

Survey Effect of *Peganum harmala*, *Thymus daenensis*, *Ferulago angulata* on wound infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-producing in laboratory mice

Forogh Ghashghae¹, Azizollah Jafari², Elham Moazamian³

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

2. Faculty of Science, Yasuj University, Yasuj, Iran

3. Department of Microbiology, Faculty of Science, Agriculture and New technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2014/12/07

Accepted: 2015/09/13

Available online: 2016/05/21

Article Subject:

Antimicrobial Metabolites

IJMM 1395; 10(1): 82-87

Corresponding author at:

Dr. Elham Moazamian

Department of Microbiology,
Faculty of Science, Agriculture
and New technology, Shiraz
Branch, Islamic Azad
University, Shiraz, Iran

Tel:

+98 917 7110994

Email:

elhammoazamian@gmail.com

Abstract

Background and Aim: Burn wound is a susceptible site for incidence of resistant infections. Therefore, research for finding effective drugs against *Pseudomonas aeruginosa*, the leading pathogen causing burn wound infection, is necessary. The current study aimed at investigating the antibacterial effect of herbs including: Daenensis thyme, Chavill (*Ferulago angulata*), and Harmala on burn infection caused by *P. aeruginosa* and then comparing the obtained results with the results of selected antibiotics on the infection.

Materials and Methods: Anti-*Pseudomonas* activity of plants' extractions was evaluated by well diffusion method. The evaluation of burn wound recovery treated with *Peganum harmala* and daenensis thyme on burn wounds of albinos. Wound area and recovery percentage was measured. The number of neutrophils and lymphocytes, from all infected groups the sample of blood was obtained.

Results and Conclusions: The measurement results of the zone of inhibition against *P. aeruginosa* showed better consequences for *Thymus daenensis*. The number of colonies in the treated group with plants and ciprofloxacin showed significant differences as compared with the control group and the group treated with gentamicin. In counting the white blood cells of infected control group and gentamicin treated group, the number of white blood cells was below the normal level while the number of blood cells in groups treated with medicinal plants and ciprofloxacin were normal. Based on the obtained results of this study on these plant species and their positive activity on treatment of infected burn wounds, it was concluded that these plants can be considered and used as an anti-*Pseudomonas*.

Key Words: *Thymus daenensis* (Thyme), *Peganum harmala* (harmala), *Ferulago angulata* (chavill), wound healing, *Pseudomonas aeruginosa*

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ghashghae F, Jafari A, Moazamian E. Survey Effect of *Peganum harmala*, *Thymus daenensis*, *Ferulago angulata* on wound infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-producing in laboratory mice. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (1) :82-87

بررسی اثر اسانس گیاهان اسفند، آویشن دنايي و چویل بر عفونت سوختگی ناشی از سودوموناس ائروژینوزا مولد اگزوتوکسین A در موش سوری آزمایشگاهی

فروغ قشقایی^۱، عزیزالله جعفری^۲، الهام معظمیان^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

۲. دانشکده علوم، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

۳. گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: زخم سوختگی محل مناسبی برای بروز عفونت‌های مقاوم به درمان می‌باشد و باکتری سودوموناس ائروژینوزا رایج‌ترین باکتری مولد این عفونت‌ها می‌باشد. بنابراین، تحقیق در زمینه بدست آوردن داروهای مؤثر ضروری بنظر می‌رسد. هدف از این تحقیق، شناسایی اثر ضد باکتریایی گیاهان آویشن دنايي، چویل و اسفند بر روی عفونت زخم سوختگی ناشی از سودوموناس ائروژینوزا و مقایسه آن با اثر آنتی بیوتیک‌های منتخب بر روی این باکتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: اثر ضد سودوموناسی اسانس گیاهان با استفاده از تست چاهک بررسی گردید. جهت ارزیابی ترمیم زخم‌های سوختگی عفونی از تیمار با دو اسانس اسفند و آویشن دنايي بر روی زخم سوختگی موش سوری استفاده شد. مساحت زخم و درصد بهبودی اندازه گیری شد. از گروه‌های آلوده جهت بررسی تعداد نوتروفیل و لنفوسیت‌ها نمونه خون گرفته شد.

یافته‌ها و بحث: نتایج حاصل از اندازه گیری قطر هاله عدم رشد علیه سودوموناس ائروژینوزا برای اسانس آویشن دنايي بیشترین نتیجه را در برداشت. تعداد کلنی در گروه درمان شده با گیاهان و سیپروفلوکساسین تفاوت معنی داری نسبت به گروه شاهد و گروه درمان شده با جنتامایسین نشان داد. در شمارش گلبول‌های سفید خون موش‌های آلوده شاهد و درمان شده با جنتامایسین کمتر از سطح نرمال قرار گرفت، در صورتی که تعداد این سلول‌ها در خون گروه‌های درمان شده با گیاهان دارویی و سیپروفلوکساسین در محدوده نرمال مشاهده گردید. با توجه به نتایج بدست آمده از گونه‌های گیاهی و درمان زخم سوختگی عفونی می‌توان پس از مطالعات وسیع‌تر، به عنوان یک داروی ضد سودوموناس مورد توجه قرار گیرند.

کلمات کلیدی: آویشن دنايي، اسفند، چویل، سودوموناس ائروژینوزا، زخم سوختگی

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۶

پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۲۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۳/۰۱

موضوع:

متابولیت‌های ضد میکروبی

IJMM 1395; 10(1): 82-87

نویسنده مسئول:

دکتر الهام معظمیان

گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

تلفن: ۰۹۱۷۷۱۱۰۹۹۴

پست الکترونیک:

elhammoazamian@gmail.com

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

و بتا-کاربولین‌ها خواص متعددی از جمله ضد میکروب، ضد قارچ و ضد انگل روده ای نهفته است (۲). جنس آویشن با نام علمی *Thymus* از خانواده نعناعیان در بر گیرنده تقریباً ۲۱۵ گونه علفی پایا و درخچه ای کوتاه در دنیاست و منطقه مدیترانه به عنوان مرکز این جنس معرفی شده است (۳). مطالعات نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف جنس آویشن دارای اثرات ضد باکتری، ضد قارچ، ضد انگل، ضد اسپاسم و آنتی اکسیدان می‌باشد (۴،۵). چویل با نام علمی *Ferulago angulata* از گیاهان طبیعی و بومی غرب ایران می‌باشد (۶). این گیاه به

زخم سوختگی محل مناسبی برای بروز عفونت‌های مقاوم به درمان می‌باشد. بنابراین، تحقیق در زمینه بدست آوردن داروهای مؤثر بر باکتری سودوموناس ائروژینوزا که رایج‌ترین باکتری مولد این عفونت‌ها می‌باشد ضروری بنظر می‌رسد. گیاه اسپند از تیره *Zygophyllaceae* است و دارای آلکالوئیدهایی به نام هارمالین، هارمین، هارمالون می‌باشد (۱). در این دانه‌ها به دلیل وجود مجموعه ای از مواد آلکالوئیدی

شد (۱۲). برای بررسی حساسیت و مطالعه اولیه سودوموناس اثرورژینوزا به اسانس های گیاهی که از قبل تهیه شده است از روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک در محیط مولر هینتون استفاده شد. (۷، ۱۳). جهت بررسی اثر بهبودی و کاهش عفونت زخم های سوختگی ناشی از سودوموناس اثرورژینوزا با توجه به میزان در دسترس بودن گیاهان، اثر اسانس دو گیاه آویشن دناپی و اسفند بر روی زخم سوختگی عفونی مدل موش های سوری آزمایشگاهی بررسی شد.

حیوانات مورد آزمایش

در این مطالعه موش سفید نر آزمایشگاهی با وزن ۳۰ تا ۴۰ گرم از مرکز پزشکی مقایسه ای و تجربی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه گردید. موش ها در قفس های جداگانه قرار گرفتند و آب و غذا در اختیار آنها قرار گرفت. قفس ها در یک اتاق با درجه حرارت ۲۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس و سیکل روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند (۱۴).

روش ایجاد زخم سوختگی

موش ها با استفاده از داروی بیهوشی اثر به صورت موقت بیهوش شدند. سپس موهای ناحیه پشت آنها تراشیده شد و یک سوختگی درجه ۲ ایجاد گردید. سوختگی به حد کافی کوچک بود تا پاسخ سیستمیک ایجاد نکند. انجام کلیه آزمایشات با رعایت کامل ضوابط اخلاقی کار، بر روی حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت (۱۰، ۱۵).

اندازه گیری مساحت زخم و سنجش درصد بهبودی

برای ارزیابی روند ترمیم، ابعاد زخم از اولین روز ایجاد عفونت تا روز ۲۱ درمان اندازه گیری شد. سپس با استفاده از روابط زیر درصد زخم و درصد بهبودی در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ بعد از ایجاد عفونت محاسبه گردید (۱۶، ۱۷).

$$\text{درصد زخم} = \frac{\text{مساحت زخم در روز } X}{\text{مساحت زخم در روز اول}}$$

$$\text{درصد بهبودی} = 100 - \text{درصد زخم}$$

پس از بدست آوردن اطلاعات گروه های آزمایشی مختلف، نتایج بدست آمده با استفاده از آنالیز آماری واریانس دو طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. در تمام نمودارها داده ها بصورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شده است.

دلیل داشتن ترکیبات آنتی اکسیدان، اثرات ضد دیابت آن به اثبات رسیده است و دارای ترکیبات نگهدارنده قوی می باشد که از این جهت به عنوان ماده افزودنی و نگهدارنده به مواد غذایی اضافه می شود (۷). یکی از علل مهم مرگ و میر و از کار افتادگی، سوختگی های ناشی از حرارت و عوارض آن می باشد. ضایعه سوختگی باعث می شود تا پوست که به عنوان سد دفاعی بدن در مقابل ورود میکروب ها است، از بین برود و سیستم ایمنی فرد دچار نقص شود (۸). زخم سوختگی در خطر آلودگی به طیف وسیعی از باکتری های فرصت طلب قرار دارد (۹).

سودوموناس اثرورژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب است که باعث عفونت های حاد و مزمن بیمارستانی در بیمارانی با نقص سیستم ایمنی می شود. یکی از علل مقاومت این ارگانیسم به اغلب داروها استفاده نامناسب از چند دارو در درمان عفونت می باشد (۱۰). یکی از علل مقاومت این ارگانیسم به اغلب داروها استفاده نامناسب از چند دارو در درمان عفونت می باشد (۱۱). یافتن ماده موثری با منشا گیاهی که به عنوان یک میکروب کش بر علیه میکروارگانیسم های مقاوم به آنتی بیوتیک ها مورد استفاده قرار گیرد و اثرات سمی و جانبی آن قابل تحمل برای میزبان باشد و بتوان آن را در جراحی های عفونی بکار برد، همیشه در مد نظر پژوهشگران بوده است.

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات ضد سودوموناس گیاهان آویشن دناپی، چویل و اسفند در مقایسه با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و جتتاماسین در شرایط آزمایشگاهی و زخم سوختگی می باشد از طرفی با شمارش نوتروفیل ها و لنفوسیت ها، تغییرات گلبول های سفید خون در عفونت های سودوموناس اثرورژینوزا مولد توکسین بررسی شده است.

روش بررسی

تهیه سوسپانسیون میکروبی و سنجش حساسیت ضد میکروبی

در این بررسی میکروارگانیسم سودوموناس اثرورژینوزا (ATCC+151) که توانایی تولید توکسین را دارد، از مرکز تحقیقات دانشگاه تربیت مدرس تهران تهیه گردید. با استفاده از غلظت و کدورت محیط نیم مک فارلند، سوسپانسیون میکروبی تهیه شد. از محلول حاوی سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط مولر هینتون آگار به روش خطی در سه جهت کشت داده

روش شمارش کلنی

شمارش کلنی از سطح زخم‌ها بصورت یک روز در میان انجام گرفت. نمونه برداری با استفاده از سوپ استریل آغشته به نرمال سالین انجام و سپس بر روی محیط بلاد آگار پایه به روش خطی کشت داده شد. داده‌های بدست آمده از گروه‌های تیمار شده با اسانس اسفند و آویشن دناپی، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین با گروه شاهد سوخته و عفونی مقایسه گردید. داده‌ها با استفاده از آنالیز دوطرفه تجزیه و تحلیل شد (۱۴).

روش خون‌گیری و شمارش نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها

در روز ۱۶ بعد از درمان به دلیل بررسی گلبول‌های سفید در خون موش‌ها از تمام گروه‌های آلوده و شاهد خون‌گیری شد. بعد از رنگ آمیزی گیمسا، سلول‌های خونی سفید با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش شدند (۱۸).

یافته‌ها و بحث

گیاهان اولین ترکیباتی بودند که توسط انسان به عنوان دارو مورد استفاده قرار گرفتند و در طی زمان اثرات دارویی خود را به خوبی نشان دادند. طب سنتی از هزاران سال پیش جهت اهداف درمانی استفاده می‌شده است که در این میان استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهان دارویی جایگاه قابل ملاحظه‌ای را به خود اختصاص داده است. اخیراً استفاده از ترکیباتی که به طور کلی بی‌ضرر تلقی می‌شوند و به GRAS (Generally regarded as safe) معروفند، توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌اند. ترکیبات طبیعی فعال بیولوژیکی مشتق از گیاهان از جمله بهترین ترکیبات GRAS می‌باشند، زیرا مواد حاصل از اسانس و عصاره‌های گیاهان را می‌توان جهت حفظ و نگهداری مواد غذایی و در داروسازی و به عنوان عوامل درمانی جدید علیه بیماری‌ها و عفونت‌های میکروبی به کار برد (۱۹). در سال ۲۰۰۳ Sangelic نشان داد که اسانس گیاه آویشن بر روی باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر بازدارندگی دارند (۷). طی تحقیق حاضر نیز اثرات اسانس آویشن دناپی بر روی

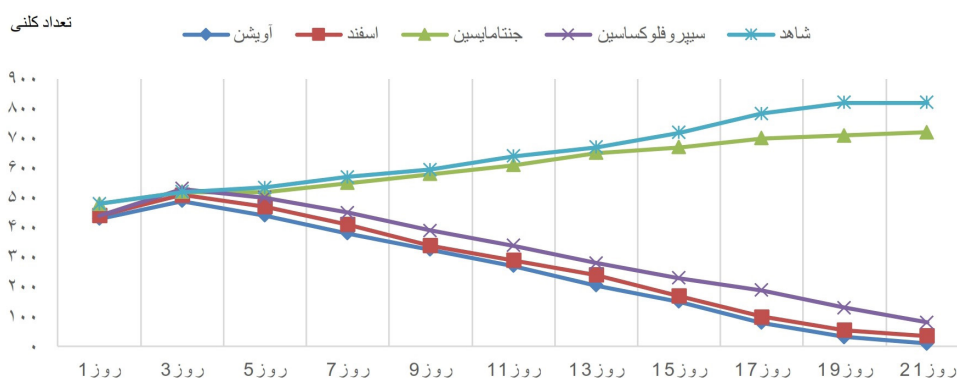
سودوموناس ائروژینوزا به اثبات رسید (جدول ۱). همچنین نتایج بررسی زخم‌های سوختگی آلوده به *سودوموناس ائروژینوزا* نشان داد که این گیاه در ترمیم و بهبود زخم‌های سوختگی آلوده موثر می‌باشد و باعث تحریک و رویش مجدد مو در ناحیه سوختگی شده است (جدول ۲). در سال ۲۰۰۸، Arshad مطالعه‌ای بر روی اثرات اسفند بر روی عفونت‌های *اشرشیا کلی* مرغ و خروس‌های اهلی انجام گرفت. نتایج این تحقیق، اثرات دانه‌های اسفند در مقابل *اشرشیا کلی* را به اثبات رساند (۲۰). با توجه به نتایج مطالعه حاضر اثرات اسانس گیاه اسفند بر روی *سودوموناس ائروژینوزا* در شرایط آزمایشگاهی و *in vivo* نشان داد که اسانس اسفند بر *سودوموناس ائروژینوزا* اثر کرده و باعث کاهش و بهبودی عفونت زخم سوختگی شده است. Taran در سال ۲۰۱۰ اثر ضد میکروبی گیاه چویل را به روش MIC بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا منوسیتوژنز* و *اشرشیا کولی* نشان داد. همچنین وی عنوان کرد که بخش‌های هوایی گیاه چویل بخش‌های هوایی گیاه چویل به دلیل داشتن آلفا پنین و بتا پنین دارای خواص میکروب‌کشی می‌باشد (۲۱). طی تحقیق حاضر نیز اثرات اسانس چویل بر روی *سودوموناس ائروژینوزا* به روش چاهک به اثبات رسید. از طرفی از آنجا که تاکنون تحقیقات زیادی بر روی اثرات ضد میکروبی گیاه چویل انجام نشده است این یافته حائز اهمیت می‌باشد. در سال ۱۳۸۷ مطالعه‌ای توسط Naghmachi بر شمارش گلبول‌های سفید موش‌های سوخته آلوده به *سودوموناس ائروژینوزا* مولد اگزوتوکسین انجام گرفت. در این بررسی ثابت شد که تعداد گلبول‌های سفید کاهش پیدا کرده است و اگزوتوکسین *سودوموناس ائروژینوزا* با تاثیر بر گلبول‌های سفید به استقرار عفونت کمک می‌کند (۱۷). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اثر درمان بر بهبودی زخم‌های سوختگی عفونی و تحریک گلبول‌های سفید خون در بیماران سوخته آلوده به *سودوموناس ائروژینوزا* کاملاً موثر می‌باشد. بررسی‌های انجام شده بر روی اثرات ضد *سودوموناس* اسانس تام گیاهان آویشن دناپی، اسفند و چویل نشان داد که این گیاهان از رشد *سودوموناس ائروژینوزا* جلوگیری کردند و در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و جنتامایسین

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی‌متر) اسانس تام اسفند، آویشن دناپی و چویل در مقایسه با سیپروفلوکساسین و جنتامایسین روی میکروارگانیزم مورد آزمایش به روش چاهک پلیت پس از سه بار تکرار

اسانس اسفند	اسانس آویشن دناپی	اسانس چویل	جنتامایسین	سیپروفلوکساسین	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
۲۰	۳۰	۲۵	۱۰	۱۵	ارگانیزم مورد مطالعه
سودوموناس ائروژینوزا (ATCC+151)					

جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی متر) اسانس تام اسفند، آویشن دناهی و چویل در مقایسه با سیروفلوکساسین و جنتامایسین روی میکروارگانیزم مورد آزمایش به روش چاهک پلیت پس از سه بار تکرار

روزهای بررسی شده			
روز بیستم	روز پانزدهم	روز دهم	روز پنجم
(۹۴/۸)±۰/۰	(۶۸/۶۸)±۰/۰	(۳۸)±۴/۹	(-۱۱/۸)±۵/۳
(۸۰)±۶/۵	(۶۰)±۴/۱	(۳۱/۵)±۳/۱	(-۱۵/۳)±۷/۰۷
(۴۵)±۰/۰	(۲۵)±۰/۰	(۳)±۰/۰	(-۱۴)±۰/۰
(-۷۸)±۰/۰	(-۶۰)±۰/۰	(-۴۱)±۰۷/۷	(-۳۰)±۰۷/۷
(-۱۲۰)±۰/۰	(-۱۱۰)±۰/۰	(-۸۰)±۰	(-۵۶)±۰/۰



نمودار ۱: یافته های حاصل از شمارش کلنی زخم های آلوده به سودوموناس در طول ۲۱ روز درمان

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از دانشکده دامپزشکی دانشگاه یاسوج به جهت همکاری در اجرای این پروژه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

با توجه به مقاومت این ارگانیزم موثرتر می باشند (نمودار ۱). همچنین در ترمیم زخم سوختگی گیاهان آویشن دناهی و اسفند نسبت به گروه شاهد بدون درمان تاثیر معنی داری ایجاد کرده اند. در شمارش گلبول های سفید در گروه درمان شده با آویشن دناهی تعداد سلول های نوتروفیل و لنفوسیت در سطح نرمال قرار گرفتند که این می تواند از نتایج مثبت گیاه آویشن دناهی بر تحریک و تقویت سیستم ایمنی باشد.

Reference

- Sobhani A, Ebrahimi S.A, Mahmodian M. An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by Peganum harmala L. seeds extract and its b-carboline alkaloids. J Pharm Pharm Sci. 2002; 5:19-23.
- Chao Wu, Xi-Ling J, Hong-Wu S, Ai-Ming Yu. Effects of CYP2D6 status on harmaline metabolism, pharmacokinetics and pharmacodynamics and a pharmacogenetics based pharmacokinetic model. Bioche Pharmacol-ogy. 2009; 78: 617-624.
- Haitham N, Qaralle H, Muayad M, Abboud khaled M, khalifat khaled A, Tarawne H, Osama Y, Alt-huniba T. Anti-bacterial activity in vitro of thymus capitatus from Jordan. J Pharm Sci 2009; 3:247-251.
- Jam zadeh Z. Thymus. First pirint. Publications of Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran; 1995; 19:1-20 [In Persian].

5. Nikavar B, Majab F, Dolat abadii R. Constituents of the essential oil of thyme blooming branches daenensis. *Journal of herbs*. 2005; 4(13): 45-49 [In Persian].
6. Zargari A. dictionary of medical plant. *Culture of Medicinal Plants I*. First pirint. Tehran University Publications; 2009. 448-450.
7. Sodeifian G.H, Ansari K, Bamoniri A, Mirjalili B F. Study of chemical composition of the essential oil of ferulago angulata (schelcht) boiss. from iran using super-critical fluid extraction and nano scale injection. *Dig J Nanomater Biostruct*. 2011; 1:161-168.
8. Wonkeum S, Kyu M.L, Hee J.K, Dong H.S, Dong K.K. Microbiologic aspects of predominant bacteria from the burn patients in korea. *J Burns*. 2001; 27:140-144.
9. Forjuoh S.N. Burns in low- and middle-income countries: a review of available literature on descriptive epidemiology, risk factors, treatment, and prevention. *J Burns*. 2006; 21: 32- 52.
10. Hosseini S, Niknahad H, Fakhar N, Rezaianzadeh A, Mehrabani D. The healing effect of mixture of honey, putty, vitriol and olive oil in pseudomonas aeruginosa infected burns in experimental rat model. *JASCI*. 2011; 24:1-7.
11. Song W, Lee K.M, Kang H.J, Shin D.H, Kim D.K. Microbiologic aspects of predominant bacteria isolated from the burn patients in Korea. *J Burns*. 2001; 27: 136-139.
12. Japoni A, Farshad S, Alborzi A. Pseudomonas aeruginosa, Burn infection, Treatment and antibacterial resistance. *Iran Red Crescent*. 2009; 11:244-253.
13. Miyazaki S.H, Matsumoto T, Tateda K, Ohno A, Yamaguchi K. Role of exotoxin A in inducing severe Pseudomonas aeruginosa infections in mice. *Med Microbiol*. 1999; 43: 169 –75.
14. Hirakata Y, Furuya N, Tateda K, Kacu M, Yamaguchi K. In vivo production of exotoxin A and its role in endogenous Pseudomonas aeruginosa septicemia in mice. *Infect Immun*. 1989; 61(24): 68 – 73.
15. Atarpor yazdi M, Kamalinejad M, Felvahi kochak N, Mansouri S. Antimicrobial effect of extracts of Terminalia Catappa L. The bacteria isolated from burn wound infections and comparison with the effects of selected antibiotics. *Res J Med Aromat Plant*. 2010; 25(3): 386-397 [In Persian].
16. Pishva M. *Animal Laboratory*. First pirint. Tehran: sina Publishing; 1997. 8-40 [In Persian].
17. Naghmachi M, Sharifi A, Kohanteb J. Effect of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A bacterium in number of white blood cells in rats in comparison with patients with burns. *Armaghane-danesh* 2009; 13(3):73-80. Persian
18. Benli M, Guney K, Bingol U, Geven F, Yigit N. Antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. *J Biotechnol*. 2007; 6 (15): 1774 - 8.
19. Keyvanii amineh H, Ghasemiyan safaii H. Isolated from Pseudomonas aeruginosa exotoxin, Faculty of Veterinary Medicine. Tehran University. 2002; 3:1-10. Persian
20. Arshad N, Neubauer C, Hasnain S, Hess M. Peganum harmala Can Minimize Escherichia coli Infection in Poultry, but Long-Term Feeding May Induce Side Effects. *Poultry Science*. 2008; 87:240–249.
21. Taran M, Ghasempour H, Shirinpour E. Antimicrobial activity of essential oils of Ferulago angulata subsp. Carduchorum. *JJM*. 2010; 3(1): 10-14.