Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Comparison of Antimicrobial Effects of Two Medicinal Plants Eryngium Planum and *Stachys Lavandulifolia* on Oral Pathogens in Vitro Models

Mahdi Eidizade [1], Parastoo Zarghami Moghaddam [2], Farid Haghdadi [3], Alireza Afshari-Safavi [4], Peiman Alesheikh [2*]

[1] Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[2] Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[3] Dept of Endodontics, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[4] Dept of Biostatistics and Epidemiology, Faculty of Health, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: Jun. 18, 2024
Received in revised form: Oct. 08, 2024
Accepted: Oct. 12, 2024
Published Online: Feb. 03,2025

**** Correspondence to:***
Peiman Alesheikh
Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

Email:
arezoopayman@yahoo.com

A B S T R A C T

Introduction: Nowadays, caries and fungal diseases make up a large part of dental diseases. Due to this, researchers are trying to find substances with fewer side effects. Therefore, the present study was conducted on two plants, Eryngium planum and *Stachys lavandulifolia*, on oral pathogens (*Streptococcus mutans* and *Candida albicans*).

Materials & Methods: Ethanol extract was prepared by the maceration method. The effectiveness of extracts and their combinations were investigated on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in comparison to positive controls by three methods such as disc diffusion, well, and biofilm prevention methods. In order to compare the growth of bacteria, SPSS V.17 and an analysis of variance test were used at a level of significance less than 0.05.

Results: The present study showed that the antimicrobial effects of two plants (*E. planum* and *S. iavandulifolia*) are not significant compared to the antibiotics such as ciprofloxacin, nystatin, and chlorhexidine ($P > 0.05$). On the other hand, there was no change in improving the effect of two plants by combining different ratios of extracts ($P > 0.05$). Among the studied treatments, the antimicrobial effect of ethanol extract of *E. planum* (100%) was greater than others ($P<0.05$). The results showed that all samples were in the range of weak biofilm formation.

Conclusion: Two medicinal plants, *E. planum* and *S. iavandulifolia*, did not show significant inhibitory effects on the growth of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. compared to commercial mouthwash chlorhexidine and antibiotics ciprofloxacin and nystatin.

Keywords: *Eryngium planum, Stachys lavandulifolia, Streptococcus mutans, Candida albicans*

How to cite this paper: Eidizade M, Zarghami Moghaddam P, Haghdadi F, Afshari-Safavi A, Alesheikh P. Comparison of Antimicrobial Effects of Two Medicinal Plants Eryngium Planum and *Stachys Lavandulifolia* on Oral Pathogens in Vitro Models. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2025;32(6):97-108.

Introduction

Today, infectious diseases are caused by bacteria. One of the most common diseases is found in the mouth and teeth (1). These diseases can be classified into two general categories: tooth decay and periodontal diseases (2). Dental caries is a type of chronic infectious disease. The oral flora contains agents, including *Streptococcus mutans* bacteria. *Candida albicans* fungus is known to be the most important causative factor (2). For many years, chlorhexidine has been used as a strong Anti-plaque and antimicrobial compound that has a wide range of applications in dentistry. disorders (3). Despite this, the use of chlorhexidine has disadvantages, such as an unpleasant taste, not being effective on acid-resistant bacteria, and discoloration of teeth due to long-term use (2-4); for this reason, several cases of mouthwashes and herbal extracts were tested and evaluated as an alternative to chlorhexidine and showed higher positive effects than Chlorhexidine also reduces its side

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

effects (4). Therefore, the present study was conducted on two plants, Eryngium planum and *Stachys lavandulifolia*, and oral pathogens (*Streptococcus mutans* and *Candida albicans*).

Methods

Ethanol extract was prepared by the maceration method. The effectiveness of extracts and their combinations were investigated on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in comparison to positive controls by three methods such as disc diffusion, well, and biofilm prevention methods. In order to compare the growth of bacteria, SPSS V.17 and an analysis of variance test were used at a level of significance less than 0.05.

Results

The results show that the antimicrobial effect of two plants compared to ciprofloxacin antibiotic, nystatin antifungal, and chlorhexidine mouthwash on *Streptococcus mutans* bacteria and Candida fungus albicans has not been very impressive ($P<0.05$). On the other hand, by combining different proportions of the extract, there was no change in the improvement of the effect of the two plants, and the combination of the extracts decreased the antibacterial and antifungal effects ($P<0.05$). Among the studied treatments, the antimicrobial effect of ethanol extract of *E. planum* (100%) was greater than others ($P > 0.05$). The results of determining the inhibitory effect of ethanolic and combined extracts of two plants on biofilm Formation showed that during the 48 hours the studied bacteria and fungus had the opportunity to form biofilm on the inner surfaces of the microplate. The inhibitory effect of all examined samples was in the range of weak biofilm formation, which their comparison with each other showed, among them, the inhibitory effect of biofilm formation of the ethanolic extract of Eryngium planum and *Stachys lavandulifolia* on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, compared to other cases, were more.

Conclusion

Eryngium planum and *Stachys lavandulifolia*, which are used orally in traditional medicine, have the ability to reduce the formation of biofilm and have moderate antibacterial properties, and their use can reduce costs. On the other hand, because this solution is natural and has no negative effect on humans and consumers' confidence, its use is easily recommended.

Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology: Validation, Formal Analysis, Software, Investigation, Resources, Data Curation, Writing– Original Draft Preparation, Writing– Review & Editing, Visualization, Supervision, Project Administration: ME, PZM, FH, AAS, PA.

Ethical Statement

The study was approved by the Ethics Committee of the in North Khorasan University of Medical Sciences (Iran) with ethic code of IR.NKUMS.REC.1402.048. The authors adhered to ethical standards by avoiding data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This research has received assistance from the North Khorasan University of Medical Sciences.

Acknowledgment

The present research is extracted from the doctoral thesis in dentistry. By this means, the staff of the Natural Products Research Center medicinal plants of the North Khorasan University of Medical Sciences are gratefully acknowledged.

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

مقایسهٔ اثر ضدمیکروبی دو گیاه دارویی زولنگ و چای کوهی روی پاتوژن‌های دهانی در نمونهٔ آزمایشگاهی

مهدی عیدی زاده [۱]، پرستو ضرغامی مقدم [۲]، فرید حقدادی [۳]، علیرضا افشاری صفوی [٤]، پیمان آل شیخ [۲*]

[۱] دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

[۲] مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

[۳] گروه اندودونتیکس ، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

[۴] گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بجنورد، بجنورد، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۹

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۱۱/۱۵

نویسنده مسئول:
پیمان آل شیخ
مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

Email:
arezoopayman@yahoo.com

چکیده

مقدمه: امروزه پوسیدگی و بیماری‌های قارچی سهم بسیاری از بیماری‌های مرتبط با دندان را به خود اختصاص داده‌اند. با توجه به همین امر، پژوهشگران در تلاش برای یافتن موادی با عوارض کمتر هستند. مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی دو گیاه زولنگ و چای کوهی بر پاتوژن‌های دهانی (*استرپتوکوکوس موتانس* و *کاندیدا آلبیکنس*) انجام شد.

مواد و روش‌ها: عصارهٔ اتانولی به روش خیساندن تهیه گردید. اثربخشی عصاره‌ها و ترکیب آن‌ها در مقایسه با گروه‌های کنترل مثبت روی *استرپتوکوکوس موتانس* و *کاندیدا آلبیکنس* با سه روش چاهک پلیت، انتشار از دیسک و ممانعت از تشکیل بیوفیلم بررسی شد. به‌منظور مقایسهٔ میانگین قطر هالهٔ عدم رشد باکتری از نرم‌افزار SPSS vol.17 و آزمون آنالیز واریانس استفاده گردید. در همهٔ آزمون‌ها سطح معنی‌داری ۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش: مطالعهٔ حاضر نشان داد که اثر ضدمیکروبی دو گیاه زولنگ و چای کوهی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، ضدقارچ نیستاتین و دهان‌شویهٔ کلرهگزیدین چندان چشمگیر نیست. از سویی، با ترکیب کردن نسبت‌های مختلف عصاره نیز تغییری در بهبود اثر دو گیاه حاصل نشد. در میان تیمارهای مطالعه‌شده نیز، اثر ضدمیکروبی عصارهٔ اتانولی (۱۰۰ درصد) زولنگ نسبت به سایر ترکیب‌ها بیشتر ثبت گردید ($P<0.05$). نتایج تعیین میزان اثر مهاری در تشکیل بیوفیلم نشان داد که همهٔ نمونه‌ها در محدودهٔ تشکیل بیوفیلم ضعیف قرار داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: دو گیاه دارویی زولنگ و چای کوهی آثار مهاری چشمگیری در مقایسه با دهان‌شویهٔ تجاری کلرهگزیدین و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و ضدقارچ نیستاتین بر رشد دو گونهٔ *استرپتوکوکوس موتانس* و *کاندیدا آلبیکنس* از خود نشان ندادند.

واژه‌های کلیدی: زولنگ (*Eryngium planum*)، چای کوهی (*Stachys Lavandulifolia*)، *استرپتوکوکوس موتانس*، *کاندیدا آلبیکنس*

استناد: عیدی زاده مهدی، ضرغامی مقدم پرستو، حقدادی فرید، افشاری صفوی علیرضا، آل شیخ پیمان. مقایسهٔ اثر ضدمیکروبی دو گیاه دارویی زولنگ و چای کوهی روی پاتوژن‌های دهانی در نمونهٔ آزمایشگاهی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، بهمن ۱۴۰۳؛ (۶)۳۲: ۱۰۸-۹۷.

CC BY NC

حق‌مؤلف © نویسندگان

مقدمه

امروزه بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌ها در دهان و دندان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها است. این بیماری‌ها را می توان در دو دستهٔ بسیار کلی پوسیدگی‌های دندانی و بیماری های پریودنتال قرار داد. پوسیدگی‌های دندانی عفونت مزمن چندعاملی مرتبط با پلاک دندان است که نواحی مینای دندان، سمنتوم و یا عاج دندان را درگیر می‌کند. بیماری‌های پریودنتال نیز بسیار متنوع هستند و به دو گروه بیماری‌های التهابی لثه و بیماری‌های التهابی بافت‌های نگه‌دارنده دندانی طبقه‌بندی می‌شوند (۱). درواقع، این بیماری‌ها نتیجهٔ برهم‌کنش‌های پیچیدهٔ میان میکروفلور دهان، حساسیت میزبانی و عامل‌های محیطی نظیر سیگار کشیدن، رژیم غذایی، سطح رعایت بهداشت دهان و غیره است (۲). پوسیدگی دندانی نوعی بیماری عفونی مزمن است که عوامل آن در فلور دهانی وجود دارند و باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* از مهم‌ترین عوامل مسبب آن شناخته‌شده است (۳). *استرپتوکوکوس موتانس* مهم‌ترین میکروارگانیسمی است که پوسیدگی‌زایی آن به اثبات رسیده و در پلاک دندانی موجود است و تاکنون ۲۵ گونه *استرپتوکوکوس* کشف‌شده است که با تولید اسید لاکتیک و تخمیر سوکروز موجب از بین رفتن مینا دندان می‌شود (۴). قارچ *کاندیدا آلبیکنس* نیز در دهان حدود ۲۵ تا ۶۵ درصد از افراد سالم یافت می¬شود. ارتباط میان گونه¬های کاندیدا با استوماتیت ناشی از پروتز به اثبات رسیده است و رزین¬های آکریلی موجود در پروتز به‌عنوان عامل ایجادکنندهٔ این التهاب مطرح است (۵). شاخص پوسیدگی دندان نشان‌دهندهٔ وضعیت بهداشت دهان و دندان در میان افراد جامعه است. شیوع پوسیدگی‌های دندانی در میان مردم تعدادی از کشورهای صنعتی به‌طور محسوسی افزایش یافته است. متأسفانه تغییراتی که در روش زندگی و انتخاب مواد غذایی در کشورهای در حال رشد به‌وجودآمده است، باعث افزایش سریع شیوع پوسیدگی‌های دندانی شده است (۶). سالیان سال است که کلرهگزیدین به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌پلاک و آنتی‌میکروبی قوی در دندان‌پزشکی در طیف گسترده‌ای از اختلالات استفاده می‌گردد. با وجود این، استفاده از کلرهگزیدین معایبی ازجمله طعم نامطلوب، مؤثر نبودن روی باسیل‌های مقاوم به اسید و رنگ‌پذیری دندان‌ها در اثر استفادهٔ طولانی مدت نیز دارد؛ به همین علت، چندین مورد از دهان‌شویه‌ها و عصاره‌های گیاهی به‌عنوان جایگزین کلرهگزیدین آزمایش و بررسی شدند و آثار مثبت بالاتر از کلرهگزیدین را در کنار کاهش عوارض آن نشان دادند (۷). به علت افزایش مقاومتی که عوامل بیماری‌های عفونی نسبت به داروهای شیمیایی به‌مرورزمان از خود نشان داده‌اند و از سوی دیگر، با توجه به عوارض جانبی و هزینه‌های درمانی بالایی که داروهای شیمیایی و سنتزی بر جوامع بشری تحمیل می‌کنند، در دهه‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی با منشأ طبیعی رایج شده است. اهمیت استفاده از گیاهان دارویی و طبیعی در پیشگیری از بیماری‌ها، درمان و ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زا به‌خوبی شناخته‌شده است (۹، ۸). چای کوهی با نام علمی *Stachys lavandulifolia* از خانوادهٔ سنبله‌ای است. جوشاندهٔ این گیاه برای معالجه و درمان ضعف عمومی و ممتد ناشی از صرع و افسردگی و ناراحتی‌های دستگاه عصبی به‌کار می‌رود (۱۰). اندام‌های هوایی گیاه برای درمان مالاریا و برگ و گل‌های آن به حالت دم‌کرده مقوی معده است. این گیاه اثر تحریک‌کننده در معده از خود نشان می‌دهد و در طب سنتی، برای رفع مشکلات دستگاه گوارشی و معده از جوشانده آن استفاده می‌شود و اثر ضدمیکروبی چای کوهی بر باکتری و قارچ‌های پاتوژن در مطالعات مختلف بیان‌شده است (۱۱، ۱۰). گیاه زولنگ/ چوچاق با نام علمی *Eryngium planum*، یکی از گونه‌های مهم خانوادهٔ *Umbelliferae* و متعلق به خانوادهٔ چتریان (Apiaceae) است که توزیع گسترده‌ای در مناطق شمال ایران دارد. این گیاه به‌عنوان دارو، سبزی خوراکی و عامل طعم‌دهندهٔ مواد غذایی استفاده می‌گردد. با توجه به توزیع گسترده و مصرف این گیاه در غذاهای محلی، سنجش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی ترکیبات آن حائز اهمیت است. این گیاه علفی از مهم‌ترین سبزیجات محلی دارویی در فرهنگ مردم شمال ایران محسوب می‌شود. برگ‌های تازهٔ گیاه به‌عنوان یک مقوی بهاره و گرم در درمان

فشارخون، رماتیسم، درد، تصفیهٔ خون و دفع سموم از کلیه و کبد استفاده می‌گردد و خواص درمانی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی دارد. برگ و ساقهٔ این گیاه به‌عنوان طعم‌دهنده در ترشیجات و بعضاً غذاها نیز استفاده می شود (۱۲). مطالعهٔ حاضر به بررسی اثر ضدمیکروبی عصارهٔ اتانولی و ترکیبی غلظت‌های مختلف گیاه دارویی زولنگ و چای کوهی بر پاتوژن‌های دهانی (*استرپتوکوکوس موتانس* و *کاندیدا آلبیکنس*) می‌پردازد.

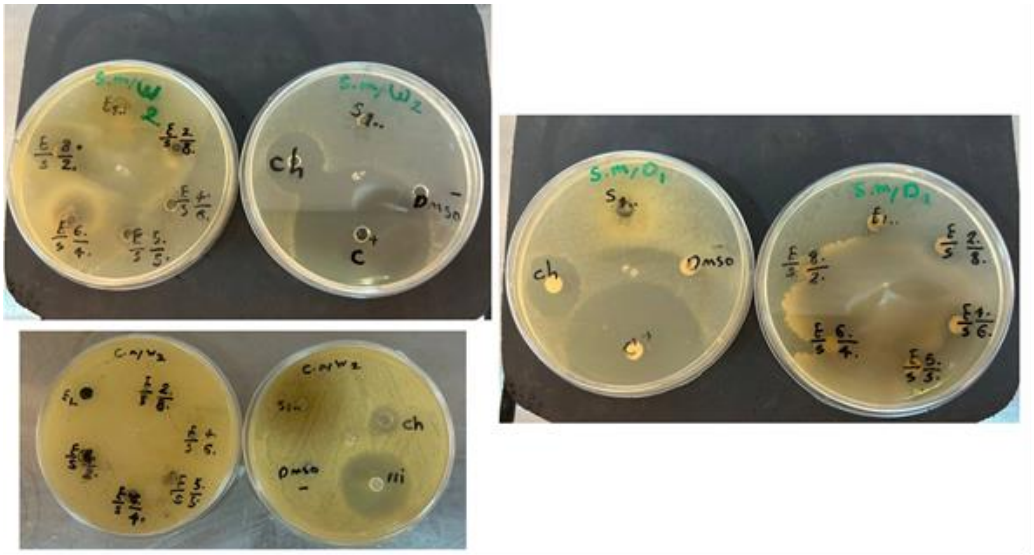
مواد و روش‌ها

سوش‌های میکروبی: در این مطالعهٔ آزمایشگاهی، سوش استاندارد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* (IBRC-M 10682) و سوش استاندارد قارچ *کاندیدا آلبیکنس* (IBRC-M 30070) از مرکز تحقیقات ژنتیک ایران تهیه و بررسی شد.

تهیهٔ عصاره‌های گیاهی: گیاهان مطالعه‌شده، زولنگ و چای کوهی، با کد هرباریومی NO. 1020 و NO. 1118، توسط هرباریوم مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی شناسایی گردید. پس از جمع‌آوری و خشک کردن در سایه در مجاورت هوا، پودر شد و عصاره‌گیری به روش خیساندن با حلال اتانول به مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت و با استفاده از تبخیرکنندهٔ چرخان (روتاری- هایدولف، آلمان) تغلیظ گردید و پودر عصارهٔ حاصله تا زمان آزمایش در یخچال (+C4°) نگهداری شد (۱۳).

تعیین فعالیت ضدمیکروبی: فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها و ترکیبی از آن‌ها با نسبت‌های مختلف (۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰ درصد) با استفاده از روش‌های انتشار از دیسک، چاهک پلیت و ممانعت از تشکیل بیوفیلم انجام گردید.

روش انتشار از دیسک: در این آزمایش، دیسک‌های آغشته به ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ اتانولی (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر) اتانولی و ترکیبی گیاه زولنگ و چای کوهی با نسبت‌های مختلف (۸۰-۲۰، ۶۰-۴۰، ۵۰-۵۰، ۴۰-۶۰ و ۲۰-۸۰)، آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (سیپلکس ۰/۳ درصد) با نام تجاری سیپروکسین و ضدقارچ نیستاتین (۱۰۰ هزار واحد در میلی‌لیتر) با نام تجاری نیستات و دهان‌شویهٔ کلرهگزیدین (ناژو ۰/۲ درصد) به‌عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی دی‌متیل سولفوکساید به‌عنوان کنترل منفی، به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور برای خشک شدن قرار داده شدند (۱۳)؛ سپس دیسک‌ها روی محیط کشت مناسب سوبیین کازیین آگار که پیش‌تر توسط تلقیح میکروبی (معادل نیم مک‌فارلند) به *استرپتوکوکوس موتانس* و *کاندیدا آلبیکنس* آغشته شده بود، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور متناسب با شرایط رشد هر میکروارگانیسم قرار گرفتند. در پایان، برای بررسی آثار ضدباکتری و ضدقارچی گیاهان، اندازهٔ هالهٔ عدم رشد دیسک‌های مطالعه‌شده بر اساس میلی‌متر با یکدیگر مقایسه گردیدند (۱۳) (شکل شمارهٔ ۱).



شکل شماره ۱. بررسی هالهٔ عدم رشد در روش چاهک پلیت و انتشار دیسک قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و باکتری *استرپتوکوکوس*

روش چاهک پلیت: آثار ضدباکتری و ضدقارچی عصارهٔ اتانولی و ترکیبی گیاه زولنگ و چای کوهی با غلظت‌های (۸۰-۲۰، ۶۰-۴۰، ۵۰-۵۰، ۴۰-۶۰ و ۲۰-۸۰) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش چاهک پلیت انجام شد (۱۴). در این روش، از پلیت‌های حاوی محیط کشت سوبیین کازیین آگار استفاده گردید که آغشته به باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* (معادل نیم مک‌فارلند) بودند. میزان ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ها درون چاهک‌هایی افزوده شد که توسط پیپت پاستور استریل ایجاد گردیده بود. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور متناسب با شرایط رشد هر میکروارگانیسم قرار گرفتند. پس از آن، میزان مناطق مهاری ارزیابی شد و بر اساس میلی‌متر محاسبه گردید. چاهک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (سیپلکس ۰/۳ درصد) و ضدقارچ نیستاتین (۱۰۰ هزار واحد در میلی‌لیتر) و دهان‌شویهٔ کلرهگزیدین (ناژو ۰/۲ درصد) به‌عنوان کنترل مثبت و مایع دی‌متیل سولفوکساید به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند (شکل شمارهٔ ۱).

ممانعت از تشکیل بیوفیلم: بررسی اثر ضد بیوفیلم عصارهٔ اتانولی و ترکیبی گیاه زولنگ و چای کوهی با غلظت‌های (۸۰-۲۰، ۶۰-۴۰، ۵۰-۵۰، ۴۰-۶۰ و ۲۰-۸۰) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با روش میکروتیتر پلیت و رنگ‌سنجی با کریستال ویوله انجام گردید. روش اندازه‌گیری به این صورت است که ابتدا ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت سوبیین کازیین براث داخل چاهک‌های میکروتیترپلیت ۹۶ خانه افزوده شد. چاهک اول محیط کشت بدون عصاره به‌عنوان شاهد مثبت بود و در چاهک‌های بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف به‌دست‌آمده به محیط کشت اضافه گردید. یک چاهک هم به‌عنوان شاهد منفی بدون عصاره و باکتری در نظر گرفته شد. در مرحلهٔ بعد، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروارگانیسم‌های مطالعه‌شده به همهٔ چاهک‌ها (به‌جز شاهد منفی) اضافه گردید. میکروپلیت در انکوباتور متناسب با شرایط رشد هر میکروارگانیسم به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری و سپس محتویات داخل چاهک‌ها به‌آرامی خالی و همهٔ چاهک‌ها سه بار با بافر فسفات شستشو داده شدند. میکروتیتر پلیت در دمای اتاق خشک گردید. در مرحلهٔ بعد، با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر متانول به هر چاهک، باکتری های متصل به سطح داخلی دیوارهٔ چاهک‌ها تثبیت شدند که همان جمعیت بیوفیلمی هستند. پس از ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها دور ریخته شد و پلیت‌ها در درجه حرارت اتاق خشک گردیدند. به‌منظور رنگ‌آمیزی، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویولهٔ ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه اضافه شد؛ سپس رنگ اضافی به‌طور کامل توسط جریان ملایم آب شسته شد و میکروپلیت در دمای اتاق خشک گردید. پس از این مرحله، برای سنجش میزان رنگ متصل‌شده به دیواره که نمایانگر میزان بیوفیلم است، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳ درصد اضافه و چند بار با سمپلر به‌خوبی هم‌زده شد تا رنگ‌های متصل به چاهک که بیان‌کنندهٔ میزان تشکیل بیوفیلم است، به‌خوبی حل گردد. پس از یکنواخت شدن محلول هر چاهک، میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا (Biotek- آلمان) خوانده شد (۱۴) (شکل شمارهٔ ۲).

شکل شمارهٔ ۲. بررسی تشکیل بیوفیلم در تیمارهای متفاوت دو گیاه زولنگ و چای کوهی

وضعیت تشکیل بیوفیلم در چاهک‌ها مطابق جدول شمارهٔ ۱ محاسبه شد.

جدول شمارهٔ ۱. محاسبهٔ وضعیت تشکیل بیوفیلم در چاهک‌ها

وضعیت تشکیل بیوفیلم	مقایسهٔ میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل و تیمار
تشکیل نشدن بیوفیلم	$OD^{*} \leq ODC^{**}$
قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف	$ODC < OD \leq (2 \times ODC)$
قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط	$(2 \times ODC) < OD \leq (4 \times ODC)$
قدرت تشکیل بیوفیلم قوی	$(4 \times ODC) < OD$

*OD. میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار؛ **ODC. میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل

در ادامه، قدرت مهاری تشکیل بیوفیلم با فرمول زیر محاسبه گردید:

100×(کنترل OD)/(تیمار OD-کنترل OD)=درصد کاهش میزان بیوفیلم

که در این فرمول OD میانگین جذب نوری چاهک‌ها می‌باشد. مطالعهٔ حاضر با کد اخلاق مصوب شمارهٔ IR.NKUMS.REC.1402.048 در دانشکدهٔ دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی تصویب‌شده است. به‌منظور مقایسهٔ میانگین قطر هالهٔ عدم رشد باکتری در گروه‌های پژوهش از نرم‌افزار SPSS vol.17 و آزمون آنالیز واریانس استفاده گردید. در همهٔ آزمون‌ها سطح معنی‌داری ۵ درصد در نظر گرفته شد.

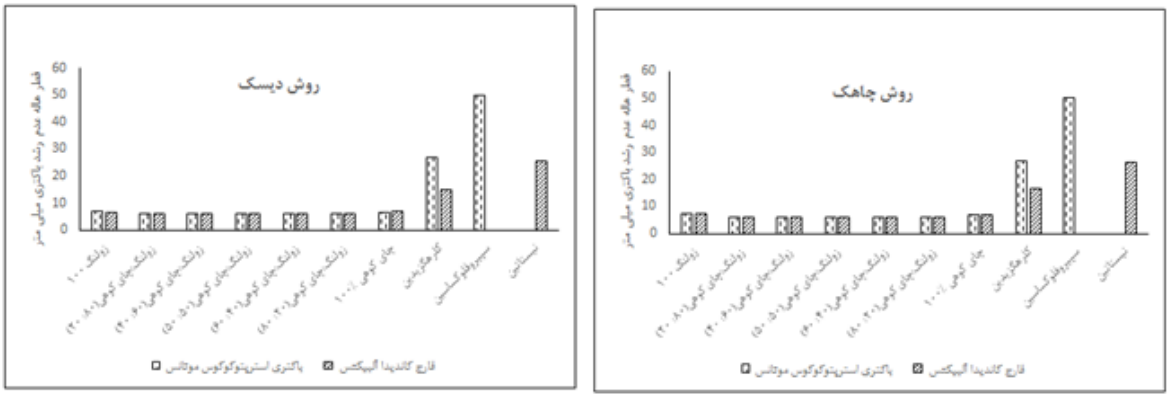
یافته‌های پژوهش

در این مطالعه، تأثیر ضدباکتریایی و ضدقارچی عصارهٔ اتانولی و غلظت‌های مختلف دو گیاه زولنگ و چای کوهی بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، به دو روش انتشار از دیسک و چاهک، در شکل شمارهٔ ۳ و جدول شمارهٔ ۲ نشان داده‌شده است. قطر هالهٔ عدم رشد باکتری و قارچ توسط دو گیاه در شکل شمارهٔ ۳ مقایسه گردیده است، نتایج بیان‌کنندهٔ آن است که اثر ضدمیکروبی این دو گیاه (هالهٔ عدم رشد ۷ میلی‌متر) در مقایسه با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (هالهٔ عدم رشد ۵۰ میلی‌متر)، ضدقارچ نیستاتین (هالهٔ عدم رشد ۲۵ میلی‌متر) و دهان‌شویهٔ کلرهگزیدین (هالهٔ عدم رشد ۲۶ میلی‌متر بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* و ۱۵ میلی‌متر قارچ *کاندیدا آلبیکنس*) چندان چشمگیر نبوده است. از سویی، با ترکیب کردن نسبت‌های مختلف عصاره نیز تغییری در بهبود اثر دو گیاه به‌دست نیامد و ترکیب عصاره‌ها باعث کاهش اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی نیز شد، به‌طوری‌که در میان

تیمارهای مطالعه‌شده نیز اثر ضدمیکروبی عصارهٔ اتانولی (۱۰۰ درصد) دو گیاه چای کوهی و زولنگ نسبت به سایر ترکیب‌ها بیشتر ثبت گردیدن؛ اما در مقایسه با اثر ضدمیکروبی گروه کنترل مثبت، تأثیر آن‌ها چندان قابل‌ملاحظه نبود. کلرهگزیدین نیز در این دو روش نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و ضدقارچ نیستاتین، اثر کمتری بر باکتری و قارچ مطالعه‌شده داشت.

جدول شمارهٔ ۲. قطر هالهٔ عدم رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* و قارچ کاندیدا آلبیکنس توسط نسبت‌های مختلف چای کوهی و گیاه زولنگ به دو روش انتشار دیسک و چاهک

ترکیب استفاده‌شده	باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*		قارچ *کاندیدا آلبیکنس*	
	دیسک انحراف معیار±میانگین	چاهک انحراف معیار±میانگین	دیسک انحراف معیار±میانگین	چاهک انحراف معیار±میانگین
گیاه زولنگ ۱۰۰	۷/۰۰±۱/۰	۷/۳۴±۰/۲۲	۶/۶۷±۰/۳۳	۷/۳۴±۰/۲۲
گیاه زولنگ ۸۰: چای کوهی ۲۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰
گیاه زولنگ ۶۰: چای کوهی ۴۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰
گیاه زولنگ ۵۰: چای کوهی ۵۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰
گیاه زولنگ ۴۰: چای کوهی ۶۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰
گیاه زولنگ ۲۰: چای کوهی ۸۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰
چای کوهی ۱۰۰	۶/۶۷±۰/۳۳	۷±۰/۰	۷±۰/۰	۷±۰/۰
کلرهگزیدین	۲۶/۶۷±۱/۵۱	۲۶/۶۷±۱/۵۳	۱۵/۰۰±۲/۰۰	۱۶/۶۷±۱/۱۵
دی‌متیل سولفوکساید	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰	۶/۰۰±۰/۰
Ciprofloxacin	۴۹/۶۷±۱/۵۳	۵۰/۳۳±۲/۵۲	ندارد	ندارد
Nystatin	ندارد	ندارد	۲۵/۳۳±۲/۵۲	۲۶/۳۳±۲/۰۸



شکل شماره ۳. توزیع اثر غلظت‌های مختلف چای کوهی و گیاه زولنگ بر رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* و قارچ کاندیدا آلبیکنس به دو روش انتشار دیسک و چاهک

اختلاف میانگین قطر هالهٔ عدم رشد میان تیمارهای ترکیبی از عصاره‌ها (۸۰ درصد زولنگ و ۲۰ درصد چای کوهی تا ۲۰ درصد زولنگ و ۸۰ درصد چای کوهی) با کلرهگزیدین برابر با ۲۰/۶۶ و نسبت به سیپروفلوکساسین برابر با ۴۳/۶۶ و نسبت به نیستاتین برابر با ۱۹/۳۳ واحد بود که این اختلاف‌ها به لحاظ آماری معنادار بود ($P<0,001$). نتایج

تعیین میزان اثر مهاری عصارهٔ اتانولی و ترکیبی دو گیاه چای کوهی و زولنگ در تشکیل بیوفیلم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* نشان داد که در مدت زمان ۴۸ ساعت که باکتری و قارچ مطالعه‌شده فرصت تشکیل بیوفیلم روی سطوح داخلی میکروپلیت را داشتند، میزان اثر مهاری همهٔ نمونه‌های بررسی‌شده در محدودهٔ تشکیل بیوفیلم ضعیف قرار داشتند که مقایسهٔ آن‌ها با یکدیگر نشان داد، در میان آن‌ها، اثر مهاری تشکیل بیوفیلم عصارهٔ اتانولی گیاه چای کوهی و زولنگ بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، در مقایسه با سایر موارد، بیشتر بود (جدول شمارهٔ ۳).

جدول شمارهٔ ۳. میزان درصد کاهش بیوفیلم در تیمارهای متفاوت دو گیاه زولنگ و چای کوهی

ردیف	تیمار	درصد کاهش بیوفیلم	
		کاندیدا آلبیکنس	*استرپتوکوکوس موتانس*
۱	زولنگ ۱۰۰	۱۸/۵۷±۰/۰۱۱	۱۳/۹۹±۰/۰۱۷
۲	زولنگ: چای کوهی (۸۰: ۲۰)	۹/۹۲±۰/۰۸۵	۲/۹۸±۰/۰۰۵۶
۳	زولنگ: چای کوهی (۶۰: ۴۰)	۱۴/۵±۰/۰۰۷	۶/۱۹±۰/۰۰۸۵
۴	زولنگ: چای کوهی (۵۰: ۵۰)	۱۴/۲±۰/۰۳۲	۵/۷۳±۰/۰۲۲
۵	زولنگ: چای کوهی (۴۰: ۶۰)	۵/۲±۰/۰۰۱۵	۲/۵±۰/۰۰۲۵
۶	زولنگ: چای کوهی (۲۰: ۸۰)	۴/۲±۰/۰۲۸	۲/۴±۰/۰۰۲۰
۷	چای کوهی ٪۱۰۰	۲۰/۰±۰/۰۱۳	۱۳/۴±۰/۰۱۶

بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون مطالعات متعددی به بررسی خواص ضدباکتری و ضدقارچی گیاهان مختلف دارویی در ایران پرداخته‌اند. در مطالعهٔ حاضر به بررسی دو گیاه زولنگ و چای کوهی پرداخته شد. در مطالعهٔ حاضر، آثار ضدباکتریایی و ضدقارچی در هیچ‌یک از غلظت‌های گیاه چای کوهی و زولنگ مشاهده نگردید. کرمر و همکاران نشان دادند که اثر ضدقارچی عصارهٔ متانولی برگ دو گونهٔ .E amethystinum و E. alpinum بر سویهٔ استاندارد کاندیدا بیشتر از سایر جدایه‌های بالینی است. تفاوت مطالعهٔ حاضر با این پژوهش در نوع حلال انتخابی برای عصاره‌گیری است که در استخراج نوع مواد مؤثره و آثار ضدمیکروبی تأثیرگذار است. در هردو تحقیق، عصارهٔ اتانولی گیاه بالاترین اثر ضدقارچی را نشان داد (۱۵). دادارطلب و همکاران به بررسی اثر ضدباکتریایی عصارهٔ گیاه زولنگ بر سویه‌های بالینی *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش انتشار دیسک پرداختند که نتایج آنان نشان داد، عصارهٔ متانولی زولنگ در غلظت ۱/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اثر بازدارندگی مطلوبی بر این دو باکتری دارد که نشان‌دهندهٔ خاصیت ضدمیکروبی این گیاه است (۱۶). در این مطالعه نیز مشابه مطالعهٔ حاضر، یکی از باکتری‌های بررسی‌شده جزو باکتری های گرم مثبت است و مقایسهٔ نتایج نشان داد که در مطالعهٔ دادارطلب، اثر ضدباکتریایی عصارهٔ متانولی گیاه زولنگ بسیار بالاتر از عصارهٔ اتانولی این گیاه در مطالعهٔ حاضر است. نوشاد و همکاران در پژوهشی با عنوان «اسانس زولنگ: فنل و فلاونوئید کل، قدرت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدمیکروبی و برهم‌کنش آن با آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید در شرایط آزمایشگاهی»، اثر ضدمیکروبی عطرمایهٔ زولنگ را نشان دادند. به‌طورکلی، باکتری‌های *لیستریا اینوکوا* و *انتروباکتر ائروژنز* به‌ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌ها در این مطالعه نسبت به عطرمایه بودند (۱۷). در این مطالعه نیز مشابه تحقیق حاضر، اثر مهاری گیاه دارویی زولنگ بر باکتری‌های گرم مثبت مطالعه شد که به علت ساختار دیوارهٔ سلولی ضعیف‌تر آن‌ها نسبت به باکتری‌های گرم منفی، اثر مهاری بیشتر بود. مطالعهٔ مطلبی ریکنده و همکاران با هدف بررسی

عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ متانولی گیاه دارویی زولنگ در رویشگاه لاریم مازندران انجام گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی عصارهٔ متانولی در مهار رادیکال‌های آزاد با میزان IC50=۵/۱۷۷ در توجیه استفاده‌های رایج زولنگ به‌عنوان ضددرد و دفع سموم از کبد و کلیه قابل بحث است. منتول، تیمول، ۱ و ۸-سینئول، آلفا و گاما- تریپنن، پارا-سیمن، بتاپینن و میرسن مهم‌ترین مواد مؤثر ثانویه در گونه‌های مختلف زولنگ هستند که در درمان بیماری در شرایط آزمایشگاهی و زنده به اثبات رسیده‌اند (۱۸). محسنی و همکاران در تحقیق خود، تأثیر عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه زنیان و چای کوهی بر باکتری *Streptococcus iniae* عامل بیماری استرپتوکوکوزیس را با روش انتشار دیسک بررسی کردند. نتایج آنان نشان‌دهندهٔ اثر مناسب عصاره‌های یادشده روی باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* است (۱۹). مطالعهٔ حاضر نیز اثر مؤثر گیاه دارویی چای کوهی را بر جنس *استرپتوکوکوس*، مشابه تحقیق محسنی نشان می‌دهد. محمدپور و همکاران به بررسی آثار ضد لیستریایی عطرمایهٔ گیاه چای کوهی در پنیر سنتی اردبیل، با روش اضافه کردن عصارهٔ خشک‌شده به نمونهٔ شیر پیش‌ساز پنیر پرداختند که نتایج آنان نشان داد، با افزایش غلظت عطرمایه، کاهش رشد لگاریتمی باکتری‌ها نیز افزایش می‌یابد (۲۰)؛ همچنین سمنانی و همکاران فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی برخی گونه‌های گیاهی را با دو روش دیسک کاغذی و رقت‌های مکرر بررسی کردند که نتایج پژوهش آنان نشان داد که گیاهان آزمایش‌شده تا حدی آثار ضدمیکروبی داشتند؛ اما اثر ضدقارچ آن‌ها چندان خوب نبود. در عصارهٔ گیاه دارویی چای کوهی *Stachys lavandulifolia*، بالاترین فعالیت مهاری روی باکتری *استافیلوکوکوس سانگوئینیس* و کمترین اثر بر *استافیلوکوکوس اورئوس* دیده شد. این عملکرد مهار رشد بر میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس سانگوئینیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئورژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیا* در مقایسه با استاندارد آمیکاسین حدوداً ۰/۲۴، ۰/۲۶، ۰/۱۷، ۰/۲۶ و ۰/۲۴ درصد و در مقایسه با استاندارد جناتانولیایسین به‌ترتیب در حدود ۱/۵۵، ۳/۱۹، ۱/۹۹، ۱/۹۸، ۳/۹۲ درصد است (۲۱). مطالعهٔ حاضر نیز مشابه تحقیق سمنانی، اثر مهاری مثبت گیاه دارویی چای کوهی بر باکتری‌های پاتوژن دهانی *استافیلوکوکوس سانگوئینیس* و *استرپتوکوکوس موتانس* را نشان می‌دهد.

در این مطالعه نشان داده شد که دو گیاه چای کوهی و زولنگ که در طب سنتی استفاده خوراکی دارند، توانایی کاهش تشکیل بیوفیلم را دارند و از خاصیت آنتی‌باکتریال متوسطی برخوردارند و استفاده از آن‌ها می‌تواند هزینه‌ها را کاهش دهد و از سوی دیگر، به علت طبیعی بودن این محلول و نداشتن تأثیر منفی بر انسان و اطمینان مصرف‌کنندگان، استفاده از آن به‌راحتی قابل توصیه است. با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان به بررسی دقیق‌تر تأثیر ترکیبات عمدهٔ موجود در این دو گیاه پرداخت و با جداسازی ترکیباتشان، آن‌ها را در ساخت محصولاتی از قبیل دهان‌شویه‌ها و... استفاده کرد.

سپاس‌گزاری

پژوهش حاضر مستخرج از رسالهٔ دکترای دندان‌پزشکی با کد اخلاق IR.NKUMS.REC.1402.048 است و بدین وسیله از کارکنان آزمایشگاه مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در انجام این پژوهش،هیچگونه تعارض منافعی گزارش نشده است.

کد اخلاق

برای این پژوهش کد اخلاق به شماره IR.NKUMS.REC.1402.048 در دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی ثبت شده است.

حمایت مالی

این مطالعه با کمک مالی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

همه نویسندگان در نوشتن و تایید نهایی مقاله و جمع آوری دیتا و آنالیز آن مشارکت داشته اند.

References

1. Samaranayake L. Essential microbiology for dentistry-E-Book: Elsevier Health Sciences; 2018.
2. Van Chuyen N, Van Du V, Van Ba N, Long DD, Son HA. The prevalence of dental caries and associated factors among secondary school children in rural highland Vietnam. BMC Oral Health 2021;21:1-7. doi: 10.1186/s12903-021-01704-y.
3. Azmoudeh F, Aslanimehr M, Lourizadeh N. Effect of Glycyrrhiza glabra extract on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* (in vitro study). Stud Med Sci 2017;28:394-400. (Persian).
4. Răducanu AM, Didilescu AC, Feraru IV, Dumitrache MA, Hănţoiu TA, et al. Considerations on morphological abnormalities of permanent teeth in children with cleft lip and palate. Rom J Morphol Embryol 2015;56:453-7.
5. Ebrahim Netaj N, Rezaei Dastjerdi M, Ansari S, Amirian Chayjan K, Sepidarkish M, et al. Evaluation of Antifungal Effect of Alcoholic Extract of Achillea Millefolium and Trachyspermum ammi Against *Candida albicans* Isolated from Denture Stomatitis. Payavard Salamat 2022;16:278-85.
6. Ezati F, Bakhshi E, Ezati E, Salimi N. Investigate of Tooth Decay and Its Relationship with Knowledge, Attitude and Performance (KAP) in High School Students in Islamabad-e-Gharb City. J Arak Uni Med Sci 2022;25:450-63. doi: 10.32598/jams.25.3.6882.1.
7. Haydari M, Bardakci AG, Koldsland OC, Aass AM, Sandvik L, et al. Comparing the effect of 0.06%-, 0.12% and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial. BMC Oral Health 2017;17:1-8. doi: 10.1186/s12903-017-0400-7.
8. Raissy M, Khamesipour F, Rahimi E, Khodadoostan A. Occurrence of Vibrio spp., Aeromonas hydrophila, Escherichia coli and Campylobacter spp. in crayfish (Astacus leptodactylus) from Iran. IJFS 2014;13:944-54.
9. Shahidi F, Tabatabaei YF, Roshanak S, Alizadeh BB, Vasiee A, et al. Antimicrobial activity of Taraxacum pseudocalocephalum leaves extract on pathogenic microorganisms and comparison with common therapeutic antibiotics in vitro. Iran J Infect Dis Trop Med 2019; 23:37-46 (Persian).
10. Jassbi AR, Miri R, Asadollahi M, Javanmardi N, Firuzi O. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial effects of nine species of woundwort (Stachys) plants. Pharm Biol 2014;52:62-7. doi: 10.3109/13880209.2013.810650.
11. Háznagy-Radnai E, Balogh Á, Czigle S, Máthé I, Hohmann J, et al. Antiinflammatory activities of Hungarian Stachys species and their iridoids. Phytother Res 2012;26:505-9. doi: 10.1002/ptr.3582.
12. Shabani E, Mahmoudisourestani M, Mahen M. Evaluation of Four Extraction Methods on Antioxidant Compounds of Two Medicinal Vegetables, Froriepia subpinnata and Eryngium planum. Iran J Plant Physiol 2022;12:4223-30. doi:10.30495/ijpp.2022.1938898.1362.
13. Abrishami MR, Alesheikh P, Gharaei S, Norozi Khalili M, Saadat Khaje M, et al. Synergistic Effect of Methanolic Extracts of Rosmarinus Officinalis and Eugenia caryophyllata on Biofilm of Oral Pathogenic Bacteria. J North Khorasan Univ Med Sci 2020;12:1-9. doi: 10.29252/nkjms-12031.
14. Mohammadi A, Moghaddam PZ, Hashemi SA, Alesheikh P, Kasaian J. Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Latex and Extracts of Euphorbia monostyla. Curr Bioact Compd 2021; 17:74-8. doi: 10.2174/1573407216999201208204839.
15. Kremer D, Končić M, Kosalec I, Košir I, Potočnik T, et al. Phytochemical Traits and Biological Activity of Eryngium amethystinum and E. alpinum (Apiaceae). Hortic 2021;7: 364-80. doi: 10.3390/horticulturae7100364.
16. Dadartalab S, Houshmand Khomeiran E, Nikghadam P. Antibacterial Effect of Eryngium planum Extract on Clinical Isolates of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Vet Microbiol 2022; 18: 21-28.
17. Noshad M. Eryngium campestre essential oil: Total phenol and flavonoids contents, antioxidant power, antimicrobial activity and its interaction with nalidixic acid antibiotic in vitro. FSCT 2021; 18: 263-71. doi: 10.52547/fsct.18.118.263.
18. Motallebi R, mazandarani M, ebrahimzadeh M. autecology, ethnopharmacology, antioxidant activity of eryngium caucasicum trauve and floristic spectrum of medicinal plants in larim, mazandaran province. Eco-phytochem J Med plant 2014; 1: 44-57. (Persian)
19. Mohseni sisakht P, Nematollahi A, Abbasvali M, Kaboutari J. Study of the effect of aqueous and ethanolic extracts of Carum copticum and *Stachys lavandulifolia* plants in *Streptococcus iniae* cause of streptococcusis disease isolated from Rainbow trout fish farms. Iran J Vet Med 2020; 14. (Persian)
20. Mohammadpoor Kanzaq H, Noroozi M, Mahmoudi R, Mohammadpoorasl A, Zavoshi

R. Study of Anti-Listeria Effects of Stachys LavandulifoliaVachl Essential Oil in Ardabil Traditional Cheese. J Sabzevar Univ Med Sci 2015 22: 612-21. (Persian)

21. Morteza-Semnani K, Saeedi M, Mahdavi M, Rahimi F. Antimicrobial effects of methanolic extracts of some species of Stachys and Phlomis. J Mazandaran Univ Med Sci 2007; 17: 57-66 . (Persian).