

Antibacterial Activity of Different Extracts of Aerial Parts of *Chondrilla juncea* L, *Ajuga comata* Stapf, *Nepeta ucrainica* L, and *Delphinium speciosum* M.B

Parina Asgharian^{1,2},
Fariba Heshmati Afshar¹,
Masoud Mohammadzadeh³,
Elahe Mahmoodzadeh³,
Somayeh Hallaj-Nezhadi⁴

¹ Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Pharm D Student, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Pharmaceutical and Food Control, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received August 18, 2019 ; Accepted November 4, 2019)

Abstract

Background and purpose: Herbal drug derivatives have been commonly used in management and treatment and of some infections. This study aimed at evaluating the antibacterial effects of *Chondrilla juncea* L, *Ajuga comata* Stapf, *Nepeta ucrainica* L, and *Delphinium speciosum* M.B extracts.

Materials and methods: Antibacterial activity of different extracts (n-hexane, dichloromethane, and methanol) of the aerial parts of *Chondrilla juncea* L, *Ajuga comata* Stapf, *Nepeta ucrainica* L, and *Delphinium speciosum* M.B were assessed against gram positive, gram negative and fungi strains using agar diffusion method. Potent extracts were subjected to fractionation using Vacuum Liquid Chromatography (VLC). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of all samples were also investigated.

Results: *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were found to be the most sensitive bacteria. In agar diffusion assays, the n-hexane extract of *D.speciosum* and dichloromethane extract of *C.juncea* were the most active extracts against *S. aureus* (35 and 30mm, respectively) and *B. subtilis* (30 and 20mm, respectively). Other extracts showed no anti-microbial activity against different bacteria. In current study, 10 and 20% VLC fractions of n-hexane extract of *D. speciosum* exhibited stronger antibacterial activity against *S. aureus* and *B. subtilis*. MIC of both potent fractions were 500µg/ml and 250µg/ml against *S. ureus* and *B. subtilis*, respectively.

Conclusion: Among the plant extracts studied, n-hexane extracts and 10 and 20% VLC fractions of the n-hexane extract of *Delphinium speciosum* showed higher antimicrobial effects.

Keywords: anti microbial activity, *Chondrilla juncea* L, *Delphinium speciosum* M.B, extract, minimum inhibitory concentration

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 29 (180): 24-35 (Persian).

* Corresponding Author: Somayeh Hallaj Nezhadi - Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (E-mail: hallajnezhadis@tbzmed.ac.ir)

مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره های مختلف اندام های هوایی Chondrilla juncea L, Ajuga comata Stapf, Nepeta ucrainica L, and Delphinium speciosum M.B

پرینا اصغریان^۱
فریبا حشمتی افشار^۱
مسعود محمدزاده علمداری^۳
الهه محمودزاده^۳
سمیه حلاج نژادی^۴

چکیده

سابقه و هدف: داروهای گیاهی به صورت روتین برای درمان بیماری های عفونی استفاده می شده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی ویژگی های ضد میکروبی گیاهان *Chondrilla juncea* L, *Ajuga comata* Stapf, *Nepeta ucrainica* L و *Delphinium speciosum* M.B می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، فعالیت ضد میکروبی عصاره های ان هگزانی، دی کلرومتانی و متانولی گیاهان ذکر شده علیه میکروارگانیسم های متفاوت با روش آگار دیسک دیفوزیون مطالعه شد. سپس عصاره های موثر با تکنیک VLC فراکسیونه شدند و با روش سریال دایلوژن MIC تعیین شد.

یافته ها: در این تست، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس، حساس ترین باکتری ها بودند. در بین همه عصاره ها، عصاره ان هگزانی *Delphinium speciosum* M.B و عصاره دی کلرومتانی *Chondrilla juncea* L موثرترین عصاره ها در برابر استافیلوکوکوس اورئوس (۳۳ و ۳۵ میلی متر) و باسیلوس سوبتیلیس (۳۰ و ۲۰ میلی متر) به ترتیب بودند. سایر عصاره ها اثر ضد میکروبی از خود نشان ندادند. فراکسیون های ۱۰ درصد و ۲۰ درصد حاصل از کروماتوگرافی مایع تحت خلا از عصاره ان هگزانی *D. speciosum* با بیش ترین اثر مهار روی استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب دارای MIC برابر با ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم / میلی لیتر در مقابل باکتری های مذکور بود.

استنتاج: عصاره ان هگزانی و فراکسیون های ۱۰ درصد و ۲۰ درصد حاصل از کروماتوگرافی مایع تحت خلا از عصاره ان هگزانی گیاه *Delphinium speciosum* M.B نسبت به بقیه گیاهان مورد بررسی، دارای بیش ترین اثرات مهار روی سویه های مورد مطالعه بود.

واژه های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، *Chondrilla juncea*, *Delphinium speciosum*، عصاره، کم ترین غلظت مهار

مقدمه

امروزه بیماری های عفونی به عنوان یکی از مهم ترین دلایل مرگ و میر در جهان شناخته شده اند (۱). مطالعات در جهت یافتن ترکیباتی است که بتوانند با حداقل سمیت برای سلول های میزبان، باعث مرگ میکروب ها و یا کاهش

E-mail: hallajnezhadis@tbzmed.ac.ir

مؤلف مسئول: سمیه حلاج نژادی - تبریز: دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده داروسازی

۱. مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲. استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴. دانشیار، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۶/۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۸/۱۴

رشد میکروبی شوند (۲). امروزه با توجه به افزایش بیش از حد مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، بروز اثرات جانبی متعدد آنتی‌بیوتیک‌های موجود و بروز بیماری‌های غیر معمول عفونی، مطالعات زیادی برای بررسی گیاهان دارای خواص ضد میکروبی برای تهیه آنتی‌بیوتیک‌های جدید از ترکیبات طبیعی جهت کاهش عوارض ذکر شده انجام می‌شود (۳).

گیاهان دارویی منبع اصلی داروهای طبیعی هستند که می‌توانند جایگزین درمان‌های رایج شوند (۴). اخیراً در اکثر نقاط جهان، گیاهانی با خواص آنتی‌میکروبی مناسب شناسایی شده‌اند (۵). در کشورهای در حال توسعه، هنوز طب سنتی جایگاه خود را از دست نداده است و یکی از روش‌های درمانی به حساب می‌آید. مشاهده شده است که متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان، اثرات ضد میکروبی مشابه آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان می‌دهند (۶). در مطالعات اخیر انجام شده در کشور ایران نیز بررسی ترکیبات فرار و غیر فرار و خواص بیولوژیکی گیاهان دارویی مختلف به منظور شناسایی خواص آنتی‌میکروبی بررسی شده است (۷). با توجه به تحقیقات گسترده‌ای که امروزه دانشمندان بر روی گیاهان دارویی به منظور یافتن منابع جدید ضد میکروبی انجام می‌دهند، بر آن شدیم گیاهانی که اثرات ضد میکروبی دیگر گونه‌های آن‌ها اثبات شده است، مورد بررسی قرار دهیم. در این جا به اختصار به ویژگی‌های فارماکولوژیکی و ترکیبات شیمیایی گیاهان ذکر شده می‌پردازیم:

گیاه *Nepeta ucranica* L (پونه سای اوکراینی) از خانواده نعنا، گیاهی علفی و چند ساله می‌باشد (۸-۱۰) که از سایر گونه‌های این جنس، ترکیبات شیمیایی مختلف همانند ترپن‌ها و ترکیبات فنولی گزارش شده است (۱۱-۱۵)، همچنین اثرات مختلف بیولوژیکی در طب سنتی از قبیل مدر، ضد سرفه، ضد اسپاسم و نیز ضد عفونی‌کننده و قابض برای درمان بشورات پوستی کودکان و نیش مار و عقرب به صورت موضعی گزارش شده است (۱۶). از طرفی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی سایر گونه‌های

نپتا به وفور مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷-۲۲).

گیاه لب‌دیدی همدانی *Ajuga comata* Stapf از خانواده نعنائیان گیاهی یک‌ساله، دوساله یا چندساله می‌باشد (۲۳). از سایر گونه‌های این جنس ترکیبات مختلفی از قبیل ایریدوئید، پلی فنول‌ها، تانن‌ها، ساپونین، کربوهیدرات‌ها و آلکالوئیدها گزارش شده است که حاوی اثرات بیولوژیک متعددی از قبیل ضد میکروب، ضد سرطان، ضد دیابت و آنتی‌اکسیدان می‌باشد. اثرات ضد میکروبی در سایر گونه‌های این جنس بررسی شده است (۲۴-۳۲).

Delphinium speciosum M.B (زبان پس قفای زیبا) گیاهی چند ساله با بن چوبی، ساقه‌ها به ارتفاع ۸۰-۳۰ سانتی‌متر، ساقه ساده یا منشعب، با کرک‌های بلند و جدا می‌باشد. دستجات مهم ترکیبات گزارش شده از سایر گونه‌های این جنس عبارت‌اند از آلکالوئیدهای دی ترپنوئید، فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی، اسیدهای چرب و لینولیک اسید می‌باشد (۳۳).

براساس مطالعات صورت گرفته، خواص ضد صرع، ضد میکروبی، حشره کشی و ضد قارچی در سایر گونه‌های این جنس گزارش شده است (۳۴، ۳۵). همچنین اسانس گل‌های یک گونه دیگر، اثرات مناسبی روی استافیلوکوک اورئوس و انتروکوک فکالیز داشته است (۳۶). همچنین در مطالعه‌ای که اثنی‌عشری و همکاران بر روی اسانس گیاه *Delphinium speciosum* M.B انجام دادند، هیدروکربن‌های خطی به عنوان عمده‌ترین ترکیبات اسانس معرفی شد (۳۷).

Chondrilla juncea L (قندرون) گیاهی دو ساله یا چند ساله، علفی به ارتفاع ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر از خانواده آستراسه که ترکیبات مختلفی از سایر گونه‌های این جنس از قبیل ترکیبات فنولی گزارش شده است (۶). تا به حال بر روی این گونه مطالعات فیتوشیمیایی انجام نشده است، اما از سایر گونه‌های این گیاه همانند *Chondrilla caribensis* لکتنیسی با ساختار جدید جداسازی کرده‌اند که اثرات آنتی‌میکروبیال قابل ملاحظه‌ای از خود نشان داده‌اند (۳۸). در مطالعه‌ای دیگر،

اثرات آنتی میکروبیال گونه *Chondrilla nucula* را نیز اثبات کرده اند (۳۹).

تاکنون مطالعه مشابهی در مورد خواص ضد میکروبی عصاره های مختلف برخی از گیاهان جمع آوری شده از منطقه آذربایجان شرقی همانند *Ajuga comata* Stapf و *Nepeta ucrainica* L از خانواده نعنائیان، *Chondrilla juncea* L از خانواده کاسنی، *Delphinium speciosum* M.B از خانواده آلاله بر روی گونه های مختلف میکروبی شامل باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ ها صورت نگرفته است. از طرفی عصاره ها و در برخی موارد اسانس های گونه های دیگر این گیاهان اثرات آنتی میکروبیال قابل توجهی از خود نشان داده اند. لذا انجام این پژوهش می تواند صحت کاربرد ضد میکروبی این گیاهان در درمان های طب مدرن را روشن نماید.

مواد و روش ها

برای انجام تست های میکروبی از دیسک های کاغذی بلاتک استریل (پادتن طب) و دیسک آمیکاسین، کلیندامایسین و نیستاتین استفاده شد. همچنین محیط های کشت نوترینت آگار (مرک آلمان) و محیط کشت مولر هیتون (گیکو اسکاتلند) و حلال های ان هگزان، دی کلرومتان و متانول از دایچونگ و سیلیکاژل (مش ۶۰) از مرک خریداری شد.

تهیه نمونه

گیاهان *Ajuga comata* Stapf، *Nepeta ucrainica* L، *Delphinium speciosum* M.B در خرداد ماه سال ۱۳۹۳، از منطقه ی یام (کوه میشو، نزدیک شهر مرنند، آذربایجان شرقی) جمع آوری و با نمونه هربایومی آن ها مورد تطبیق قرار گرفته و شناسایی شد و با شماره Tbz-fph-752، Tbz-fph-757، Tbz-fph-762 در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز نگهداری گردید. گیاه *Chondrilla juncea* L (Tbz-fph-754)

نیز از مرکز تحقیقات دانشکده داروسازی تهیه شد. نمونه ها تحت شرایط آزمایشگاهی خشک و پودر گردید. سپس ۱۰۰ گرم از پودر خشک گیاه توزین شد و توسط دستگاه سوکسله با استفاده از حلال های ان هگزان، دی کلرومتان و متانول عصاره گیری انجام شد. عصاره های تهیه شده از هر گیاه توسط دستگاه روتاری اوپراتور در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد خشک گردید و وزن خشک هر عصاره اندازه گیری شد و باقیمانده خشک جهت آزمایشات بعدی در یخچال نگه داری شد (۴۰).

مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره های گیاهی

میکروارگانیزم های مورد مطالعه شامل *Proteus morganii* (PTCC1076)، (PTCC1112)، *Staphylococcus aureus* (PTCC1533)، *Echerchia coli* (PTCC 1715)، *Bacillus subtilis* (PTCC 1715)، *Salmonella paratyphi* (PTCC1230)، *Candida albicans* (PTCC5027)، (PTCC1435)، *Staphylococcus epidermidis* (PTCC 1310)، *Pseudomonas aeruginosa* می باشند.

برای مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره های گیاهان از روش دیسک دیفوزیون استفاده شد. بر روی هر محیط کشت، ۳ عدد دیسک برای عصاره های مختلف، ۱ عدد برای حلال و ۱ عدد هم دیسک آنتی بیوتیک استاندارد (جدول شماره ۱) برای هر میکروارگانیزم در نظر گرفته شد. از عصاره ها به مقدار ۳۰ میکرولیتر روی دیسک ها اضافه گردید. هر کدام از آزمایشات ۳ بار تکرار شدند.

جدول شماره ۱: آنتی بیوتیک های استاندارد استفاده شده برای میکروارگانیزم های مختلف

میکروارگانیزم	دیسک استاندارد
<i>Staphylococcus aureus</i>	کلیندامایسین
<i>Echerchia coli</i>	آمیکاسین
<i>Bacillus subtilis</i>	کلیندامایسین
<i>Salmonella paratyphi</i>	آمیکاسین
<i>Proteus morganii</i>	آمیکاسین
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	آمیکاسین
<i>Candida albicans</i>	نیستاتین

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) (minimum Inhibitory Concentration) میکروارگانیسم‌ها جهت تعیین MIC از روش Broth dilution استفاده شد. ابتدا محلول ۱ mg/ml در DMSO تهیه گردید. برای هر یک از عصاره‌ها و فراکسیون‌ها که در برابر یک میکروارگانیسم اثر مهاری از خود نشان داده بودند، رقیق‌سازی متوالی انجام گردید تا حداقل غلظتی از عصاره که باعث مهار رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود به دست آید. برای این کار ۱۲ عدد لوله آزمایش حاوی ۱ ml آب مقطر داخل هر یک ۱ ml آب مقطر ریخته و داخل اتوکلاو استریل شد. سپس از نمونه تهیه شده ۱ ml داخل لوله اول ریخته و به صورت سریالی و با ضریب ۲ در ۱۰ لوله رقیق گردید. ۲ لوله بعدی به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد، از هر لوله نمونه برداشته و روی محیط کشت جامد مولر هیتون آگار کشت خطی داده شد. کم‌ترین غلظت از عصاره که رشد میکروارگانیسم در آن مهار شده بود، به عنوان حداقل غلظت مهاری میکروارگانیسم در نظر گرفته شد (۴۱). این مراحل همچنین برای فراکسیون‌های گیاهی دارای اثر ضد میکروبی هم علیه میکروارگانیسم‌های مختلف انجام شد. هر کدام از آزمایشات ۳ بار تکرار شدند.

فراکسیون کردن عصاره گیاه

عصاره‌هایی که اثرات بارزی در تست ضد میکروبی (بیش‌ترین هاله عدم رشد) از خود نشان دادند، به منظور بررسی‌های بیش‌تر فراکسیون گردیده و اثرات ضد میکروبی آن‌ها نیز بررسی شد. از آنجایی که از بین تمام عصاره‌های مورد بررسی در گیاهان مختلف (در بخش نتایج به تفصیل خواهیم گفت)، عصاره ان-هگزانی *Delphinium speciosum* بیش‌ترین هاله عدم رشد را از خود نشان داد، این عصاره به کمک تکنیک VLC (Vaccum Liquid chromatography) (کروماتوگرافی

مایع تحت خلا) فراکسیونه شد، بدین منظور ابتدا قیف مخصوص VLC را به ارلن بوخنر وصل کرده و یک کاغذ صافی روی آن قرار داده سپس حدود دوسوم سر قیف را پر از سیلیکاژل کرده تا سیلیکاژل فشرده شود. سپس به ترتیب با ۱۵۰ میلی لیتر متانول، ۱۵۰ میلی لیتر اتیل استات و سپس ۱۵۰ میلی لیتر اتیل استات ۱۰ درصد در ان-هگزان شستشو داده شد. ۱ گرم از عصاره ان-هگزانی توزین و در حداقل مقدار ممکن از ان-هگزان حل گردید. محلول روی سطح سیلیکاژل منتقل شد و شستشوی آن توسط مخلوط‌های (۱۰ درصد، ۲۰ درصد، ۴۰ درصد، ۶۰ درصد، ۸۰ درصد و ۱۰۰ درصد) اتیل استات در ان-هگزان هر یک به میزان ۲۰۰ میلی لیتر انجام شد. در نتیجه ۶ فراکسیون به دست آمد که تمامی آن‌ها با استفاده از روتاری اواپراتور در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و فشار پایین خشک و سپس توزین گردیدند (لازم به ذکر است که مقدار مشخصی از عصاره و فراکسیون‌های خشک توزین و در حداقل مقدار ممکن از حلال DMSO حل گردیدند).

یافته‌ها

عصاره‌های به دست آمده از عصاره گیری از ۱۰۰ گرم پودر برای انجام تست‌های میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر عصاره برای کنترل آلودگی‌های مداخله‌گر احتمالی در پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و موردی از رشد میکروبی در عصاره‌های مورد آزمایش مشاهده نگردید. به منظور بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های ان-هگزانی، دی کلرومتانی و متانولی، ابتدا عصاره‌های تام براساس روش دیسک-پلیت مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج، هاله عدم رشد برای عصاره ان-هگزانی *Delphinium speciosum* M.B و عصاره دی کلرومتانی *Chondrilla juncea* L در برابر برخی از باکتری‌ها مشاهده شد و در مورد بقیه عصاره‌ها هاله‌ای مشاهده نشد. آزمایش فوق تا سه بار نیز تکرار گردید. بر طبق

جدول شماره ۲: میانگین قطر هاله های عدم رشد حاصل از بررسی عصاره ان هگزانی گیاه *Delphinium speciosum* M.B و عصاره

دی کلرومتانی *Chondrilla juncea* L

میکروارگانیسم	<i>Delphinium speciosum</i> M.B	<i>Chondrilla juncea</i> L	میانگین قطر هاله عدم رشد (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	۳۵	۳۰	۳۳
<i>Echerchia coli</i>	-	-	۲۸
<i>Bacillus subtilis</i>	۳۰	۲۰	۳۲
<i>Salmonella paratyphi</i>	-	-	۳۴٫۸
<i>Proteus morganii</i>	-	-	۲۴
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	۳۳
<i>Candida albicans</i>	-	-	۳۱

بحث

آنتی بیوتیک ها در سراسر جهان برای کنترل بیماری های عفونی استفاده می شوند. استفاده طولانی مدت از آنتی بیوتیک ها باعث ظهور باکتری های مقاوم به داروها شده و مشکلات بالینی مهمی را در درمان بیماری های عفونی ایجاد کرده است.

گیاهان دارویی به عنوان یک منبع مهم از داروهای ضد میکروبی جدید در سراسر دنیا مورد توجه ویژه هستند، زیرا مشخص شده است که این گیاهان مواد ضد میکروبی متنوعی دارند و دارای اثرات سمی کم و یا فاقد اثرات سمی برای سلول های میزبان هستند. گیاهان طی متابولیسم ثانویه خود ترکیبات بسیاری با ساختمان مولکولی پیچیده تولید می کنند که برخی از آنها خاصیت ضد میکروبی قابل توجهی را دارا می باشند (۴۲). در بررسی اثرات ضد میکروبی چهار گیاه مورد مطالعه، ابتدا عصاره های ان هگزانی، دی کلرومتانی و متانولی اندام های هوایی با روش دیسک-پلیت مورد آزمایش قرار گرفت که هیچ گونه اثر مهاری از عصاره های ان هگزانی، دی کلرومتانی و متانولی گیاهان *Nepeta ucrainica* L

نتایج مندرج در جدول شماره ۲، میانگین قطر هاله های عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره ای ان هگزانی *Delphinium speciosum* M.B در برابر باکتری های باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوک اورئوس به ترتیب ۳۰ و ۳۵ میلی متر و در مورد گیاه *Chondrilla juncea* L روی باکتری های باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوک اورئوس به ترتیب ۲۰ و ۳۰ میلی متر اندازه گیری شد. همان طور که از نتایج جدول شماره ۳ بر می آید، در بین همه فراکسیون ها، دیسک های حاوی عصاره های ان-هگزانی *Delphinium speciosum* M.B با قطرهای هاله عدم رشد ۳۵ و ۳۰، همچنین فراکسیون ۱۰ درصد حاصل از کروماتوگرافی تحت مایع این عصاره با قطرهای هاله عدم رشد ۴۳، ۲۳ و فراکسیون ۲۰ درصد حاصل از کروماتوگرافی تحت مایع عصاره با قطرهای هاله عدم رشد ۳۹ و ۱۹ میلی متر توانسته است به ترتیب رشد باکتری های استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس را مهار کند. همچنین بر روی عصاره ان هگزانی و فراکسیون های ۱۰ درصد و ۲۰ درصد حاصل از کروماتوگرافی تحت مایع عصاره ان هگزانی که دارای بیش ترین اثر مهار رشد بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس بودند، تست MIC انجام شد. حداقل غلظت مهاری هر دو فراکسیون قوی برای استافیلوکوک اورئوس ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و برای باسیلوس سوبتیلیس ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید که طبق نتایج حداقل غلظت مهاری برای هر دو فراکسیون علیه هر دو باکتری فوق مشابه عصاره تام به دست آمد.

جدول شماره ۳: میانگین قطر هاله های عدم رشد عصاره تام و فراکسیون های ان هگزانی *Delphinium speciosum* M.B با روش انتشار در آگار (دیسک - پلیت) در مقایسه با آنتی بیوتیک استاندارد (بر حسب میلی متر)

باکتری ها	فراکسیون های ان-هگزانی <i>Delphinium speciosum</i> M.B						عصاره ان هگزانی	کلیدامایسین
	۱۰ درصد	۲۰ درصد	۴۰ درصد	۶۰ درصد	۸۰ درصد	۱۰۰ درصد		
میانگین قطر هاله های عدم رشد (mm)	(اتیل استات در هگزان)	(اتیل استات در هگزان)	(اتیل استات در هگزان)	(اتیل استات در هگزان)	(اتیل استات در هگزان)	(اتیل استات در هگزان)		
استافیلوکوک اورئوس	۴۳	۳۹	۱۰	۲۳	۹	۱۱	۳۵	۲۹
باسیلوس سوبتیلیس	۲۳	۱۹	۱۱	۱۱	۱۰	-	۳۰	۲۳

و *Ajuga comata* Stapf در مقابل هیچ یک از میکروارگانیزم‌ها ملاحظه نگردید. ولی اثر مهاری عصاره دی کلرومتانی *Chondrilla juncea* L و ان‌هگزانی *Delphinium speciosum* M.B در برابر باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس قابل توجه بود. در مطالعه‌ای که Hussain و همکاران در مورد اثرات آنتی میکروبیال گونه *Nepeta juncea* انجام دادند، اثبات کردند که بعضی فرکشن‌ها همانند ان بوتانول و کلروفرم علیه بعضی سویه‌های باکتری‌ها اثرات ضد میکروبی داشته است (۲۰). هم‌چنین بر روی دو گونه دیگر از نپتا *N. nuda* و *N. crispa* هم اثرات آنتی میکروبیال قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گونه مورد بررسی ما اثبات شده است (۲۱، ۲۲). از طرفی، با وجود این که در مطالعات قبلی، اثرات آنتی میکروبیال گونه‌های مختلف *Ajuga* به اثبات رسیده است (۲۹-۳۲)، و گونه‌هایی همانند *parviflora* و *Genevensis* و *chamaepitys* و *turkestanica* اثرات ضدباکتری و قارچی قابل ملاحظه‌ای به دلیل داشتن محتوای بالای ترکیبات فنولی از خود نشان دادند؛ در گونه ما در هیچ کدام از عصاره‌ها اثرات ضد میکروبی مشاهده نشد. با توجه به تاثیر مثبت عصاره‌های دو گیاه ذکر شده در کاهش رشد باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس، مشاهده می‌شود که تاثیر عصاره‌های گیاهان فوق بیشتر بر روی باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد که با توجه به دیواره نفوذ پذیر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی، این یافته قابل توجیه است. عصاره ان‌هگزانی گیاه *Delphinium speciosum* M.B اثرات قابل ملاحظه‌ای روی باکتری گرم مثبت از خود نشان داد که احتمالاً مربوط به ترکیباتی با قطبیت بسیار ضعیف یا غیرقطبی می‌باشد (۴۳). همچنین از آنجایی که قطر هاله عدم رشد عصاره ان‌هگزانی گیاه *Delphinium speciosum* M.B در مقایسه با عصاره دی کلرومتانی *Chondrilla juncea* L قابل ملاحظه بود، اقدام به فراکسیون کردن این عصاره گردید. در بین

فراکسیون‌ها، فراکسیون ۱۰ درصد و ۲۰ درصد حاصل از کروماتوگرافی مایع تحت خلا از عصاره ان‌هگزانی بیش‌ترین اثرات مهاری رشد را بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس نشان دادند. برای فراکسیون‌های ۱۰ و ۲۰ درصد حاصل از کروماتوگرافی مایع تحت خلا از عصاره ان‌هگزانی *Delphinium speciosum* M.B که بیش‌ترین اثر مهاری روی باکتری‌های انتخابی داشتند، تست MIC انجام گرفت. حداقل غلظت مهاری هر دو فراکسیون قوی برای استافیلوکوک اورئوس ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای باسیلوس سوبتیلیس ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید، که حداقل غلظت مهاری هر دو فراکسیون برای هر دو باکتری فوق مشابه عصاره تام به دست آمد. با مطالعه روی ترکیبات احتمالی که می‌توانند مسئول اثرات آنتی میکروبیال باشند، می‌توان به ترکیبات کم قطبی از جمله ترپنوئیدهای بلند زنجیر اشاره کرد که اثرات آنتی میکروبیال آن‌ها قبلاً به اثبات رسیده است. مکانیسم اثر آن‌ها کاملاً مشخص نشده است، اما تصور می‌شود که به علت خاصیت لیپوفیل، با غشاهای باکتری‌ها وارد واکنش شده و باعث تداخل در عملکرد طبیعی غشاء‌ها می‌شوند (۴۴). در مطالعاتی که بر روی عصاره ان‌هگزانی گیاهان مختلف صورت گرفته، وجود ترکیباتی از قبیل هیدروکربن‌های بلند زنجیر و اسیدهای چرب اثبات شده است. از جمله این ترکیبات می‌توان به اکتیل استات، پروپانوئیک اسید، دکان و نونان اشاره کرد (۴۵). همچنین ترکیبات متعددی از قبیل آلکالوئیدهای دی‌ترپنی از سایر گونه‌های این جنس به اثبات رسیده است که اثرات آنتی میکروبیال متعددی دارد (۳۵، ۴۶، ۴۷).

در مطالعاتی که توسط محمد ظهور و همکارانش در مورد عصاره متانولی *D. Uncinatum* L انجام گرفته است، حاکی از تاثیر مثبت عصاره‌ی متانولی در مهار رشد باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های گرم مثبت از جمله استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سرئوس می‌باشد (۴۸).

یافته محمد ظهور و همکاران در راستای نتایج ما نبود، چرا که آن‌ها اثرات آنتی میکروبیال را به عصاره قطبی نسبت داده بودند. همچنین در مطالعه‌ای، نانوپار تیکل‌های نقره عصاره *D. denudatum* L را تهیه کرده و ملاحظه کردند اثرات نانوپار تیکل بیش تر از خود عصاره است (۴۹). همچنین با وجود این که آلکالوئیدهای دی ترپنی *D. denudatum* اثرات ضد قارچی بارزی از خود نشان دادند (۳۵)، گیاه مورد نظر ما *Delphinium speciosum* M.B هیچ گونه اثرات ضد قارچی از خود نشان نداد. عمده ترین ترکیباتی که از گونه‌های متعدد *Delphinium* جداسازی شده بود، مشتقات مختلف آلکالوئیدی بود که احتمالا عمده ترین اثرات این جنس‌ها مربوط به حضور این آلکالوئیدها می باشد (۵۰-۵۲). از طرف دیگر، اثرات قابل ملاحظه عصاره‌ی دی کلرومتانی گیاه *Chondrilla juncea* L نیز احتمالا مربوط به ترکیبات نیمه قطبی موجود در این عصاره می باشد. از ترکیبات نیمه قطبی گیاهی که خاصیت آنتی میکروبیال آن‌ها به اثبات رسیده است، می توان به آلکالوئیدها اشاره کرد. آلکالوئیدها ترکیبات نیتروژن دار هتروسیکلیک می باشند که خاصیت بازی ضعیف دارند و با مکانیسم‌های مختلف اثرات آنتی میکروبیال از خود بروز می دهند. اغلب آن‌ها با اثر بر روی آنزیم‌های DNA ژیراز، RNA پلیمراز و توپوایزومراز اثرات آنتی میکروبیال خود را اعمال می کنند (۵۲). با وجود این که بر روی گونه مورد بررسی *Chondrilla* تا به حال مطالعات فیتوشیمیایی گسترده انجام نگرفته است و ترکیبات خالصی از آن جداسازی نشده است، از گونه *caribensis* لکینی جداسازی شده است که اثرات آنتی میکروبیال قابل ملاحظه ای هم از خود نشان داده است (۳۸). شایان ذکر است که پس از انجام تست‌ها این نتایج حاصل شد که اثرات مهاري عصاره بر باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی است و علت تاثیر متفاوت عصاره بر روی این دو گروه از باکتری‌ها را می توان به تفاوت ساختاری موجود بین دیواره آن‌ها نسبت داد (۴۲). علت

احتمالی آن وجود لیپو پلی ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی می باشد که مانند سدی از عبور مولکول‌های بزرگ و آب گریز ممانعت می کند و از آن جایی که اکثر ترکیبات موثر موجود در عصاره‌های غیرقطبی ماهیت آبگریزی دارند، لذا می توان چنین نتیجه گرفت که این مواد امکان نفوذ و دسترسی به نقاط فعال داخل باکتری‌های گرم منفی را ندارند و به همین دلیل معمولاً باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بیش تری نسبت به ترکیبات گیاه نشان می دهند. در باکتری‌های گرم منفی، وجود یک غشای خارجی هیدروفیل حاوی لیپوپروتئین‌ها و لیپو پلی ساکاریدها با خاصیت نفوذپذیری انتخابی از عوامل مهم در مقاومت آن‌ها نسبت به ترکیبات ضد میکروبی محسوب می شود (۵۲). با توجه به نتایج حاصل شده در این پژوهش، مطالعات بررسی فیتوشیمیایی این گیاه انجام خواهد شد و با توجه به اهمیت بروز مقاومت آنتی بیوتیکی در پاتوژن‌های ذکر شده پیشنهاد می شود محصولات تهیه شده از این گیاه به صورت موضعی یا خوراکی مورد بررسی قرار گیرند.

در بین عصاره‌های همه گیاهان، عصاره ان هگزانی گیاه *Delphinium speciosum* نسبت به بقیه گیاهان مورد بررسی، دارای بیش ترین اثرات مهاري روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس بود. از طرفی، فراکسیون‌های ان هگزانی ۱۰ درصد و ۲۰ درصد حاصل از کروماتوگرافی مایع تحت خلا از عصاره ان هگزانی این گیاه نسبت به عصاره‌های تام، اثرات ضد میکروبی تقریباً برابری داشتند که MIC آن‌ها هم معادل عصاره می باشد.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات کاربردی دارویی و دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که در ارائه خدمات به این پروژه ما را یاری کردند، نهایت تشکر و قدردانی را می نمایم.

References

1. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infec Diseases. 8th ed. Elsevier Inc; 2014; 1-2. 3697.
2. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. Lancet Infect Dis 2013; 13(12): 1057-1098.
3. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz J Microbiol 2000; 31(4): 247-256.
4. Ashrafuzzaman M, Ali H, Liza LN, Zinnah KMA. Antimicrobial activity of some medicinal plants against multi drug resistant human pathogens. Advances in Bioscience and Bioengineering ABB 2013; 1(1): 1-24.
5. Ortega-Ramirez LA, Rodriguez-Garcia I, Leyva JM, Cruz-Valenzuela MR, Silva-Espinoza BA, Gonzalez-Aguilar GA, et al. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. J Food Sci 2014; 79(2): 129-137.
6. Terencio MC, Giner RM, Sanz MJ, Manez S, Rios J. On the occurrence of caffeoyltartronic acid and other phenolics in *Chondrilla juncea*. Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences 1993; 48(5-6): 417-419.
7. Goodarzi S, Nateghpour M, Asgharian P, Hadjiakhoondi A, Yassa N, Tavakoli S, et al. Antimalarial and cytotoxic activities of roots and fruits fractions of *Astrodaucus persicus* extract. Iran J Basic Med Sci 2017; 20(12): 1318-1323.
8. Ghahreman M, Folor Colored Iran, 1st ed. forests research institution. Tomes. 2002; 1-24.
9. Ghahreman M, Cormophytes of Iran (plant systematics), 3th ed. Tehran: 1999. P: 203-204.
10. Javidnia K, Miri R, Mehregan I, Sadeghpour H. Volatile constituents of the essential oil of *Nepeta ucrainica* L. ssp. *Kopetdaghensis* from Iran. Flavour Fragr J 2005; 20: 219-221.
11. Bottini AT, Dev V, Shah G, Mathela C, Melkani A, Nerio AT, et al. Cyclopentanomonoterpene enol acetates from *Nepeta leucophylla*. Phytomed 1992; 31(5): 1653-1657.
12. Formisano C, Rigano D, Senatore F. Chemical constituents and biological activities of *Nepeta* species. Chem Pharm Bull 2011; 8(10): 1783-1818.
13. Sajjadi SE, Ghassemi N. Volatile constituents of *Nepeta glomerulosa* Boiss. subsp. *carmanica*. Res Pharm SCI 1999; 14(5): 265-267.
14. Tepe B, Daferera D, Tepe A-S, Polissiou M, Sokmen A. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. from Turkey. Food Chemistry 2007; 103(4): 1358-1364.
15. Urones JG, Barcala PB, Marcos IS, Ferreras JF and Rodriguez AF. Diterpenoids of *Nepeta tuberosa* subs. *Reticulata*. Phytochem 1988; 27(6): 1783-1787.
16. Zargari A. Medicinal plants. Vol 3. Tehran: Tehran University Publications; 1996. P.513-514.
17. Nostro A, Cannatelli MA, Crisafi G, Alonzo V. The effect of *Nepetacataria* extract on adherence and enzyme production of *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents 2001; 18(6): 583-585.
18. Bourrel C, Perineau F, Michel G, Bessiere JM. Catnip (*Nepeta cataria* L.) essential oil: Analysis of chemical constituents, bacteriostatic and fungistatic properties. J Essent Oil Res 1993; 5(2): 159-167.

19. Adiguzel A, Ozer H, Sokmen M, Gulluce M, Sokmen A, Kilic H, et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Nepeta cataria*. *Pol J Microbiol* 2009; 58(1): 69-76.
20. Hussain J, Jamila N, Gilani A, Abbas Gh, Ahmed S. Platelet aggregation, antiglycation, cytotoxic, phytotoxic and antimicrobial activities of extracts of *Nepeta juncea*. *African J Biotech* 2009; 8 (6): 935-940.
21. Alim A, Goze I, Cetin A, Duran A, Cetinus S, Vural N. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Nepeta nuda* L. subsp. *Albiflora* (Boiss.) gams. *African J Microbiol Res* 2009; 3(8): 463-467.
22. Sonboli A, Salehi P, Yousefzadi M. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the essential Oil of *Nepeta crispa* Willd. from Iran. *Z Naturforsch C J Biosci* 2004; 59(9-10): 653-656.
23. Mohammadhosseini M, Pazoki A, Zamani HA, Akhlaghi H. Chemical Composition of the Essential Oil from Aerial Parts of *Ajuga chamaecistus* Ging. Subsp. *Scopria* in Brackish Regions of Iran. *J Essent Oil-Bear Plants* 2011; 14(1): 101-105.
24. Rahman N, Ahmad M, Riaz M, Mehjabeen JN, Ahmad R. Phytochemical, antimicrobial, insecticidal and brine shrimp lethality bioassay of the crude methanolic extract of *Ajuga parviflora* Benth. *Pak J Pharm Sci* 2013; 26(4): 751-756.
25. Ebrahimabadi AH, Noohi M, Shahbazi-Alavi H, Batooli H. Antibacterial properties of *Ajuga chamaecistus* subsp. *scoparia* and chemical composition of its oils. *Journal of Medicinal Plants and By-products* 2016; 1(5): 67-73.
26. Camps F, Coll J. Insect allelochemicals from *Ajuga* plants. *Phytochemistry* 1993; 32(6): 1361-1370.
27. Takasaki M, Tokuda H, Nishino H, Konoshima T. Cancer Chemopreventive Agents (Antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*. *J Nat Prod* 1999; 62(7): 972-975.
28. Israili ZH, Lyoussi B. Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22(4): 425-462.
29. Mamadalieva NZ, El-Readi M, Ovidi E, Ashour M, Hamoud R, Sagdullaev SH, et al. Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica*. *Phyto Pharmacol* 2013; 4(1): 1-18.
30. Turkoglu S, Kahyaoglu M, Celik S. Determination of antimicrobial and antioxidant activities of Turkish endemic *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *euphratica* P.H. Davis (Lamiaceae). *Med Plants Res* 2010; 4(13): 1260-1268.
31. Rahman N, Ahmad M, Riaz M, Mehjabeen M, Jahan N, Ahmad R. Phytochemical, antimicrobial, insecticidal and brine shrimp lethality bioassay of the crude methanolic extract of *Ajuga parviflora* Benth. *Pak J Pharm Sci* 2013; 26(4): 751-756.
32. Toiu A, Vlase L, Arsene AL, Vodnar, Dan C, Oniga L. LC/UV/MS profile of polyphenols, antioxidant and antimicrobial effects of *ajuga genevensis*. *Farmacia* 2016; 64(1): 53-57.
33. Kolar FR, Ghatge SR, Kedage VV, Dixit GB. An assessment of phytochemical constituents and antioxidant potential of *Delphinium malabaricum* (Huth) Munz. *Turk J Biochem* 2014; 39(3): 277-284.
34. Raza M, Shaheen F, Choudhary M, Sombati S, Rafiq A, Suria A, et al. Anticonvulsant activities of ethanolic extract and aqueous fraction isolated from *Delphinium denudatum*. *J Ethnopharma* 2001; 78(1): 73-78.

35. Atta-ur-Rahman, Nasreen A, Akhtar F, Shekhani MS, Clardy J, Parvez M, et al. Antifungal diterpenoid alkaloids from *Delphinium denudatum*. *J Natural Products* 1997; 60(5): 472-474.
36. Güleç C, Yayli N, Yesilgil P, Terzioglu S, Yayli N. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from the flowers of *Delphinium formosum*. *Asian J Chem* 2007, 19(5): 4069-4074.
37. Gheybi S, Asnaashari S, Moghaddam SB, Ebrahimi A, Afshar FH. Volatile components of aerial parts of *Delphinium speciosum* M.B. growing in Iran. *J of Reports in Pharm Scie(JRPS)* 2015; 4(2): 191-195.
38. Marques DN, Almeida AS, Sousa ARO, Pereira R, Andrade AL, Chaves RP, et al. Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. *Int J Biol Macromol* 2018; 109: 1292-1301.
39. Chelossi E, Pantile R, Pronzato R, Milanese M, Hentschel U. Bacteria with antimicrobial properties isolated from the Mediterranean sponges *Chondrilla nucula* and *Petrosia ficiformis*. *Aquat Microb Ecol* 2007; 49(2): 157-163.
40. Tofighi Z, Molazem M, Doostdar B, Taban P, Shahverdi AR, Samadi N, et al. Antimicrobial Activities of Three Medicinal Plants and Investigation of Flavonoids of *Tripleurospermum disciforme*. *Iran J Pharm Res* 2015; 14(1): 225-231.
41. Vitko NP, Richardson AR. Laboratory Maintenance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Curr Protoc Microbiol* 2013; 12: 200-302 (Chapter 9:Unit 9C.2.).
42. Termentzi A, Fokialakis N, Skaltsounis AL. Natural resins and bioactive natural products thereof as potential anitmicrobial agents. *Curr Pharm Des* 2011; 17(13): 1267-1290.
43. Kurek A, Grudniak AM, Krackiewicz-Dowjat A, Wolska KI. New antibacterial therapeutics and strategies. *Pol J Microbiol* 2011; 60(1): 3-12.
44. Goodarzi S, Hadjiakhoondi A, Yassa N, Khanavi M, Tofighi Z. Essential oils chemical composition, antioxidant activities and total phenols of *Astrodaucus persicus*. *Iranian J of Basic Med Scie* 2016; 19(2): 159-165.
45. Karou D, Savadogo A, Canini A, Yameogo S, Montesano C, Simpore J, et al. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *Afr J Biotechnol* 2005; 4(12): 1452-1457.
46. Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm Biol* 2011; 49(4): 396-402.
47. Zahoor M, Khan N. Antibacterial activities of methanolic extracts of aerial parts of *delphinium uncinatum hook's* and *thoms*. *Science Technology and Development* 2014; 33(2): 77-79.
48. Suresh G, Gunasekar PH, Kokila D, Prabhu D, Dinesh D, Ravichandran N, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Delphinium denudatum* root extract exhibits antibacterial and mosquito larvicidal activities. *Molecul Biomolecul Spect* 2014; 127(5): 61-66.
49. Reina M, Mancha R, González-Coloma A, Bailen M, Rodriguez ML, Martínez-Díaz RA. Diterpenoid alkaloids from *Delphinium gracile*. *Nat Prod Res* 2007; 21(12): 1048-1055.
50. Wang SH, Zhou XL, Gong XM, Fan XY, Shen Lan M. Norditerpenoid alkaloids from *Delphinium anthriscifolium*. *J Asian Nat Prod Res* 2016; 18(2): 141-146.

51. Chen FZ, Chen QH, Wang FP. C19-Diterpenoid alkaloids from *Delphinium umbrosum*. J Asian Nat Prod Res 2010; 12(6): 498-504.
52. Ramkumar KM, Rajaguru P, Ananthan R. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of an antidiabetic plant *Gymnema montanum*. Adv Biol Res 2007; 1(1-2): 67-71.