

DOI: 10.30495/jvcp.2020.1883526.1247

"مقاله پژوهشی"

## بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره میوه گیاهان کاپاریس اسپینوزا (*Capparis spinosa*) و پسته وحشی (*Pistacia atlantica*) بر رشد باکتری اشریشیاکولای در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی

محمد سجاد انصاری چهارسوقی<sup>۱</sup>، آسیه احمدی دستگردی<sup>۲\*</sup>، مجید غلامی آهنگران<sup>۳</sup>

۱- دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران.

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

\* نویسنده مسئول مکاتبات: as.ahmadi17@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۸/۹/۴ پذیرش نهایی: ۹۹/۵/۲۹)

### چکیده

اشریشیاکولای عامل بسیاری از عفونت‌های مربوط به زخم‌های جراحی می‌باشد. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی گیاهان کاپاریس اسپینوزا (*Capparis spinosa*) و پسته وحشی (*Pistacia atlantica*) در شرایط آزمایشگاهی و در درمان زخم عفونی ناشی از اشریشیاکولای در مدل حیوانی انجام گرفت. ابتدا با استفاده از روش رقیق‌سازی در لوله، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (minimum inhibitory concentration; MIC) و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های مذکور (minimum bactericidal concentration; MBC) تعیین گردید. سپس تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار انتخاب و پس از تراشیدن موضع جراحی، در ناحیه پشت و بین دو کتف، برشی ایجاد و باکتری اشریشیاکولای با غلظت  $10^8 \times 1/5$  cfu/ml در محل زخم تلقیح گردید. سپس سطح زخم با عصاره گیاهان کاپاریس اسپینوزا و پسته وحشی آغشته گردید. در روزهای پنجم و دهم، از محل زخم نمونه برداری شد و میزان آلودگی باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره گیاهان کاپاریس اسپینوزا و پسته وحشی، اثرات ضد میکروبی علیه اشریشیاکولای دارند. میزان MIC و MBC عصاره کاپاریس اسپینوزا و قطر هاله عدم رشد آن نیز بیشتر از عصاره پسته وحشی بود. همچنین نتایج حاصله تفاوت معنی‌داری را در موش‌های تیمار شده با عصاره کاپاریس اسپینوزا و پسته وحشی در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ( $p < 0.05$ ). می‌توان نتیجه گرفت که عصاره حاصل از این گیاهان باعث مهار رشد باکتری اشریشیاکولای در زخم‌های عفونی شده و از این طریق می‌توانند منجر به تسریع روند التیام زخم گردند.

کلیدواژه‌ها: اشریشیاکولای، زخم عفونی، عصاره، کاپاریس اسپینوزا، پسته وحشی.

## مقدمه

امروزه استفاده از ترکیبات گیاهی مانند عصاره‌ها برای درمان بیماری‌ها و عفونت‌ها مورد توجه محققین قرار گرفته است. گیاه درمانی یکی از قدیمی‌ترین شیوه‌های درمانی است که انسان آن را گسترش داده است. استفاده از عصاره گیاهان دارویی به‌عنوان درمان‌های جایگزین سالم و موثر در درمان سوختگی‌ها و عفونت‌ها در نظر گرفته می‌شوند. تاثیر زیاد، عوارض جانبی ناچیز و قیمت نسبتاً پایین آن‌ها باعث علاقه و توجه روزافزون به درمان با گیاهان دارویی شده است. داروهای گیاهی یا عصاره آن‌ها حتی در مواقعی که مکانیسم عملشان نامشخص بوده از دیرباز به‌طور گسترده کاربرد داشته‌اند. بنابراین، مطالعه روی عصاره‌های گیاهی برای پی بردن به مکانیسم عمل، کارایی و سالم بودن آن‌ها می‌تواند بسیار مفید واقع گردد (Kummar et al., 2007).

کشور ایران به دلیل داشتن شرایط اقلیمی خاص یکی از غنی‌ترین منابع برای گیاهان دارویی به شمار می‌رود. گیاه کبر با نام علمی کاپاریس اسپینوزا از راسته میخک‌سانان و از خانواده کاپاریداسه، بوته‌ای طول‌العمر و خزانده با شاخه‌هایی منشعب و کرک‌دار به طول ۱ تا ۱/۵ متر است که در اعماق خاک نفوذ می‌کند. این گیاه با نام‌های کبرو، داغ قارپوزی، خیاروک، لگجی، لیجین، لیجون و درخت آصف نیز شناخته می‌شود. تمامی قسمت‌های گیاه مانند میوه، برگ، پوست، ریشه، غنچه و ساقه مورد استفاده قرار می‌گیرد. ضماد خشک آن برای خشک کردن جراحت‌های بدخیم مفید بوده و دردهای مفاصل، سیاتیک، نقرص و درد لگن را هم تسکین می‌دهد. گیاه کبر محتوی کربوهیدرات، فیبر،

چربی، پروتئین، ویتامین‌های C، A، K و E، نیاسین، ریبوفلاوین، آهن، سدیم و پتاسیم می‌باشد. همچنین این گیاه سرشار از ترکیبات فلاونوئیدی مانند روتین و کوئرستین است که هر دوی این ترکیبات خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند (Emad et al., 2012).

پسته وحشی یا بنه (*Pistacia atlantica*)، یکی از گیاهان خودرو متعلق به خانواده آناکاردیاسه است که در اکثر مناطق کوهستانی ایران به‌خصوص کوه دنا به وفور یافت می‌شود. این گیاه دارای خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی است و به دلیل حضور میزان زیاد اسیدچرب غیراشباع در میوه آن، محققان مصرف آن را در کاهش بیماری‌های قلبی عروقی توصیه کرده‌اند (Benhammou et al., 2008).

اثرات ضد میکروبی گیاهان کاپاریس اسپینوزا و پسته وحشی در تحقیقات بسیاری بررسی شده است (Magiatis et al., 1999; Moraghebi et al., 2000; Ben Douissa et al., 2005; Benhammou et al., 2008; Gourine et al., 2010; Hanafi et al., 2012). همچنین نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که پسته وحشی بر روی باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا انترتیدیس، باسیلوس سرئوس، اشیریشیاکولای، هلیکوباکتر پیلوری، کپک و مخمر (کاندیدا آلبیکانس، آسپرژیلوس فلاووس، رازیوپوس استولونیفر و فوزاریوم) اثر کشندگی دارد (Benhammou et al., 2008; Hanafi et al., 2012). مرتضوی و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان کردند عصاره اتانولی پوسته و مغز هسته میوه پسته وحشی دارای اثرات ضد میکروبی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیاکولای می‌باشد و بیشترین تاثیر در جلوگیری از

موش‌های صحرایی دیابتی و غیر دیابتی موثر بوده است (Ahmadi and Gasemi, 2015). همچنین طبق بررسی‌های انجام شده، عصاره گیاه آلئه‌ورا در ترمیم زخم‌های سوختگی بهتر از سیلورسولفادیازین عمل می‌کند و سرعت بهبودی با آن نیز بیشتر می‌باشد (Akhoondinasab et al., 2014). یادگار و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثرات التیامی گیاه کامیفورا میرا را در ترمیم سوختگی تجربی پوست بررسی کرده و اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی این گیاه را تایید و بیان کردند که صمغ گیاه مذکور در مقایسه با سیلورسولفادیازین که امروزه به طور گسترده در بیماران مورد مصرف قرار می‌گیرد، دارای اثرات التیام‌بخش بهتری بر زخم‌های حاصله از سوختگی می‌باشد (Yadeghar et al., 2013). عصاره گیاه گلدر هم در ترمیم زخم‌های سوختگی موثر است و تاثیر مثبتی در تکثیر سلولی و ترمیم بافت پوششی دارد (Ganjali et al., 2013). نقش عصاره گیاه آب‌قاشقی (*Centella asiatica*) در التیام زخم‌های معمولی و سوختگی توسط محققین گزارش شده و مشخص گردیده است که عصاره گیاه مذکور، روند بهبود زخم را هم در مورد زخم برش و هم در مورد زخم سوختگی تسهیل می‌کند (Sombonwong et al., 2012). تحقیقاتی هم بیانگر اثرات ضد میکروبی ترکیبات موجود در اولئورزین پسته وحشی و تاثیر آن در زخم معده می‌باشد (Tohidi et al., 2011; Sharifi et al., 2012). از آنجایی که تأیید اثر التیامی عصاره گیاهان کاپاریس/سپینوزا و پسته وحشی می‌تواند مصرف این فرآوردها را برای درمان زخم‌های عفونی قابل توجه سازد و تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر تاثیر این گیاهان بر

رشد باکتری‌ها مربوط به عصاره پوسته علیه باکتری *اشریشیاکولای* است (Mortazavi et al., 2013). عفونت زخم یکی از معمول‌ترین مشکلات بیماران متعاقب جراحی می‌باشد که به‌طور مشخص می‌تواند زمان بستری شدن بیمار و هزینه‌های ناشی از آن را افزایش دهد. اگرچه از بین بردن این نوع از عفونت زخم غیر ممکن است، اما تلاش برای کاهش میزان آن می‌تواند کمک شایانی به بهبود وضعیت بیماران و در نتیجه پایین آمدن هزینه‌های درمانی نماید. *اشریشیاکولای* بعد از *استافیلوکوکوس اورئوس* معمول‌ترین عامل ایجادکننده زخم‌های عفونی متعاقب جراحی می‌باشد (Schito, 2006; Bowersox, 2007). با توجه به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و هشدار سازمان‌های جهانی مبنی بر کاهش یا عدم استفاده از آنها، مطالعه بر روی گیاهان دارویی و استفاده بالینی از ترکیبات طبیعی مذکور مورد توجه قرار گرفته است (Schito, 2006; Das et al., 2010). تحقیقات زیادی در مورد تاثیر گیاهان دارویی بر ترمیم زخم‌ها صورت گرفته است. ولیلو و ولیلو در سال ۲۰۱۷ پیشنهاد کردند که در درمان زخم‌های سوختگی عفونی می‌توان از عسل و مخلوط عصاره آبی دارچین و عسل نیز استفاده کرد. مشاهدات هیستوپاتولوژیکی از لحاظ ترمیم محل زخم و همچنین اندازه‌گیری قطر زخم نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیمار و شاهد وجود دارد (Valilou and Valilou, 2017). اسانس گیاهان آویشن، اسپند و چویل نیز بر عفونت‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* اثر بازدارندگی دارند (Ghashghae et al., 2016). همچنین استفاده از عصاره گیاه دارچین به صورت موضعی و تزریقی در ترمیم زخم‌های پوستی

- **آزمون‌های میکروبی:** جهت بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره گیاهان کاپاریس اسپینوزا و پسته وحشی علیه باکتری *اشریشیاکولای*، ضمن انجام آزمایش سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار دیسک در آگار، MIC (حداقل غلظت بازدارندگی) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) عصاره‌های مذکور هم تعیین شد (Mortazavi et al., 2013). بدین منظور باکتری *اشریشیاکولای* (ATCC 10536) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه گردید و برای فعال کردن آن، طبق دستورالعمل، باکتری لیوفیلیزه شده در شرایط استریل رقیق‌سازی شد و در ادامه در محیط بلاد آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد تا کلنی‌های خالص باکتری تشکیل شود.

- **تهیه سوسپانسیون باکتریایی استاندارد:** جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، چند کلنی مجزای مربوط به باکتری *اشریشیاکولای* از سطح محیط کشت بلاد آگار برداشته شد و به یک لوله حاوی نوترینت برات (مرک، آلمان) منتقل گردید. در ادامه سوسپانسیون میکروبی که کدورت آن معادل کدورت لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند ( $1/5 \times 10^8$  cfu/ml) بود، تهیه شد (Mortazavi et al., 2013).

- **بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مورد آزمایش:** با استفاده از روش رقت لوله‌ای، حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره هیدروالکلی گیاهان مورد آزمایش تعیین شد. برای تعیین MIC از ۱۱ لوله آزمایش استفاده شد به طوری که در ۹ لوله اول با استفاده از ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره خالص و محیط کشت نوترینت برات (مرک، آلمان)، رقت‌های سریال مختلف هر

زخم‌های عفونی ارائه نشده، لذا هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره گیاهان کاپاریس اسپینوزا و پسته وحشی در شرایط آزمایشگاهی و نیز بالینی در مورد زخم جلدی عفونی شده توسط *اشریشیاکولای* در مدل حیوانی بود.

### مواد و روش‌ها

- **جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاهان مورد استفاده:** مطالعه حاضر در سال ۱۳۹۶ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار انجام شد. گیاه کاپاریس اسپینوزا از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و رامین و گیاه پسته وحشی از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی مشهد خریداری و در هر بار یوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج شناسایی شد. بخش میوه گیاهان مذکور جدا شده و بعد از خشک شدن در سایه، توسط آسیاب (Mulinex, AR 110010, Spain) پودر شده و در فریزر (-۴ درجه سلسیوس) نگهداری شدند.

- **استخراج عصاره گیاهان مورد آزمایش:** برای استخراج عصاره هیدروالکلی پودر خشک شده میوه گیاهان مورد آزمایش، از روش خیساندن استفاده شد. بدین منظور ۶۰۰ گرم از پودر میوه هر یک از گیاهان مورد آزمایش با اتانول ۷۰ درجه مخلوط گردیده و در ادامه به مدت ۲۴ ساعت با استفاده از شیکر (KS500, Japan) هم‌زده می‌شد و سپس به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (واتمن، انگلستان) فیلتر می‌گردید. در نهایت عصاره به دست آمده با استفاده از دستگاه روتاری (هیدولف، آلمان) در شرایط خلأ تغلیظ گردیده و تا زمان انجام آزمایش در یخچال (۴ درجه سلسیوس) نگهداری می‌شد (Mortazavi et al., 2013).

- **سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری مورد آزمایش به روش انتشار دیسک در آگار:** بدین منظور از محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) استفاده گردید. در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک فارلند ( $1/5 \times 10^8$  cfu/ml) روی محیط کشت به صورت کاملاً یکنواخت به صورت خطی کشت داده شد و دیسک‌های تهیه‌شده از عصاره‌ها با غلظت‌های مختلف (۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر روی محیط قرار داده شد (Gholami-Ahangaran *et al.*, 2015) و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس قطر مناطق عدم رشد در اطراف دیسک‌ها با استفاده از کولیس تاف (مدل E141-122، فرانسه اندازه‌گیری شد. برای افزایش اعتبار داده‌ها هر تست آنتی‌بیوگرام در ۵ محیط کشت انجام شد و سپس میانگین قطر هاله عدم رشد برای هر غلظت عصاره گزارش شد (Mortazavi *et al.*, 2013). از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (مرک، آلمان) به عنوان شاهد (استاندارد و مقایسه داده‌ها با جنتامایسین) استفاده شد.

- **ایجاد زخم عفونی در مدل حیوانی:** در این مطالعه از ۳۰ سر موش صحرایی نر سفید سالم و بالغ از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. موش‌ها از بخش تکثیر و نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه و در قفس‌های مخصوص نگه‌داری شدند. به منظور پرهیز از استرس و سازگار شدن حیوانات با محیط، هیچ‌گونه آزمایشی به مدت یک هفته روی موش‌ها صورت نگرفت و تمامی حیوانات تحت شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان (از نظر دما، رطوبت، نور، نوع جیره غذایی و تعداد دفعات

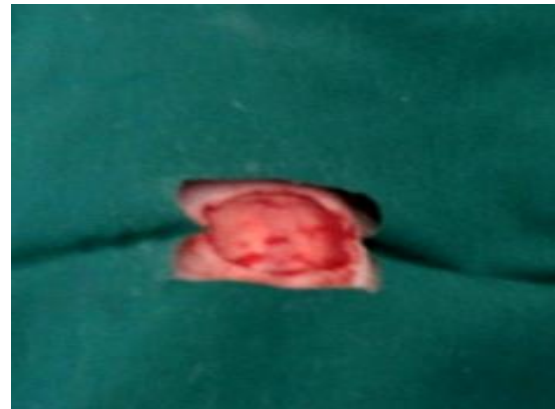
عصاره یعنی رقت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در لوله اول تا ۰/۳۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در لوله نهم تهیه شد و در یک لوله هم به عنوان کنترل مثبت عصاره رقیق شده (رقت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در لوله اول تا ۰/۳۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در لوله نهم) به علاوه محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان) ریخته شد و یک لوله نیز به عنوان کنترل منفی فقط حاوی سوسپانسیون میکروبی به علاوه محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان) بود. در ادامه به تمام لوله‌ها به جز لوله شماره ۱۰ (کنترل مثبت)، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده در مرحله قبل برای *اشریشیا کولای*، انتقال داده شد. همه لوله‌های آزمایش برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی گردیدند و کمترین غلظتی از هر عصاره گیاهی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد (عدم رشد باکتری تلقیح‌شده) به عنوان MIC عصاره مذکور در نظر گرفته شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها (MBC)، از همه لوله‌هایی که در آنها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود، نمونه برداری و به روش سطحی کشت داده شد. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات لوله‌هایی که عدم رشد باکتری را نشان می‌دادند بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) پخش شد. بعد از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، پلیت‌های کشت داده شده از نظر وجود رشد میکروبی کنترل شد. لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوطه عدم رشد باکتری مشاهده گردید، به عنوان MBC عصاره در نظر گرفته شد (Benhammou *et al.*, 2008; Mortazavi *et al.*, 2013).

دریافت‌کننده عصاره و یک گروه شاهد بدون درمان)، با استفاده از سوآپ استریل از محل زخم نمونه‌برداری شده و بر روی محیط کشت مک‌کانکی آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. یک روز پس از تایید اولیه عفونی‌شدن زخم با جداسازی باکتری از محل زخم، عصاره‌های مورد نظر هر ۱۲ ساعت و به مدت ۲۱ روز به میزان ۰/۳ میلی‌لیتر بر روی زخم مالیده شد (شکل ۳). گروه سوم موش‌ها نیز به عنوان گروه شاهد بدون استفاده از عصاره‌های مورد آزمایش در محل زخم آن‌ها در نظر گرفته شد ( Kaboutari et al., 2016).

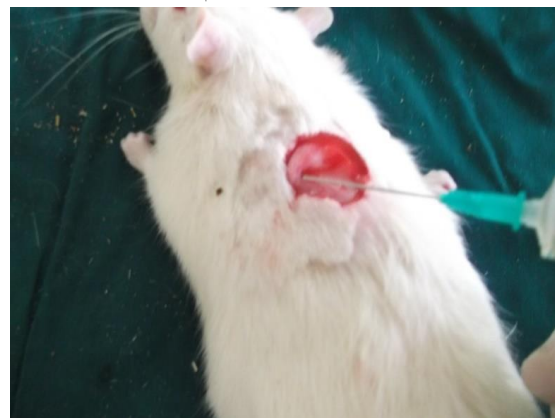


شکل ۳- درمان زخم با عصاره‌های مورد مطالعه

تغذیه) نگهداری شدند. موش‌ها توسط اتر (Sigma Aldrich, USA) در دستگاه دسیکاتور بیهوش و پس از تراشیدن موضع جراحی در ناحیه پشت و بین دو کتف، برشی دایره‌وار به قطر ۱/۵ سانتی‌متر ایجاد شد و پوست ناحیه مذکور در شرایط استریل همراه با بافت همبند زیرین آن تا رسیدن به عضله به‌طور کامل جدا شد (شکل ۱). سپس در محل زخم ایجاد شده در مورد تمامی موش‌ها، ۵-۶ قطره از سوسپانسیون میکروبی استاندارد باکتری /شریشیاکولای مورد آزمایش (با غلظت  $1/5 \times 10^8$  cfu/ml) تلقیح گردید (شکل ۲). سپس حیوانات به صورت تصادفی به سه گروه ۱۰ تایی و دو زیر گروه زمانی ۵ و ۱۰ روزگی (۵ تایی) تقسیم شدند. در ادامه در سه گروه درمانی (دو گروه



شکل ۱- ایجاد زخم



شکل ۲- عفونی نمودن زخم

پلیت، در رقت مربوطه آن ضرب و به صورت تعداد واحد تشکیل‌دهنده کلنی به ازای هر گرم نمونه استحصال شده از عمق زخم (cfu/gr) گزارش شد (Feng et al., 2002).

- تحلیل آماری داده‌ها: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی تفاوت آماری در بین گروه‌ها از برنامه نرم‌افزاری SPSS و روش آنالیز واریانس یکطرفه داده‌ها (One way ANOVA) استفاده شد و در صورت وجود اختلاف آماری از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. همچنین سطح اطمینان  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

- نتایج مربوط به بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مورد آزمایش: مناطق عدم رشد حاصله در آزمایش آنتی‌بیوگرام (جدول ۱) مشخص کرد که عصاره گیاه کاپاریس/اسپینوزا نسبت به پسته وحشی اثرات ضد میکروبی کمتری داشته و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ). همچنین قطر منطقه عدم رشد مربوط به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین از هر دو عصاره بیشتر بود ( $p < 0/05$ ).

نتایج مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره گیاهان کاپاریس/اسپینوزا و پسته وحشی در جدول ۱ ارائه شده است. این نتایج نیز مشابه نتایج آزمایش آنتی‌بیوگرام در مورد اشیریشیاکولای بود. یعنی تاثیر عصاره پسته وحشی نسبت به عصاره کاپاریس/اسپینوزا کمتر بود.

- تهیه سوآپ و شمارش باکتری‌های موجود در محل زخم حیوانات مورد آزمایش: بدین منظور در روزهای ۵ و ۱۰ پس از تلقیح باکتری مورد آزمایش، از محل زخم‌ها سوآپ تهیه شد. جهت بررسی چگونگی تأثیر عصاره گیاهان کاپاریس/اسپینوزا و پسته وحشی بر مهار رشد باکتری اشیریشیاکولای در مدل حیوانی، ابتدا برای جلوگیری از زجر و درد حیوان در ناحیه زخم، با انجام بی‌حسی موضعی با اسپری لیدوکائین ۱۰ درصد، از عمق زخم در محیط برین هارت اینفیوژن آگار (BHI) (شرکت مرک، آلمان) و سپس با رقت‌سازی در پلیت‌های حاوی محیط کشت تری کلرواستیک اسید (TCA) (شرکت مرک، آلمان) به صورت سطحی کشت داده شد (Konop et al., 2020). برای تایید حضور باکتری اشیریشیاکولای در موضع مورد آزمایش، از کشت بر روی محیط EMB (شرکت مرک، آلمان) و سپس تست‌های بیوشیمیایی IMVIC شامل تست احیا سیترات، ایندول، MR و VP (شرکت مرک، آلمان) (Gholami-Ahangaran et al., 2016) استفاده شد. برای شمارش باکتری، تعداد باکتری‌ها با تهیه رقت‌های سریال (از رقت  $10^{-1}$  تا  $10^{-8}$ ) شمارش شد (Gholami-Ahangaran et al., 2019). بدین منظور از هر رقت یک میلی‌لیتر به پلیت خالی استریل ریخته شده و سپس حدود ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مک‌کانگی آگار (مرک، آلمان) ذوب شده با دمای بین ۴۵-۵۰ درجه سلسیوس به آن اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت تعداد کلنی‌های شمارش شده در هر

جدول ۱- مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره گیاهان کاپاریس اسپینوزا و پسته وحشی بر سویه استاندارد باکتری اشریشیاکولای

ترکیب مورد آزمایش	حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (میلی گرم بر میلی لیتر)	حداقل غلظت باکتری کشی (میلی گرم بر میلی لیتر)	میانگین قطر منطقه عدم رشد (میلی متر)
عصاره کاپاریس اسپینوزا (۵۰ mg/ml)	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۸±۰/۲۲ <sup>c</sup>
عصاره پسته وحشی (۵۰ mg/ml)	۱۲/۵	۲۵	۱۴ ±۰/۱۳ <sup>b</sup>
آنتی بیوتیک جنتامایسین (۵ mg/disc)	-	-	۲۲±۰/۴ <sup>a</sup>

a,b,c: حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می باشد ( $p < 0/05$ ).

**نتایج مربوط به شمارش باکتری اشریشیاکولای در شرایط بالینی:** جدول ۲ نتایج میانگین شمارش اشریشیاکولای را در گروه های تیمار شده با عصاره گیاهان کاپاریس اسپینوزا و پسته وحشی را در مقایسه با گروه شاهد در روز پنجم و دهم نشان می دهد.

جدول ۲- نتایج شمارش باکتری اشریشیاکولای در شرایط بالینی در گروه های مورد مطالعه

تعداد / گروه مورد آزمایش	موش های تیمار شده با کاپاریس اسپینوزا	موش های تیمار شده با پسته وحشی	موش های شاهد (بدون درمان)
روز پنجم	۲×۱۰ <sup>۳</sup> ±۰/۷ <sup>a</sup>	۴×۱۰ <sup>۳</sup> ±۰/۷ <sup>a</sup>	۵×۱۰ <sup>۴</sup> ±۲/۴ <sup>c</sup>
روز دهم	۱/۸×۱۰ ±۰/۴ <sup>b</sup>	۱/۴×۱۰ ±۰/۲ <sup>b</sup>	۱×۱۰ <sup>۵</sup> ±۰/۲ <sup>d</sup>

a,b,c: حروف متفاوت در هر سطر و ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می باشد ( $p < 0/05$ ).

## بحث و نتیجه گیری

بازدارنده می باشند. فرضیه کشندگی در مورد باکتری اشریشیاکولای که یک باکتری گرم منفی است و دیواره سلولی این باکتری بیشتر لیپیدی می باشد، فقط به دلیل تخریب دیواره سلولی، چندان قطعی نمی باشد. نفوذ ترکیبات اسانس به داخل دیواره سلولی و تخریب میتوکندری از دلایل دیگر از بین رفتن باکتری می باشد (Hanafi et al., 2012). افشاری پور و همکاران در سال ۱۹۹۸ به بررسی ترکیبات شیمیایی گیاه کاپاریس اسپینوزا پرداختند و بیان کردند که اصلی ترین ترکیب این گیاه تیمول می باشد (Afsharypuor et al., 1998). درویچ و همکاران در سال ۲۰۱۰ (Derwich et al., 2010) و سیوروپولو و همکاران در سال ۱۹۹۶ (Sivropoulou et al., 1996) در مطالعات خود بیان

یافته های مطالعه حاضر نشان داد که تاثیر بازدارندگی عصاره کاپاریس اسپینوزا در مقایسه با پسته وحشی علیه باکتری اشریشیاکولای قابل توجه می باشد. مقادیر MIC و MBC در مورد باکتری اشریشیاکولای و همچنین قطر هاله عدم رشد این مطلب را تایید کرد (Ben Douissa et al., 2005; Hanafi et al., 2012). گزارش شده است که فعالیت ضد میکروبی عصاره های گیاهی ناشی از ترکیبات اصلی و یا اثر سینرژیستی میان ترکیبات موجود در گیاه می باشد. بر طبق بررسی های به عمل آمده در مورد باکتری اشریشیاکولای، زمان تاثیر عصاره و مهاجرت ترکیبات بازدارنده عصاره به اطراف مناطق عدم رشد، فاکتورهای



حضور بتا پینن نسبت دادند (Karimi Poor fard, *et al.*, 2012).

از طرف دیگر، نتایج حاصله از مطالعه حاضر، اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه موش صحرائی تیمار شده با عصاره گیاهان پسته وحشی و کاپاریس / اسپینوزا در مقایسه با گروه شاهد نشان داد، به طوری که در گروه‌های تیمار شده کاهش معنی‌داری در میزان باکتری / شریشیاکولای در محل زخم مشاهده شد. این نتایج با یافته‌های به دست آمده از سایر تحقیقات نیز همخوانی دارد. نیکبخت و همکاران در سال ۲۰۱۶ به اثربخشی عصاره پسته وحشی در بهبود زخم پای دیابتی پرداختند و بیان کردند که استفاده از عصاره این گیاه مانع رشد باکتری‌ها در زخم پای افراد دیابتی شده و مدت زمان بهبودی و بستری را کاهش می‌دهد و این خاصیت را به مواد فنولیکی به خصوص فلاونوئیدهای موجود در این گیاه نسبت دادند (Nikbakht *et al.*, 2016). مواد فنولی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌های آزاد هستند که آثار مثبتی در ترمیم انواع زخم از خود نشان می‌دهند (Gomathi *et al.*, 2003).

با توجه به اطلاعات به دست آمده از فاکتورهای مختلف در این تحقیق، مشخص شد که عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان کاپاریس / اسپینوزا و پسته وحشی، دارای خاصیت مهارکنندگی روی باکتری / شریشیاکولای در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی می‌باشند، اما عصاره پسته وحشی دارای اثرات ضد میکروبی کمتری نسبت به عصاره کاپاریس / اسپینوزا است. بنابراین می‌توان بیان داشت که عصاره حاصله از این گیاهان باعث مهار رشد باکتری / شریشیاکولای در زخم‌های عفونی شده و از این طریق منجر به تسریع روند التیام

داشتند که تیمول دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد. همچنین نوسترو و همکاران در سال ۲۰۰۷ (Nostro *et al.*, 2007) و ترومبتا و همکاران در سال ۲۰۰۵ (Trombetta *et al.*, 2005) بیان کردند که تیمول دارای ماهیت آبدوستی می‌باشد و در برخورد با غشای باکتری‌ها، با لپیدها واکنش داده و باعث از هم گسیختگی غشا و نشت مواد سلولی و در نهایت منجر به از بین رفتن باکتری می‌شود. گزارشات بسیاری هم مبنی بر این که گونه‌های جنس پسته وحشی دارای ترکیباتی مثل فنول‌ها و ترپنوئیدها هستند وجود دارد (Yalpani, and Tyman, 1983; Marner *et al.*, 1991). ترکیبات فنلی نقش مهمی در جلوگیری از رشد باکتری‌ها دارند و تفاوت در تاثیر این ترکیبات بستگی به نوع و غلظت ترکیبات فنولی و روش عصاره‌گیری دارد (Das *et al.*, 2010). بررسی‌ها نشان داده است که محل اثر ترپنوئیدها، غشای سلولی باکتری می‌باشد. این ترکیبات نفوذپذیری غشای سلول را تغییر داده و باعث افزایش سیالیت غشا می‌گردند (Cowan, 1999). قاسمی پیربلوطی و آقایی در سال ۲۰۱۱ با بررسی ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه پسته وحشی ایرانی نشان دادند که اصلی‌ترین ترکیبات این گیاه عبارتند از فلاندرن و آلفا پینن (Ghasemi Pirbalouti and Aghae, 2011). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که آلفا پینن یک ترکیب ضد میکروبی بسیار مهم در اسانس پسته وحشی می‌باشد (Saffarzadeh *et al.*, 1999; Del Azar *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2003). کریمی پور فرد و همکاران در سال ۲۰۱۲ خواص آنتی‌باکتریال موجود در بانه را به

### سپاسگزاری

نویسندگان بر خود واجب می‌دانند از کارشناسان بخش میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار کمال تشکر و قدردانی را بنمایند.

زخم می‌گردد. البته مطالعات بیشتری جهت تعیین دوز مطلوب و ایده‌آل و تهیه شکل دارویی مناسب از عصاره این گیاهان و همچنین انجام مطالعات هیستوپاتولوژیکی هم پیشنهاد می‌گردد.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

### منابع

- Afsharypuor, S., Jeira, n K. and Jazy, A.A. (1998). First investigation of the flavor profiles of leaf, ripe fruit and root of *capparis spinosa* var. mucronifolia from Iran. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72(1): 307-309.
- Ahmadi, R. and Gasemi, N. (2015). Comparative study of effect Cinnamon extract used local and injection in diabetic and nondiabetic male rats. *Journal of Medical Science of Islamic Azad University*, 25(1): 27-32. [In Persian]
- Akhoondinasab, M.R., Akhoondinasab, M. and Saberi, M. (2014). Comparison of healing effect of Aloe vera extract and Silver sulfadiazine in burn injuries in experimental rat model. *World Journal of Plastic Surgery*, 3(1): 29-34.
- Ben Douissa, F., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Hammami, M., Ghedria, K. and Mariotte, A.M. (2005). New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Anacardiaceae* from Tunisia. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(10): 410-414.
- Benhammou, N., Bekkara, F.A. and Panovska, T.K. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2): 22-28.
- Bowersox, J. (2007). Experimental Staph vaccine broadly protective in animal studies. NIH.
- Cowan, M.M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582.
- Das, K., Tiwari, R.K.S. and Shrivastava, D.K., (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2): 104-111.
- Del Azar, A., Nazemyieh, H., Modaresi, M. and Afshar, J. (2003). Study on essential oil obtained from oleoresin of *Pistacia atlantica* var mutica. *Pharmaceutical Sciences*, 2(1): 27-38.
- Derwich, E., Benziane, Z., Manar, A., Boukir, A. and Taouil R. (2010). Phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Oreganum vulgare* from morocco. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 5(2): 120-129.
- Emad, M., Gheibi, F., Rasool, S.M., Khangazade, R. and Jozani, S. (2012). *Capparis spinosa*. Headquarters for Research and Application of Iranian Medicinal Plants and Medicine. Office of Forest Resources Affairs. [In Persian]

- Feng, P., Weagant, S. and Grant, M. (2002). Bacteriological Analytical Manual. 8th ed., US FDA center for food safety and applied nutrition publishing, USA.
- Ganjali, A., Sotoudeh, A., Jahanshahi, A., Ashrafzadeh, M., Bazzazan, A., Roodbari, N., *et al.* (2013). *Ototegia persica* extraction on healing process of burn wounds. *Acta Cirurgica Brasileira*, 28(6): 407-411.
- Ghasemi Pirbalouti, A. and Aghae, K. (2011). Chemical Composition of Essential Oil of *Pistacia khinjuk* Stocks Grown in Bakhtiari Zagross Mountains, Iran. *Electronic Journal of Biology*, 7(4): 67-69.
- Ghashghae, F., Jafari, A. and Moazamian, E. (2016). Survey effect of *Peganum harmala*, *Thymus daenensis*, *Frlago angulata* on wound infection caused by *Pseudomonas aeuroginosa* exotoxin A-producing in laboratory mice. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 10(1): 82-87.
- Gholami-Ahangaran, M., Ghasemi Pirbalouti, A., Farasat, M. and Fasihi, K. (2015). Antimicrobial effect of *Zataria multiflora*, *Thymus daenensis*, *Althea officinalis*, and *Urtica dioica* on growth of *Escherichia coli* isolated from poultry colibacillosis. *Iranian Journal of Veterinary Microbiology*, 1: 1-10.
- Gholami-Ahangaran, M., Shahzamani, S. and Yazdkhasti, M. (2016). Comparison of Virkon S (r) and Formaldehyde on hatchability and survival rate of chicks in disinfection of fertile eggs. *Revue Médecine Vétérinaire*, 167(1-2): 45-49.
- Gholami-Ahangaran, M., Peimani, N. and Dastgerdi, A.A. (2019). The effect of thyme (*Thymus daenensis*) supplement on growth and hygienic parameters of broilers meat. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 33(1): 87-92.
- Gomathi, K., Gopinath, D., Rafiuddin, A.M. and Jayakumar, R. (2003). Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rats. *Biomaterials*, 24(16): 2767-72.
- Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P. and Gaydou, E.M. (2010). Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 31(2): 203-208.
- Hanafi, G.M., Darvishi, S., Darvishi, N., Sayedin-ardabili, S.M. and Mir-ahmadi, F. (2012). Antibacterial effect of essential oil of mastic resin on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Clostridium sporogenes*. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 17(1):1-10. [In Persian]
- Leite, A.M, Lima, E.O., Souza, E.L., Trajano, V.N. and Medeiros, I.A. (2007). Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(1): 121-126.
- Konop, M., Czuwara, J., Kłodzińska, E., Laskowska, A. K., Sulejczak, D., Damps, T. and Schwartz, R. A. (2020). Evaluation of keratin biomaterial containing silver nanoparticles as a potential wound dressing in full-thickness skin wound model in diabetic mice. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 14(2): 334-346.
- Karimi Poor fard, M., Mirzaei, A., Kargar, M., Khosravani, S. and Mohamadi R. (2012). Antibacterial Activities of *Thymus denaensis*, Jaft and Hydro-Alcoholic Extract of Green hull *Pistacia atlantica* on *Listeria monocytogenes*. *Armaghane danesh*, 17(1): 68-77. [In Persian]
- Kummar, B., Vijayakumar, M., Govindarajan, R. and Pushpangadan, P. (2007). Ethnopharmacological approaches to wound healing—exploring medicinal plants of India. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(1): 103-130.
- Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounid, A.L., Chinou, I.B. and Mitaku, S. (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *Chia Plant Medicinal*, 65(8): 749-752.
- Marner, F.J. Freyer, A. and Lex, J. (1991). Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia lentiscus*. *Phytochemistry*, 30(11): 3709-3721.

- Moraghebi, F., Teymoori, M., Khoshnevis, M., Karvari, S., Matinzade, M. and Salehi, P. (2000). Antimicrobial activity of different extracts of *Pistacia atlantica* leaf. Ministry of Agriculture. Institute of Forests and Rangelands Research. Khorramabad, Iran. [In Persian]
- Mortazavi, S.M., Azadmard Damirchi S., Sowti M., Mahmudi, R., Safaeian, F. and Moradi Azad S. (2013). Antimicrobial Effects of ethanolic extract of the hull and the core of *Pistacia khinjuk* stocks. Journal of Innovative Food Technologies, 1(4): 81-88. [In Persian]
- Nikbakht, M.R., Soleimani, Z., Moravveji, S.A. and Esalatmanesh, K. (2016). Evaluating the effectiveness of *Pistacia atlantica* in the improvement of diabetic foot. Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, 20(4): 347-351. [In Persian]
- Nostro, A., Roccaro, A., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., et al. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Journal of Medical Microbiology, 56(4): 519-523.
- Saffarzadeh, A., Vincze, L. and Csapo, J. (1999). Determination of the chemical composition of acorn (*Quercus brantii*), *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk* seeds as non-conventional feedstuffs. Acta Agraria Kaposváriensis, 3(3): 59-69.
- Sharifi, M.S., Ebrahimi, D., Hibbert, D.B., Hook, J. and Hazell, S.L. (2012). Bio-Activity of Natural Polymers from the Genus Pistacia: A Validated Model for Their Antimicrobial Action, Glob. Journal of Health Science, 4(1): 149-161.
- Schito, G.C. (2006). Importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Infection, 12(1): 3-8.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 44(5): 1202-1205.
- Sombonwong, J., Kankarisre, M., Tantisira, B. and Tantisira, M.H. (2012). Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. BMC Complementary and Alternative Medicine, 12(1): 103.
- Tohidi, M., Khayami, M., Nejati, V. and Meftahizade, H. (2011). Evaluation of antibacterial activity and wound healing of *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk*. Journal of Medicinal Plants Research, 5(17): 4310-4314.
- Trombetta, D., Occhiuto, F., Perri, D., Puglia, C. and Santagati, N.A. (2005). Antihistaminic effect of two extracts of *Capparis spinosa* flowering buds. Phytotherapy Research, 19(1): 29-33.
- Valilou, M. and Valilou, S. (2017). A comparative study of histopathological effects of aqueous extract of cinnamon and honey with sulfadiazine on skin burn wound healing in rats infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 11(43): 285-295.
- Yalpani, M. and Tyman, J.U.P. (1983). The phenolic acids of *Pistachia vera*. Phytochemistry, 22(10): 2263-2266.
- Yadeghar, O., Asghari, A. and Hesaraki, S. (2013). Evaluation of wound healing activity of *Commiphora myrrha* extract compared with silver sulfadiazine on experimental skin burn healing in rat. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 7(27): 173-182.

“Research article”

DOI: 10.30495/jvcp.2020.1883526.1247

## Antibacterial effect of *Capparis spinosa* (*Capparis spinosa*) and *Pistacia atlantica* (*Pistacia atlantica*) extracts on growth of *Escherichia coli* in vitro and in vivo

Ansari Chaharsughi, M.S.<sup>1</sup>, Ahmadi Dastgerdi, A.<sup>2\*</sup>, Gholami-Ahangaran, M.<sup>3</sup>

1- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran.

3- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

\*Corresponding author's email: as.ahmadi17@gmail.com

(Received: 2019/11/25 Accepted: 2020/8/15)

### Abstract

*Escherichia coli* is the cause of many surgical wound infections. This study was designed to investigate the antibacterial effects of hydroalcoholic extract of *Capparis spinosa* and *pistacia atlantica* on *E. coli* in surgical wounds using a rat model. The antimicrobial activity of *Capparis spinosa* and *pistacia atlantica* extract was first determined by paper disk diffusion method to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and also Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Then, 30 male *Sprague-Dawley* rats were randomly divided into three treatment groups. A circular incision was made on the dorsal inter-scapular region of each rat. Then, rats were inoculated topically with  $1.5 \times 10^8$  CFU of *E. coli* at the site of skin wounds. The extracts of *Capparis spinosa* and *Pistacia atlantica* was applied to wounds twice a day during the experiment. Animals of the control group were left untreated. The results showed that the extract of *Capparis spinosa* and *Pistacia atlantica* had antimicrobial effects against *Escherichia coli*. The antimicrobial activity of *Capparis spinosa* extract against *E. coli* was higher than the *Pistacia atlantica* extract (The MIC and MBC values). Also there was a significant difference in the rats treated with the extracts in comparison to the control group. It can be concluded that the extracts of these plants have antimicrobial properties and inhibit the growth of *Escherichia coli* in infected wounds and thus can accelerate the wound healing process.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** *Capparis spinosa*, *Escherichia coli*, Extract, *Pistacia atlantica*, Surgical wound.