیانگر آن است که عصاره بسیاری از گیاهان توانایی مهار رشد میکروارگانیسم‌ها را دارد و به این لحاظ گیاهان به عنوان عوامل ضدمیکروبی کاربردهای زیادی پیدا نموده اند (۱۴). تعداد زیادی از آنتی-بیوتیک‌های سنتزی با ساختارهای شیمیایی متفاوت برای کنترل عفونت‌های بیمارستانی و بیماری‌های عفونی انسان در سراسر جهان استفاده می‌شوند. استفاده طولانی مدت از این آنتی بیوتیک‌ها باعث ظهور مقاومت های چند دارویی و باکتری های مقاوم شده و از طرفی با اثرات جانبی باعث بروز مشکلات بالینی فراوان در بیماران می شوند (۱۵). عصاره‌های گیاهی منابع جدیدی از ترکیبات ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های پاتوژن هستند و با مطالعات انجام شده به وجود برخی از عوامل ضدباکتریایی در عصاره های گیاهی پی برده اند. یکی از ویژگی های مهم عصاره‌های گیاهی مرتبط با خاصیت آب گریزی است که عصاره های گیاهی را قادر می‌سازد تا با پیوند روی لایه لیپیدی، غشاء سلولی باکتری‌ها و میتوکندری آن‌ها، باعث پاره شدن غشاء سلولی و خروج مولکول ها و یون های مهم باکتری به خارج از سلول و در نهایت مرگ باکتری گردد (۱۶). طبق نتایج بدست آمده از دو آزمایش دیسک دیفیوژن و

MIC، مشخص شد که گیاه *D. oleoides* دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشد و عصاره اتانولی ساقه این گیاه در فصل بهار بهتر توانسته بود این خاصیت را از خود بر جای بگذارد، به طوری که در آزمایش دیسک دیفیوژن که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انجام شد، بالاترین قطر هاله عدم رشد مربوط به ساقه بهار اتانول با اندازه ۱۷ میلی متر و در آزمایش MIC که در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود نیز ساقه بهار اتانول در غلظت ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر به عنوان حداقل غلظتی که باکتری نتوانسته بود هیچ گونه رشدی در آن داشته باشد مشخص گردید. در پژوهشی که Cottiglia و همکاران در سال ۲۰۰۱ روی عصاره متانولی *D. gnidium* انجام دادند ترکیباتی مانند کومارین و فلاوونوئید از عصاره متانولی ساقه جدا شده بود که این دو در فعالیت ضد میکروبی نقش داشتند (۱۷). در مطالعه ای که Javidnia و همکاران در سال ۲۰۰۳ روی عصاره اتانولی *D. mucronata* انجام دادند، ساقه بهار دارای خاصیت ضد میکروبی شناخته شد که با این آزمایش هم خوانی دارد (۱۸). در آزمایشاتی که Manojlovic و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی عصاره متانولی *D. cneorum* انجام دادند، ترکیب ۷ و ۸ دی هیدروکسی کومارین که یکی از متابولیت های ثانویه این گیاه است و در گذشته آن را daphnetin می‌نامیدند، از عصاره متانولی برگ جدا و به عنوان خاصیت ضد میکروبی شناخته شده بود که با آزمایش مورد مطالعه ما هم خوانی ندارد (۱۹). با توجه به نتایج بدست آمده، برخی از تفاوت‌ها را می‌توان به دلیل نحوه عصاره‌گیری، نحوه انجام آزمایش، نوع و گونه گیاهان و حتی رویشگاه طبیعی آن‌ها دانست (۲۰). عوامل متعددی از جمله دماهای مختلف بر روی ویژگی‌های مورفولوژیکی و مقدار متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تاثیر می‌گذارند. مطالعات گیاهان دارویی در شرایط صحرایی نشان می‌دهد که ترکیبات فعال در گیاهان نسبت به دماهای مختلف، متفاوت بوده است. بنابراین می توان با تشخیص شرایط مطلوب رشد این گیاهان، مواد موثره بیش تری را از این گیاهان برداشت نمود. از طرفی در مراحل اولیه رشد، گیاه حساس تر بوده و بیش تر تحت تاثیر عوامل پاتوژنی مختلف قرار دارد پس گیاه ترکیبات دفاعی موثرتری را تولید می کند تا در برابر پاتوژن ها مقابله کند تا موجب آسیب به آن نشود. در مراحل پایانی، گیاه مقاومت خود را بدست آورده و نسبت به شرایط سازگار شده و حساسیت کمتری را نشان می دهد اما در مرحله زایشی که مرحله جدیدی از رشد است دوباره گیاه نسبت به شرایط جدید حساس تر می‌شود و برای مبارزه با این حساسیت ترکیبات دفاعی خود را افزایش می‌دهد (۲۱). نتایج بدست آمده از این آزمایشات نشان می‌دهد که عصاره اتانولی ساقه بهار *D. oleoides* خاصیت ضدمیکروبی بارزی در مقابل جدایه‌های مختلف باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد اما با توجه به وجود ترکیبات متنوع و زیاد در عصاره گیاهان دارویی پیشنهاد می‌شود، آنالیز این ترکیبات با ابزاری نظیر کروماتوگرافی گاز- جرمی انجام شود که می‌تواند بهترین ترکیب یا ترکیبات موثر را تعیین و به صنعت داروسازی معرفی نماید. تعیین ترکیبات موجود در گیاهان با اثر حداکثر و حداقل و مقایسه مواد تشکیل‌دهنده، می‌تواند منجر به معرفی موثرترین ماده کارآمد شود. در یک نتیجه گیری کلی می توان گفت

عصاره اتانولی ساقه بهار *D. oleoides* در شرایط in vitro دارای قابلیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای بر روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923) بود و در ادامه لازم است مطالعات وسیع تر و دامنه داری در شرایط in vitro انجام شود تا مقدار موثر این عصاره بر باکتری مورد نظر و سویه های بالینی و فرمولاسیون دقیق آن جهت دست یابی به بیش ترین میزان فراهمی زیستی مورد ارزیابی قرار گیرد و نهایتاً این عصاره را به عنوان یک داروی ضد میکروبی جدید به دنیای پزشکی و میکروبیولوژی معرفی نمود.

Reference:

1- Taheri A, Seyfan A, JalaliNezhad S, Naseri F. Antibacterial effect of *Myrtuscommunis* hydro-alcoholic extract on some pathogenic bacteria. *J Zahedan Med Sci* 2013; 47-53 (In persian)

2- Kermanshah H, HashemiKamangar S, Arami S, Kamalinegad M, Karimi M, Mirsalehian A, Jabalameli F, Fard MJ. In vitro evaluation of antibacterial activity of hydro-alcoholic extract of *Salvia officinalis* and *Pimpinella anisum* against cariogenic bacteria. *J Dental Med* 2010; 22(2): 149-145 (In persian)

3- 3. Nazari M.R., Pakzad A, Maleki A, Hematian A. Comparison of in vitro inhibitory effect of different extracts *Scrophularia striata* plant on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Helicobacter pylori*. *J Ilam Univ Med Sci* 2014; 3: 67-72 (In persian)

4- Mianabadi M, Panahi A, Sadeghi H, Jafari A. K562 cell cycle arrest in G0/G1 phase by species of *Daphne* family. *Iran South Med J* 2015; 1: 125-134 (In persian)

5- Akhyani KH. Flora of Iran. *Institute of Forest and Rangelands* 1995; 15: 3-11 (In persian)

6- Javidnia K, Miri R, BahriNajafi R, KhademzadeJahromi N. A preliminary study on the biological activity of *Daphne mucronata* Royl. *Daru* 2003; 11(1): 28-31 (In persian)

7- Gurbuz I, Demirci B, Franz G, Baser K.H.C, Yesilada E, Demirsi F. Comparison of the volatiles of *Daphne pontica* and *D. oleoides* Schreber by hydro- and micro distillation method. *Turk J Bio* 2013; 37(1): 1-8

8- Yousefi M, Hosseini Z, Haddad Khodaparast M.H., Azarnivand H, Pezeshki P. Antimicrobial effect of *Salvia leriifolia* leaf extract powder against the growth of *Staphylococcus aureus* in humburger. *J F S T* 2011; 8(29): 126-136 (In persian)

9- Shariati A, Pordeli H.R., Khademian A,Kiaei, A. Evaluation of the antimicrobial activity of the extract of Date palm (*Phoenix dactylifera*) Fruits and Pits on Multi- Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Food Bio & Tech* 2010; 7: 42-47 (In persian)

10- Jalali M, Abedi D, Asghari GH.R., Rezaei, Z. Antimicrobial effects of different fruit extracts of *Picnocycla spinosa*. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2007; 59: 76-86 (In persian)

11- Khosravinia S, Bagheri A, Ziaratnia S.M. Investigation of antimicrobial activity of extracts obtained from callus and cell suspension culture of *Bunium persicum* compared to seed and effect of solvent and dilution of the extract on the activity. *Crop Biotech* 2015; 9: 39-48 (In persian)

12- Ahmadi Z, Sattari M, Tabaraee B, Bigdeli M. Identification of the constituents of *Achillea santolina* essential oil and evaluation of the antimicrobial effects of its extract and essential oil. *Arak Univ Med J* 2011; 3: 2-10 (In persian)

13- Golshani Z, Dawoodi V. In vitro study of antimicrobial effects on *Rosmarinusofficinalis* leaf extract against some pathogens. *Arak Univ Med J* 2013; 16(77): 82-89 (In persian)

14- Akbarian J, Khomeiri M, SadeghiMahoonak A, Mahmoodi E. Antimicrobial effect of extracts *Phoenix dactylifera* against pathogenic bacteria and spoilage molds. *E J F P P* 2013; 5(1): 1-12 (In persian)

15- Dehghan GH.R., Zarini GH.R, Hajizadeh M. phytochemical investigation and antimicrobial, antifungal and synergistic activities of chloroform fractions of the root of *Ferulaszovitsiana*. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2013; 6: 10-17 (In persian)
16- Joshi B, Lekhak S, Sharma A. Antibacterial property of different medicinal plants: *Ocimumsanctum*, *Cinnamommumzeylanycum*, *Xanthoxylumarmatum* and *Origanummajorana*. *Kathmandu Univ J Sci* 2009; 5(1): 143-150
17- Cottiglia F, Loy G, Garau D, Floris S, Casu M, Pompei R, Bansignore L. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoid from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phyto medicine* 2001; 8(4): 302-305
18- Javidnia K, Miri R, BahriNajafi R, KhademzadehJahromi N. A preliminary study on the biological activity of *Daphne mucronata* Royl. *Daru* 2003; 11(1): 28-31
19- Manojlovic N.T, Maskovik P.Z., Vasijevic P.J, Jelic R.M, Juskovic M.Z, Sovrlic M, et al. HPLC analysis, antimicrobial and antioxidant actives of *Daphne cneorum* L. *Hem Ind* 2012; 66(5): 709-716
20- Saeedi S, Sabbagh S.K., SaboriRobat E. A study of antibacterial activity of plant extract and essential oil of *Myrtus communis* against resistant strains of *Staphylococcus aureus* bacteria to selective antibiotics. *J Zabol Univ Med Sci* 2013; 3: 21-32 (In persian)
21- Ramezani M, Zarrinkamar F, Bagheri M, Rajabnia R. Study of environment temperature effect on the antibacterial activity of water extract of different organs of *Violaodorata* in the different stages of growth. *J Babol Univ Med Sci* 2012; 14(2): 16-21 (In persian)