

بررسی اثر عصاره الکلی گیاه رازک (*Humulus lupulus*) بر تعدادی باکتری‌های گرم منفی و باکتری‌های گرم مثبت

روحا کسری کرمانشاهی^{۱*}، بهرام نصر اصفهانی^۲، احمدعلی پوربابایی^۳، غلامرضا اصغری^۴،
ژاله اسمی سرکانی^۵

- ۱- استاد، گروه زیست‌شناسی (میکروبیولوژی)، دانشکده علوم، دانشگاه الزهراء، تهران
 - ۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان
 - ۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم
 - ۴- استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان
 - ۵- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم
- *آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی (میکروبیولوژی)
تلفن و نمابر: ۴- ۸۸۰۴۴۰۵۱ (۰۲۱) داخلی: ۲۷۰۹
پست الکترونیک: rkasra@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۶/۹/۱۷

تاریخ تصویب: ۸۷/۱۲/۱۴

چکیده

مقدمه: از جمله معضلات شایع در دنیای پزشکی، مسأله مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها بوده، بنابراین یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید با کم‌ترین اثرات جانبی امری لازم و ضروری می‌باشد. با توجه به وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال در گیاه رازک *Humulus lupulus* و استفاده‌هایی که از این گیاه در طب سنتی به عمل می‌آمد، به نظر می‌رسد که این گیاه دارای قابلیت ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای باشد.

هدف: هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضدباکتری عصاره الکلی گل این گیاه بر روی چهار سویه مرجع از استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC ۱۱۱۲)، اشریشیاکلی (PTCC ۱۲۷۶)، سودوموناس آئروژینوزا (PTCC ۱۴۳۰)، باسیلوس سوبتیلیس (PTCC ۱۰۲۳)، می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه به صورت *in vitro* طراحی شد و اتانل ۹۶ درجه به عنوان حلال در عصاره‌گیری پودر گیاه رازک استفاده شد. خاصیت ضدباکتری عصاره الکلی این گیاه ابتدا به روش چاهک پلیت در محیط مولر هیتون آگار بررسی شد و حداقل غلظت مهارکننده^۱ و حداقل غلظت کشنده^۲ با استفاده از درصد غلظت‌های مختلف عصاره تعیین شد. پایداری خاصیت ضدباکتری عصاره نیز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: غلظت‌های معینی از این عصاره دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی روی باکتری‌ها بودند. تاثیر عصاره‌ها با کم شدن غلظت آن‌ها کم می‌شود. عصاره رازک در تمامی غلظت‌ها به خصوص غلظت ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به طور معنی‌داری اثر مهاری روی رشد باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس) داشتند که در این میان غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر در مورد باکتری باسیلوس سوبتیلیس و غلظت ۶۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای هر دو اثر مهاری و کشندگی بود.

نتیجه‌گیری: علی‌رغم تاثیر برخی از غلظت‌های عصاره الکلی این گیاه بر باکتری‌ها، برای معرفی آن به عنوان جایگزین داروهای ضد میکروبی، به بررسی‌های وسیع‌تری نیاز است.

کل واژگان: عصاره الکلی، رازک، استافیلوکوکوس اورئوس، آنتی‌باکتریال

¹ MIC

² MBC



مقدمه

طی سالیان متمادی داروهای طبیعی به خصوص گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها وسیله درمان محسوب می شدند و در عین حال مواد اولیه موجود در آنها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می گرفت [۱]. اوایل قرن بیستم پیشرفت علم شیمی و کشف سیستم های پیچیده سنتز آلی منجر به توسعه صنعت داروسازی و جایگزینی داروهای صناعی به جای داروهای گیاهی شد. اما همزمان با پیشرفت در تولید داروهای شیمیایی جدید و آنتی بیوتیک های مختلف، به تدریج اثرات مضر این داروها ظاهر شدند و از دهه ۱۹۵۰ باکتری های بیماری زای متعدد به آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان دادند که این مقاومت هم چنان در حال گسترش است [۲،۳]. بنابراین بهره گیری از داروهای گیاهی برای دستیابی به ترکیبات جدید جهت غلبه بر مقاومت باکتری ها مورد بررسی قرار گرفت که یکی از این گیاهان تیره شاهدانه^۱ می باشد که در حال حاضر انجمن های گیاه شناسی معتبر جهان این تیره را با این نام می شناسند [۴]. تحقیق در مورد خواص دارویی و پزشکی عصاره الکلی گیاه رازک بین سال های ۱۹۱۶-۱۸۳۱ در فارماکوپه رسمی آمریکا به عنوان مسکن و آرام بخش منظور شده است [۴]. از سال ۱۵۰۰ میلادی کارخانه های آبیوسازی انگلیس دریافتند که رازک دارای خاصیت نگه داری خوبی است [۴].

رازک طی قرن ها به عنوان داروی مسکن و آرام بخش مصرف می شده است و مصرف آن را به عنوان مفتاح برای باز کردن انسداد مجاری کبد و طحال و تصفیه خون و برای درمان سیفلیس توصیه می کردند [۴،۵].

رازک دارای دو ماده شیمیایی ضد عفونت به نام های هومولون و لوپولون می باشد، این دو ماده باکتری های مولد فساد در مواد غذایی را از بین می برند [۴].

متاسفانه تحقیقات زیادی بر روی عصاره های آبی و الکلی گلبرگ گیاه هومولوس لوپولوس برای تعیین ترکیب موثر موجود در آن از نظر خواص ضد میکربی انجام نشده است البته

مشخص شده که در گیاه رازک اسانس و یک ماده تلخ و کولین و آسپارژین یافت می شود [۷]. در بدنه رزینی رازک آلفا رزین و بتا رزین یافت می شود که دارای مواد موثری به نام هومولون و لوپولون است [۴،۵،۷].

این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره الکلی اندام هوایی این گیاه بر روی تعدادی از باکتری های گرم منفی و گرم مثبت انجام شد.

مواد و روش ها

اندام هوایی دارای گل گیاه رازک از منطقه شمال ایران، مازندران، تهیه شد و توسط کارشناسان کشاورزی استان اصفهان تایید شد. گل ها به طور کامل در سایه خشک شدند. پس از جداسازی گلبرگ ها، آسیاب شده و عصاره گیری به روش ماسراسیون انجام شد [۸]. به ۱۰ گرم پودر گیاه، ۸۰ میلی لیتر اتانل اضافه و پس از ۴۸ ساعت خیساندن عصاره گیری انجام شد. این عصاره تا زمان استفاده در دمای یخچال نگه داری شد.

برای به دست آوردن وزن مخصوص عصاره ۵ میلی لیتر از عصاره به دست آمده را در یک پلیت خشک کرده و وزن عصاره خشک به دست آورده شد و درصد عصاره خشک محاسبه شد.

باکتری های مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC ۱۱۱۲)، باسیلوس سوبتیلیس (PTCC ۱۰۲۳)، سودوموناس آئروژینوزا (PTCC ۱۴۳۰)، اشیشیاکلی (PTCC ۱۲۷۶). که این سویه های استاندارد از گروه میکروبی شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان تهیه و مورد آزمایش قرار گرفتند. جهت بررسی اثر ضد میکروبی عصاره رازک از دو روش انتشار^۱ و رقت^۲ استفاده شد [۹]. از تمام سویه ها در آبگوشت تریپتیکاز سوی براث^۳ سوسپانسیون میکروبی تهیه شد که این سوسپانسیون به مدت ۱ شب در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت، سپس به محیط مایع

¹ Diffusion Method
³ Trypticase Soy Broth

² Dillution Method

¹ Canabinaceae



استفاده شد. هم‌چنین آزمون چند دامنه‌ای دانکن به منظور بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها به کار گرفته شد.

نتایج

با استفاده از روش چاهک پلیت و تاثیر عصاره الکلی رازک بر روی باکتری‌های مورد آزمایش مشخص شد که عصاره الکلی رازک بر روی باکتری‌های گرم مثبت اثر مهاری دارد.

همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، اثر عصاره الکلی رازک بر روی باسیلوس سوبتیلیس حداقل غلظت باکتریسیدال ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر با قطر هاله عدم رشد برای سویه استاندارد ۱۶/۳۲ میلی متر بوده است. با افزایش غلظت عصاره‌ها به ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر، قطر هاله‌های عدم رشد افزایش یافت.

همان‌طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود اثر عصاره الکلی رازک بر روی استافیلوکوکوس اورئوس حداقل غلظت باکتریسیدال ۶۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر با قطر هاله عدم رشد برای سویه استاندارد در غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، ۱۲/۶۰ میلی متر بوده است. با افزایش غلظت عصاره‌ها قطر هاله‌های عدم رشد افزایش یافت. MIC به دست آمده برابر ۶۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، پایداری اثر ضد میکروبی عصاره الکلی رازک در زمان‌های مختلف پس از استخراج بررسی شد. در این بررسی مشخص شد که اثر عصاره به مرور زمان کاهش می‌یابد. MIC به دست آمده همان‌طور که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود، برای باسیلوس سوبتیلیس با روش رقت لوله‌ای^۱ برای سویه استاندارد برابر ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان دارای اثرات ضد میکروبی با مکانیسم‌های مختلف و حتی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها رشد باکتری را مهار می‌کنند و

جدید (TSB) وارد شده و سپس با قرار دادن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کدورت آن معادل ۰/۵ مک فارلند رسانده شد. بعد از تهیه مایه میکروبی یک سوآپ استریل را در لوله حاوی مایه میکروبی فرو کرده پس از آلوده شدن آن سوآپ آغشته به مایه میکروبی را به طور چمنی در سه جهت روی پلیت حاوی مولر هیتون آگار گشت داده و سپس به وسیله قسمت انتهایی یک پی پت پاستور استریل چاهک‌های یکسانی به قطر ۶ میلی متر روی محیط مولر هیتون آگار موجود در پلیت ایجاد شد. از غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره الکلی گیاه، به میزان ۰/۱ میلی لیتر در چاهک‌ها وارد شد، در یک چاهک به عنوان شاهد از ۰/۱ میلی لیتر اتانل استفاده شد. پس از قرار دادن به مدت یک ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد به منظور انتشار عصاره در محیط قبل از رشد و تکثیر باکتری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شد، سپس قطر هاله‌های عدم رشد به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. جهت انجام آزمایش‌های کمی برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده و حداقل غلظت کشنده، از عصاره گیاهی با غلظت ۱۰۰۰ میلی لیتر استفاده شد [۱۰] که از این مقدار در لوله‌های حاوی میزان معین و مساوی آبگوشت TSB، عمل رقیق‌سازی انجام گرفت. به کلیه لوله‌ها ۰/۱ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی استاندارد شده اضافه و تمام لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند سپس نتایج بررسی شد. اولین لوله‌ای که در آن عدم رشد مشاهده شد به عنوان MIC تعیین شد و تمام لوله‌های بدون کدورت نیز روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شدند و MBC عصاره برای باکتری‌ها مشخص شد [۱۰]. به عنوان مقایسه MIC و MBC پنی‌سیلین G برای دو باکتری گرم مثبت مورد نظر با روش رقت لوله‌ای انجام شد [۱۰].

جهت مشاهده پایداری اثر ضد میکروبی عصاره الکلی رازک، اثر ضد میکروبی آن در زمان‌های ۱ هفته، ۲ هفته، ۱ ماه، پس از استخراج بررسی شد.

جهت محاسبات آماری میزان انحراف معیار از رابطه انحراف معیار $\pm$ میانگین به دست آمد و جهت بررسی وجود اختلافات معنی‌دار در نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس

¹ Tube-dillution



جدول شماره ۱- میانگین قطر هاله‌های عدم رشد (میلی‌متر) در باکتری باسیلوس سوبتیلیس با غلظت‌های مختلف (میلی گرم بر میلی‌لیتر) عصاره الکلی رازک در زمان‌های گوناگون (برحسب روز).

نام باکتری	باسیلوس سوبتیلیس (PTCC ۱۰۲۳)			
	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
غلظت‌ها				
۱	۱۵/۳ ± ۰/۵۱	۱۴/۴۸ ± ۰/۵	۱۹/۹ ± ۰/۴	۲۲/۵۲ ± ۰/۷
۷	۱۵/۳۵ ± ۰/۵۴	۱۸/۸۱ ± ۰/۸۳	۲۰/۴۳ ± ۰/۴	۲۱/۰۵ ± ۰/۴۴
۱۴	۱۳/۹ ± ۰/۶۳	۱۵/۶۹ ± ۰/۴۳	۱۷/۷ ± ۰/۸	۲۰ ± ۰/۴
۳۰	۶	۱۴/۱ ± ۰/۷	۱۶/۰۵ ± ۰/۷۲	۱۷/۱۹ ± ۰/۶

*نتایج به صورت (X±SD) گزارش شده است. قطر (۶) برابر قطر چاهک است.

جدول شماره ۲- میانگین قطر هاله‌های عدم رشد (میلی‌متر) در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با غلظت‌های مختلف (میلی گرم بر میلی‌لیتر) عصاره الکلی رازک در زمان‌های گوناگون (برحسب روز).

نام باکتری	استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC ۱۱۱۲)			
	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
غلظت‌ها				
۱	۱۲/۴ ± ۰/۵۶	۱۴/۴۸ ± ۰/۴۷	۱۷/۵۲ ± ۰/۴۱	۲۰/۱۲ ± ۰/۳۹
۷	۱۱/۵ ± ۰/۴۳	۱۳/۹ ± ۰/۷۱	۱۷/۰۵ ± ۰/۶۲	۱۹/۲۵ ± ۰/۷۴
۱۴	۱۰/۳۳ ± ۰/۶۳	۱۰/۵۷ ± ۰/۵	۱۳/۳۲ ± ۰/۴	۱۵/۵۱ ± ۰/۷
۳۰	۶	۶	۱۰/۴ ± ۰/۶	۱۳/۴ ± ۰/۴۳

*نتایج به صورت (X±SD) گزارش شده است. قطر (۶) برابر قطر چاهک است.

جدول شماره ۳- نتایج MIC و MBC عصاره الکلی رازک بر روی باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش

نام باکتری	غلظت (mg/ml)	
	MBC	MIC
استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC ۱۱۱۲)	۶۲/۵	۶۲/۵
باسیلوس سوبتیلیس (PTCC ۱۰۲۳)	۱۲۵	۱۲۵
پنی سیلین G	۳/۹	۳/۹

گیاهان خانواده شاهدانه به سبب وجود ترکیبات گوناگون، اسانس، رزین از لحاظ اثرات ضدمیکروبی بسیار مورد توجه می‌باشند [۴].
نتایج حاصل از بررسی عصاره الکلی این گیاه حاکی از

این امر لزوم تحقیقات جامع‌تر در حیطه گیاهان دارویی را گوشزد می‌نماید. این مسأله افزایش روزافزون مقالات انتشار یافته در زمینه خصوصیات ضدمیکروبی گیاهان را توجیه می‌کند [۶].



در تحقیق هوس و همکاران در سال ۲۰۰۳ در ارتباط با اثر عصاره رازک بر استرپتوکوکوس موتانس و سایر استرپتوکوک‌های دهانی، عصاره رازک با غلظت ۲ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با روش MIC از رشد میکروارگانیسم‌های ذکر شده جلوگیری کرد [۱۵].

در تحقیق انجام شده توسط بهاتاچاریا^۱ و همکاران اثر عصاره رازک با اثر ضد میکروبی بالا بر روی میکروارگانیسم‌های پلاک دندانی گزارش شد و اثر عصاره مذکور به روش انتشار^۲ و کدرت سنجی^۳ و حداقل غلظت مهار کننده مورد بررسی قرار گرفت [۱۶].

در تحقیق اُهسوگی^۴ و همکاران در سال ۱۹۹۶ اثر مهاری عصاره گیاه رازک بر روی هلیکوباکتریلوری بررسی شد. مطابق این تحقیق میکروارگانیسم مذکور با غلظت کمی از بتا اسیدهای موجود در عصاره رازک حدود ۱ ppm مهار شد [۱۷].

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان نمود که عصاره گیاه رازک در شرایط invitro دارای قابلیت ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای بر روی سویه‌های گرم مثبت مورد مطالعه می‌باشد و در ادامه لازم است بررسی‌های وسیع‌تر و دامنه‌داری در شرایط invivo انجام شود تا غلظت موثر این عصاره بر باکتری‌های موردنظر و سویه‌های بالینی، اثرات جانبی آن در این غلظت و نیز فرمولاسیون دقیق آن، مورد ارزیابی قرار گیرد و در نهایت بتوان این عصاره را به عنوان یک داروی ضد میکروبی به دنیای پزشکی و میکروبیولوژی معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر جوانمردی، مدیریت محترم آزمایشگاه میکروبی‌شناسی بیمارستان حضرت سیدالشهدا (ع) اصفهان، و سرکار خانم عظیمی کارشناس آزمایشگاه میکروبی‌شناسی تشکر و قدردانی می‌شود.

این است که عصاره الکلی گیاه مذکور روی سودوموناس آئروژینوزا و اشیشیاکلی اثر قابل ملاحظه‌ای ندارد در عین حال اثر این عصاره بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس قابل ملاحظه می‌باشد.

جهت تایید نتایج حاصل از روش چاهک پلیت، تعیین MIC از روش رقت لوله‌ای استفاده شد و مشخص شد عصاره الکلی رازک با حداقل غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی باسیلوس سوبتیلیس و با حداقل غلظت ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی استافیلوکوکوس اورئوس، موثر است. که این اثر علاوه بر این که می‌تواند مربوط به ترکیبات هومولون و لوپولون باشد می‌توان آن را مربوط به ترکیبات رزینی موجود در عصاره این گیاه نیز دانست.

مقایسه هاله‌های عدم رشد در غلظت‌های مختلف پنی‌سیلین G با عصاره گیاه رازک به وضوح نشان می‌دهد که اثر این گیاه به صورت عصاره تام مخلوطی از مواد است کم‌تر از پنی‌سیلین G است و اگر ترکیب با اثر ضد میکروبی موجود در این عصاره جداسازی و خالص شود اثر قابل مقایسه تری با پنی‌سیلین G خواهد داشت.

در تحقیق انجام شده توسط میلیس^۱ و همکاران در سال ۱۹۹۲ تاثیر عصاره رازک بر روی لیستریا مونوسیتوزنز بیانگر آن است که مقدار ۶ تا ۵۰ ppm از بتا اسید موجود در عصاره رازک در غذاها می‌تواند رشد این باکتری را متوقف نماید [۱۲].

در پژوهش انجام شده توسط جانسون و هوس^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۱، رشد کلستریدیوم دیفیسل، کلستریدیوم بوتولینوم و هلیکوباکتریلوری بر اثر مجاورت با ۱ ppm یا بیشتر از بتا اسیدهای موجود در عصاره رازک، متوقف شد [۱۳].

در تحقیق سیمپسون^۳ و همکاران در سال ۱۹۹۲، فعالیت فاکتورهای ضدباکتریایی موجود در عصاره رازک مورد بررسی قرار گرفت که در بین آن‌ها بتا اسیدها دارای اثرات بالای ضدباکتریایی بودند [۱۴].

¹ Bhattacharya
³ Fluid turbidity

² Disc diffusion
⁴ Ohsugi

¹ Millis
³ Simpson

² Johnson & Haas

1. Velag J. Stodo L. Medical Plants. Ghoghnoos. Tehran. 1370, pp: 143 -4.
2. Mir haidar H. Plants culture. Jahad Daneshgahi. Tehran. Vol 5. 1372, pp: 280 - 6.
3. Zargari A. Medical plants. Jahad Daneshgahi. Tehran. 1366, pp: 262 - 75.
4. Rezaie M. Study of *Humulus lupulus* components. *Investigation of medical and fragrant Plants* 1378; Vol 3: 1 - 13.
5. Ghasemi Dehkordi NL. Pharmacope of IRAN Plants. 1381, pp: 64 - 5.
6. Kamal F. Control of medical produce in microbial method and measure of Antibiotics in diffusion method. Tehran University. 1362, pp: 24 - 34.
7. Ceechini T. Encyclopedie des Plantes Medicinalis. Paris, 1979, pp: 125 - 30.
8. Neu HC. The crisis of antibiotic resistance. *Sci.* 1992; 257: 1061 - 9.
9. Eloff Jn. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial component from Plants. *J. of Ethnopharmacol.* 1998; 60 (1): 1 - 8.
10. Volk WA. Essentials of medical microbiology, J. B. Lippincott company, New york, second edition. 1982, 155 - 6.
11. Boncanchand DH. etal. Elimination by Ethidium Bromide of Antibiotic Resistance in Entrobacteriaceae and Staphylococi. *J. of Gen Microbiol.* 1969; 417 - 25.
12. Millis JR. (Kohler, WI), Schendel; Marky. Inhibition of food pathogens by hope acids, *US patent* 1992; 12 (3): 23 - 5.
13. Johnson Erica A, Haas Gerhard J, Antimicrobial activity of hopes extract against *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficle* and *Helicobacter pylori*. *J. of Applied Bacteriol.* 2001; 265 - 71.
14. Simpson et al. Factors affecting antibacterial activity of hope compounds. *J. of Applied Bacteriol.* 1992; 327 - 34.
15. Haas Gerhard J, Bhattacharya S, Virani S, Zavro M. Inhibition of *Streptococcus mutans* and other oral streptococci by Hope (*Humulus lupulus*) constituents. *J. of Economic botany* 2003; vol 57: 118 - 25.
16. Bhattacharya S, Virani S. In vitro Antimicrobial Activity of Hops Extract. *J. of the American Botanical Council April* 2005; 123 - 30.
17. Ohsugi et al. Antibacterial activity of *Humulus Lupulus* against *Helicobacter pylori*. *J. of Traditional Medicins* 1996; 13 (4): 344 - 5.

