

اثر ضد میکروبی عصاره *Terminalia Catappa L.* بر باکتریهای جدا شده از عفونت زخم سوختگی و مقایسه آن با اثر آنتی بیوتیکهای منتخب

محمد مهدی عطارپور یزدی^{۱*}، محمد کمالی نژاد^۲، نسیم سادات فلوایی کوچک^۳ و صادق منصوری^۴

*- نویسنده مسئول، مربی، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

پست الکترونیک: mmayazdi@yahoo.com و attarpouryazdi@shahed.ac.ir

۲- مربی گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه شهید بهشتی

۳- دانش آموخته رشته دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی

۴- کارشناس، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۸

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۸۸

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۷

چکیده

زخم سوختگی محل مناسبی برای بروز عفونتهای مقاوم به درمان می باشد. بنابراین تحقیق در زمینه بدست آوردن داروهای مؤثر بر باکتریهای مولد این عفونت ضروری به نظر می رسد. هدف از انجام این مطالعه، شناسایی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی میوه گیاه گارم زنگی (*Terminalia Catappa L.*) بر باکتریهای جدا شده از عفونت زخم سوختگی و مقایسه آن با اثر آنتی بیوتیکهای منتخب برای هر باکتری بود. ابتدا عصاره متانولی میوه این گیاه تهیه شد و بعد فعالیت ضد باکتریایی آن بر علیه ۸ نوع باکتری جدا شده از عفونت زخم سوختگی ۱۰۰ بیمار ابتدا به روش انتشار در آگار (چاهک) در غلظت ۴۰ mg/ml و بعد رقت های متوالی در آگار در رقت های ۲۰-۳۹ mg/ml بررسی شد و MIC (Minimal Inhibitory Concentration) گیاه برای انواع حساس تعیین شد. اثر آنتی بیوتیکهای منتخب بر باکتریها نیز به روش دیسک بررسی شد. برای مقایسه اثر عصاره و آنتی بیوتیکها از آزمون Onava تک متغیره استفاده شد. نتایج بدست آمده از آزمایشها نشان داد که عصاره متانولی یاد شده، بر علیه ۱۰۰٪ از *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter spp.* بیش از ۸۰٪ از سه گونه *Staphylococcus* و ۵۰٪ از *Escherichia coli* بدست آمده از نمونه های بالینی با MIC=20mg/ml مؤثر است. این در حالی است که بیشتر نمونه ها به آنتی بیوتیکها مقاوم بودند. تفاوت اثر آنتی بیوتیک و گیاه برای *Pseudomonas aeruginosa* ($P<0/001$)، *Acinetobacter spp.* ($P<0/05$) و انواع *Staphylococcus* ($P<0/05$) معنی دار بود. این مطالعه نشان می دهد که عصاره متانولی *Terminalia Catappa* اثر ضد باکتریایی بسیار خوبی بر علیه اغلب باکتریهای مولد عفونت زخم سوختگی دارد. بنابراین می توان این عصاره را پس از مطالعاتی با طیف وسیعتر به صورت آزمایشگاهی و بالینی، به عنوان یک داروی ضد باکتریایی مورد توجه قرار داد.

واژه های کلیدی: *Terminalia Catappa L.*، عفونت زخم سوختگی، عصاره متانولی، ضد باکتریایی.

مقدمه

سوختگی، جراحی است که در آن پوست به وسیله عوامل گوناگون از جمله: حرارت، سرما، الکتریسیته و ... تخریب می شود (Brunocardia et al., 2005). در اغلب موارد، علاوه بر تخریب پوست، اختلالات سیستمیک نیز در بدن بوجود می آید (Brunocardia et al., 2005). ضایعه سوختگی باعث می شود تا پوست که به عنوان سد دفاعی بدن در مقابل ورود میکروبهاست از بین رود و سیستم ایمنی فرد دچار نقص شود (Unhwan & Shouguang, 1999). این وضعیت سبب می شود که بیماران دچار سوختگی، در معرض عفونتهای ناشی از باکتریهای مختلف قرار گیرند (Unhwan & Shouguang, 1999).

زخم سوختگی، محل مناسبی برای بروز عفونت است. بنابراین، عفونت زخم در این بیماران مکرراً رخ داده و یکی از دلایل مهم مرگ و میر آنها می باشد (Miri et al., 2005; Dale et al., 2004; Cakir & Yegen, 2004; Wonkeum et al., 2001). همچنین می توان گفت عفونت مهمترین عاملی است که باعث می شود زخم دیر بهبود یابد و مدت درمان طولانی شود (Miri et al., 2005). این عفونت هم به وسیله باکتریهای گرم مثبت و هم گرم منفی ایجاد می شود (Dale et al., 2004).

در دهه های اخیر، مقاومت به داروهای ضد میکروبی در باکتریهای ایجادکننده عفونت زخم سوختگی رو به افزایش است (Wonkeum et al., 2001). به طوری که حدود ۷۵٪ از موارد مرگ و میر را در بر می گیرد (Cakir & Yegen, 2004). باید دانست، باکتریهایی که باعث عفونت زخم سوختگی می شوند، نسبت به همان نوع از باکتریها در بیماریهای دیگر، مقاومت بیشتری به داروهای

ضد میکروبی نشان می دهند (Babayi et al., 2004). با توجه به این موارد، تحقیق و پژوهش در زمینه های مختلف از جمله: بیوتکنولوژی، فارماکوگنوزی، شیمی دارویی و ... در جهت کشف و تولید داروهای جدید و مؤثر بر عفونت سوختگی حائز اهمیت است.

در این تحقیق، اثر عصاره متانولی میوه گیاه *Terminalia catappa* بر باکتریهای جدا شده از زخم سوختگی بررسی شد. در ابتدا، یک مطالعه اولیه به منظور بررسی اثر ضد باکتری گارم زنگی بر روی چندین سوش استاندارد میکروبی که اغلب باعث عفونت زخم سوختگی می شوند، انجام شد. نتیجه، نشان دهنده اثر ضد باکتری آن بود. بعد از این گیاه بر روی نمونه های بالینی آزمایش شد.

Terminalia catappa، با نام فارسی گارم زنگی به خانواده Combretaceae (بادام هندی) تعلق دارد. این گیاه به طور وسیعی در مناطق گرم جهان از جمله کشورهای آسیای شرقی می روید (زرگری، ۱۳۶۷؛ مظفریان، ۱۳۸۳)، گیاه یاد شده بومی کشورهایی از جمله هند، مالزی، کامرون و ماداگاسکار است (زرگری، ۱۳۶۷؛ مظفریان، ۱۳۸۳؛ Noumi & Yomi, 2001). گارم زنگی، درختی بلند به ارتفاع ۲۵ متر با شاخه های افقی است (زرگری، ۱۳۶۷). میوه آن تخم مرغی شکل و پهن است و ۵ سانتی متر طول دارد (مظفریان، ۱۳۸۳). رنگ آن سبز یا قرمز می باشد و دو گوشه بالدار دارد؛ طعم میوه بین تلخ و شیرین بوده و حالت گس دارد (زرگری، ۱۳۶۷)؛ از برگ و پوست تنه این درخت، اثر ضد باکتری گزارش شده است (Prajapati et al., 2003; Ray et al., 2004; Duke et al., 2002; Babayi et al., 2004; Adam, 2003).

مواد و روشها

نمونه برداری و تعیین هویت میکروبی

در ابتدا، از عفونت زخم صد بیمار دچار جراحی سوختگی که در بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری تهران بستری بودند، به مرور زمان به صورت تصادفی به مدت یازده ماه نمونه برداری انجام شد و در هر مورد، نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی منتقل شده، بعد از تهیه کشت خالص با انجام آزمایشهای مستقیم و تستهای بیوشیمیایی لازم (Forbes *et al.*, 2007; Mahon *et al.*, 2007) نسبت به شناسایی و تعیین هویت آنها اقدام شد.

عصاره‌گیری

Terminlia catappa در جنوب ایران می‌روید. میوه گیاه مزبور خوراکی است و اواخر خردادماه کاملاً رسیده می‌شود. میوه این گیاه در اواخر خردادماه از بندرعباس جمع‌آوری شده و پس از انتقال به تهران در آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی شهید بهشتی مورد شناسایی قرار گرفت. لازم به تذکر است که *Terminalia catappa* با شماره هرباریومی ۱۵۸۰ در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی به ثبت رسیده است. قسمت اپی‌کارپ و مزوکارپ میوه‌ها جدا شده و برای عصاره‌گیری استفاده شد. روش عصاره‌گیری، ماسراسیون و با استفاده از حلال متانول مرک خالص و مدت زمان انجام این کار ۴۸ ساعت بود. عمل عصاره‌گیری ۳ بار انجام شد و در طول این مدت از همزن مغناطیسی به تناوب استفاده گردید. برای تیخیر حلال و تغلیظ عصاره از دستگاه Rotary evaporator استفاده شد. بدین ترتیب

از هر ۱۰۰ گرم ماده گیاهی، حدود ۶ گرم عصاره نیمه جامد بدست آمد.

آزمایشهای تعیین حساسیت میکروبی

همان طور که در بخش مقدمه به آن اشاره شد، برای بررسی اثر ضد میکروبی گارم زنگی، در ابتدا یک مطالعه اولیه بر روی سوش‌های استاندارد میکروبی که باعث عفونت زخم سوختگی می‌شوند انجام شد تا در صورت مؤثر بودن، اثربخشی آن بر نمونه‌های بالینی بررسی شود. سوش‌های استاندارد بکار رفته عبارت بودند از:

Staphylococcus epidermidis (PTCC 1114)
Staphylococcus aureus (ATCC 25923)
Staphylococcus saprophyticus (PTCC1440)
klebsiella pneumoniae (ATCC 700603)
Escherichia coli (ATCC 25922)
Enterobacter aerogenes (PTCC 1221)
Acinetobacter baumannii (PTCC 1318)
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

کلیه میکروارگانیسمها از مرکز پژوهشگاه علمی و صنعتی ایران تهیه شدند (جدول ۱).

برای بررسی حساسیت نمونه‌های استاندارد به عصاره و همچنین مطالعه اولیه بر روی نمونه‌های بالینی تعیین هویت شده از روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک (well diffusion) در محیط مولر هیتون استفاده شد. غلظت بکار رفته از عصاره در این مرحله ۴۰ mg/ml بود. بعد برای نمونه‌های بالینی که در این غلظت، هاله عدم رشد داشتند از روش رقت در آگار استفاده شد تا ضمن بررسی اثربخشی عصاره بر نمونه‌ها در رقت‌های پایین‌تر از ۴۰ mg/ml، MIC (Minimal Inhibitory Concentration) عصاره نیز برای انواع حساس بدست آید. در هر دو روش از آب مقطر استریل به‌عنوان حلال استفاده و نتایج بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری بررسی شد.

در نهایت به مقایسه فعالیت ضد میکروبی عصاره مورد آزمایش با آنتی‌بیوتیک‌های منتخب بر روی سویه‌های میکروبی جدا شده بالینی پرداخته شد.

نوع مطالعه و روشهای آماری

این پژوهش یک تحقیق توصیفی-تحلیلی از نوع غیر مداخله‌ای، غیر هم‌گروهی و مقطعی می‌باشد. به منظور بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیک‌ها و عصاره بر باکتریهای مورد مطالعه از آزمون Anova تک متغیره با کاربرد برنامه‌های آماری رایانه‌ای SPSS و SAS استفاده شد. لازم به تذکر است که هر مرحله از آزمایش ۳ بار تکرار شد.

نتایج

از عفونت زخم صد بیمار دچار جراحی سوختگی، انواع مختلفی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی بدست آمدند (جدول ۲) که عبارت بودند از:

Acinetobacter spp., *Pseudomonas aeruginosa*
Staphylococcus aureus, *Staphylococcus aureus*
Escherichia coli, *klebsiella spp.*, *epidermidis*
Staphylococcus saprophyticus و *Enterobacter spp.*
 درصد بروز گونه *Pseudomonas aeruginosa* از همه بیشتر بود. به طوری که ۴۱٪ (۴۱ نفر) از بیماران در زخم خود این باکتری را داشتند. *Acinetobacter spp.* از این نظر در رتبه دوم ۳۰٪ (۳۰ نفر) و *Staphylococcus aureus* در رتبه سوم ۲۶٪ (۲۶ نفر) قرار داشتند. درصد بروز باکتریهای خانواده انتروباکتریاسیه ناچیز بود. به طوری که میزان بروز *Escherichia coli* ۶٪ (۶ نفر)، *Klebsiella spp.* ۹٪ (۹ نفر) و *Enterobacter spp.* ۳٪ (۳ نفر) بود. کمترین درصد بروز مربوط به *Enterobacter spp.* ۳٪

در روش انتشار در آگار (چاهک) ابتدا حفره‌ای توسط پیپت پاستور در محیط مولر هیتون به قطر ۶mm ایجاد شد و پس از کشت سویه مورد نظر روی آن، ۵۰µl از محلول عصاره با غلظت ۴۰mg/ml که قبلاً تهیه شده بود درون حفره ریخته و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، قطر هاله عدم رشد میکروبی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

برای بررسی اثر عصاره در رقت‌های پایین‌تر از ۴۰mg/ml و همچنین تعیین MIC، با توجه به زیاد بودن نمونه‌ها، از روش رقت‌های متوالی در آگار (Agar serial Dilution) (Forbes et al., 2007) استفاده شد. در این روش ابتدا رقت‌های مختلفی از عصاره به ترتیب ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶، ۰/۰۷۸ و ۰/۰۳۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد و بعد با محیط کشت مناسب مخلوط شد و درون پلیت قرار گرفت. همچنین یک پلیت نیز که محتوی محیط کشت خالص بود به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بعد از هر سویه میکروبی به مقدار 10^6 (CFU/spot) به روی یازده پلیت تلقیح شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباتورگذاری، نتایج با توجه به رشد یا عدم رشد هر سویه میکروبی در رقت‌های مختلف، ثبت شدند. در مرحله آخر فعالیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌های منتخب (Kasper et al., 2005) شامل پنی‌سیلین، اگزاسیلین، وانکومایسین، سفنازیدیم، توبرامایسین، ایمپنم و آمیکاسین به روش انتشار در آگار با استفاده از دیسک (Kirby- Bauer Disk Diffusion) بر روی سویه‌های میکروبی مورد نظر بررسی و ثبت شد. کلیه دیسک‌ها از شرکت MAST بودند.

بر هیچ کدام از باکتریها مؤثر نبود و MIC (Minimal Inhibitory Concentration) آن برای همه انواع حساس 20 mg/ml بود (جدول ۲).

اثر آنتی‌بیوتیکهای پنی‌سیلین، اگزاسیلین و وانکومایسین بر انواع *Staphylococcus* بررسی شد. تقریباً همه انواع این باکتری به پنی‌سیلین مقاوم بودند. همچنین حدود ۵۰٪ از آنها به اگزاسیلین مقاومت نشان دادند ولی وانکومایسین بر بیشتر انواع آنها مؤثر بود. به طوری که بر ۲۳ مورد (۸۸/۵٪) انواع *Staphylococcus aureus* ۱۰ مورد (۹۰/۹٪) انواع *Staphylococcus epidermidis* و یک نمونه جدا شده *Staphylococcus saprophyticus* اثر داشت (جدول ۳). برای انواع *Pseudomonas aeruginosa* از سفتازیدیم و توبرامایسین استفاده شد. این آنتی‌بیوتیکها تقریباً بر همه انواع این باکتری بی‌اثر بودند (جدول ۴). برای باکتریهای خانواده انتروباکتریاسیه و *Acinetobacter spp.* از ایمی‌پنم و آمیکاسین استفاده شد. این آنتی‌بیوتیکها بر ۷ نمونه *Enterobacter spp.* (۷۷/۸٪)، ۲ مورد *klebsiella spp.* (۶۶/۷٪) و ۲۸ نمونه *Acinetobacter spp.* (۹۳/۳٪) بی‌اثر بودند ولی بر همه انواع *Escherichia coli* اثر داشتند (جدول ۵ و شکل ۱).

در بین انواع *Staphylococcus*، ۲۰ نمونه از آنها به اگزاسیلین مقاوم بودند. *Terminalia catappa* بر بیشتر این انواع اثر داشت. به طوری که بر ۱۱ مورد (۸۴/۶٪) از انواع *Staphylococcus aureus* مقاوم به اگزاسیلین و ۵ مورد (۸۳/۳٪) از انواع *Staphylococcus epidermidis* مقاوم به این آنتی‌بیوتیک مؤثر بود. تنها مورد جدا شده *Staphylococcus saprophyticus* هم به اگزاسیلین مقاوم و به *Terminalia catappa* حساس بود ().

(۳ نفر) و بعد *Staphylococcus saprophyticus* ۱٪ (انفر) بود. همچنین بسیاری از بیماران در زخم خود عفونت توأم داشتند (جدول ۲).

در بررسی اثر عصاره به روش چاهک در غلظت 40 mg/ml بر سوش‌های استاندارد و نمونه‌های بالینی، هاله مهار رشد برای همه نمونه‌ها دیده شد. در مورد سوش‌های استاندارد، بیشترین هاله مهار رشد مربوط به *Pseudomonas (35mm)*، *Acinetobacter (33mm)* و انواع *Staphylococcus (27mm)* بود. در مورد نمونه‌های بالینی هم وضعیت به همین صورت بود. به طوری که میانگین قطر هاله مهار رشد برای *Pseudomonas aeruginosa* برابر با $26/95 \text{ mm}$ ، *Acinetobacter spp.* برابر با $26/7 \text{ mm}$ و انواع *Staphylococcus* برابر با $20/6 \text{ mm}$ بود (جدول ۱).

در بررسی اثر *Terminalia catappa* بر نمونه‌های بالینی به روش رقت در آگار در رقت‌های پایین‌تر از 40 mg/ml ، مشاهده شد که عصاره در غلظت 20 mg/ml از رشد همه انواع *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter spp.* ۲۲ مورد (۸۴/۶٪) از انواع *Staphylococcus aureus* و ۹ مورد (۸۱/۸٪) از انواع *Staphylococcus epidermidis* جلوگیری می‌کند. از انواع *Staphylococcus saprophyticus* تنها یک مورد جدا شد که گیاه مورد نظر در این غلظت بر آن نیز اثر داشت. اما بیشتر باکتریهای خانواده انتروباکتریاسیه به این گیاه مقاوم بودند. به طوری که *Terminalia catappa* بر ۸ مورد (۸۸/۹٪) از انواع *klebsiella spp.* و ۲ مورد (۶۶/۷٪) از انواع *Enterobacter spp.* بی‌اثر بود. در مورد *Escherichia coli* نیز بر نیمی از انواع آن اثر نداشت. لازم به یادآوری است که گیاه از رقت 10 mg/ml به پایین

معنی دار بود، ولی تفاوت معنی داری در اثر وانکومایسین با عصاره ($P > 0/05$) مشاهده نشد. در مورد انواع *Pseudomonas aeruginosa* تفاوت اثر آنتی بیوتیکهای سفنازیدیم و توبرامایسین با عصاره ($P < 0/001$) معنی دار بود. در مورد انواع *Escherichia coli* و *Acinetobacter spp.* اختلاف معنی داری بین اثر آنتی بیوتیکهای ایمپنم و آمیکاسین با عصاره ($P < 0/05$) مشاهده شد. در حالی که تفاوت اثر این آنتی بیوتیکها با عصاره ($P > 0/05$) برای انواع *Klebsiella spp.* و *Enterobacter spp.* معنی دار نبود.

همچنین ۴ نمونه از انواع *Staphylococcus aureus* به وانکومایسین مقاوم بودند که گیاه مورد نظر بر بیشتر آنها مؤثر بود. به طوری که بر ۲ مورد ($6/67\%$) از انواع *Staphylococcus aureus* مقاوم به وانکومایسین اثر داشت. تنها یک مورد *Staphylococcus epidermidis* مقاوم به وانکومایسین مشاهده شد که آن هم به *Terminalia catappa* حساس بود (جدول ۶). در مقایسه حساسیت نمونه‌ها به آنتی بیوتیکها و عصاره گیاهی، تفاوت اثر پنی سیلین با عصاره ($P < 0/001$) و آگراسیلین با عصاره ($P < 0/05$) بر انواع *Staphylococcus*

جدول ۱- فعالیت ضد میکروبی عصاره *Terminalia catappa* به روش چاهک در غلظت 40 mg/ml بر

سوش‌های استاندارد و نمونه‌های بالینی

قطر هاله مهار رشد ^۱	نوع میکروارگانیسم
۲۷	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
۲۶	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (PTCC 1114)
۲۷	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (PTCC 1440)
۳۵	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
۳۳	<i>Acinetobacter baumannii</i> (PTCC 1318)
۱۲	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
۸	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)
۷	<i>Enterobacter aerogenes</i> (PTCC 1221)
$\bar{X}^* = 20/69 \pm (1/59)^{**}$	<i>Staphylococcus aureus</i>
$\bar{X} = 20/63 \pm (1/43)$	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
۲۳	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
$\bar{X} = 26/95 \pm (1/67)$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
$\bar{X} = 26/7 \pm (1/44)$	<i>Acinetobacter spp.</i>
$\bar{X} = 11/5 \pm (1/87)$	<i>Escherichia coli</i>
$\bar{X} = 9/11 \pm (1/61)$	<i>Klebsiella spp.</i>
$\bar{X} = 7/66 \pm (0/57)$	<i>Enterobacter spp.</i>

۱- قطر هاله مهار رشد بر حسب mm می‌باشد.

** میانگین قطر هاله مهار رشد

** انحراف معیار

جدول ۲- باکتریهای جدا شده از زخم سوختگی ۱۰۰ بیمار، توزیع فراوانی نسبی و مطلق آنها در رابطه با اثر *Terminalia catappa* بر آنها و میانگین MIC گیاه برای انواع حساس

SD (انحراف معیار)	میانگین MIC** گیاه برای انواع حساس بر حسب mg/ml	اثر <i>Terminalia catappa</i> ^۱				تعداد و درصد افرادی که در زخم خود دارای میکروب مورد نظر بودند*		باکتریهای مورد مطالعه
		مقاوم ^۲		حساس ^۲		تعداد	درصد	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۰	۲۰	۲۲	۸۴/۶	۴	۱۵/۴	۲۶	۲۶	<i>Staphylococcus aureus</i>
۰	۲۰	۹	۸۱/۸	۲	۱۸/۲	۱۱	۱۱	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
۰	۲۰	۱	۱۰۰	۰	۰	۱	۱	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
۰	۲۰	۳	۵۰	۳	۵۰	۶	۶	<i>Escherichia coli</i>
۰	۲۰	۱	۱۱/۱	۸	۸۸/۹	۹	۹	<i>Klebsiella spp.</i>
۰	۲۰	۱	۳۳/۳	۲	۶۶/۷	۳	۳	<i>Enterobacter spp.</i>
۰	۲۰	۴۱	۱۰۰	۰	۰	۴۱	۴۱	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
۰	۲۰	۳۰	۱۰۰	۰	۰	۳۰	۳۰	<i>Acinetobacter spp.</i>

۱- اثر گیاه با روش رقت در آگار در رقت‌های ۰/۰۳۹-۲۰ mg/ml بررسی شده است.

۲- موارد مقاوم و حساس با توجه به رشد یا عدم رشد باکتری در رقت‌های بکار رفته ثبت شده‌اند.

*: تعداد کل بیماران بیش از ۱۰۰ نفر است، زیرا بعضی از بیماران در زخم خود عفونت توأم داشته‌اند.

Minimal Inhibitory Concentration = MIC**

جدول ۳- توزیع فراوانی نسبی و مطلق انواع *Staphylococcus* مورد مطالعه در رابطه با اثر

پنی سیلین، اگزاسیلین و وانکومایسین بر آنها

وانکومایسین		اگزاسیلین		پنی سیلین		میکروارگانیزمهای مورد مطالعه	
حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم		
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد		
۲۳	۱۱/۵	۳	۵۰	۱۳	۵۰	۲۵	<i>Staphylococcus aureus</i>
۱۰	۹/۱	۱	۴۵/۵	۵	۵۴/۵	۱۱	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
۱	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۱	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

جدول ۴- توزیع فراوانی نسبی و مطلق *Pseudomonas aeruginosa* های مورد مطالعه در رابطه با اثر

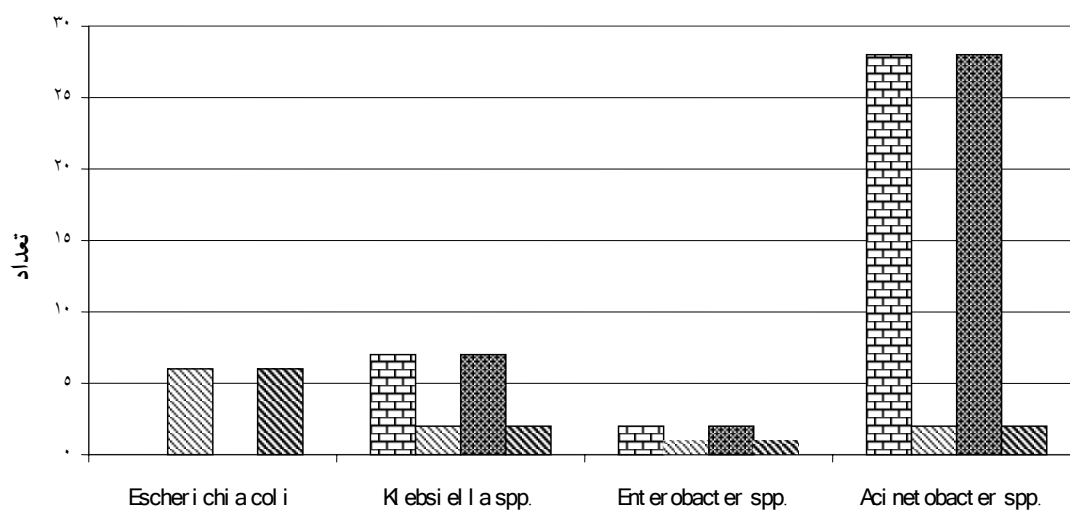
سفتازیدیم و توبرامایسین بر آنها

توبرامایسین		سفتازیدیم		باکتری مورد مطالعه
حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	
تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۱	۹۷/۶	۴۰	۰	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

جدول ۵- توزیع فراوانی نسبی و مطلق تعدادی از باکتریهای مورد مطالعه در رابطه با

اثر ایمی پنم و آمیکاسین بر آنها

آمیکاسین		ایمی پنم		ایمی پنم		آمیکاسین		میکروارگانیزمهای مورد مطالعه
مقاوم		حساس		مقاوم		حساس		
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۶	۰	۰	۰	۶	۱۰۰	۰	۰	<i>Escherichia coli</i>
۲	۷۷/۸	۷	۲۲/۲	۲	۷۷/۸	۲	۲۲/۲	<i>Klebsiella spp.</i>
۱	۶۶/۷	۲	۳۳/۳	۱	۶۶/۷	۲	۳۳/۳	<i>Enterobacter spp.</i>
۲	۹۳/۳	۲۸	۶/۷	۲	۹۳/۳	۲۸	۶/۷	<i>Acinetobacter spp.</i>



اثر آنتی بیوتیکها بر باکتریها

resistant (ایمی پنم)
 sensitive (ایمی پنم)
 resistant (آمیکاسین)
 sensitive (آمیکاسین)

شکل ۱- توزیع فراوانی تعدادی از باکتریهای مورد مطالعه در رابطه با اثر ایمی پنم و آمیکاسین بر آنها

بحث

در این پژوهش نیز وجود دارند. همچنین گزارش شده که درصد بروز عفونت توأم نیز بالا می باشد (Kamel & EL-Pirmary *et al.*, 2005; Megaeed, 1997; Bowler *et al.*, 2001; Wonkeum *et al.*, 2001; Sengupta *et al.*, 2001; رضایی و همکاران، ۱۳۸۲).

در این مطالعه، انواع مختلفی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی از زخم بیماران جدا شدند. در بسیاری از موارد عفونت توأم مشاهده شد. مطالعات دیگران نیز نشان می دهد که باکتریهای متعددی مسئول ایجاد عفونت زخم سوختگی هستند که در میان آنها باکتریهای بدست آمده

جدول ۶- توزیع فراوانی نسبی و مطلق انواع *Staphylococcus* مقاوم به آگزامپیلین (مقاوم به متی‌سیلین) و *Staphylococcus* های مقاوم به وانکومایسین در رابطه با اثر *Terminalia catappa* بر آنها

اثر <i>Terminalia catappa</i> بر انواع <i>Staphylococcus</i> مقاوم به وانکومایسین		اثر <i>Terminalia catappa</i> بر انواع <i>Staphylococcus</i> مقاوم به آگزامپیلین		میکروارگانیزمهای مورد مطالعه				
حساس		مقاوم		حساس		مقاوم		
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۶۶/۶	۲	۳۳/۴	۱	۸۴/۶	۱۱	۱۵/۳	۲	<i>Staphylococcus aureus</i>
۱۰۰	۱	۰	۰	۸۳/۳	۵	۱۶/۷	۱	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
				۱۰۰	۱	۰	۰	<i>Staphylococcus saprophyticus*</i>

*، تنها نمونه *Staphylococcus saprophyticus* به وانکومایسین حساس بود.

به متی‌سیلین بودند. حتی چندین مورد مقاوم به وانکومایسین هم در بین آنها مشاهده شد. انواع *Pseudomonas aeruginosa* همگی مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای سفتازیدیم و توبرامایسین بودند. آنتی‌بیوتیکهای ایمپنم و آمیکاسین نیز بر تعداد زیادی از انواع *Acinetobacter spp.*، *Klebsiella spp.* و *Enterobacter spp.* بی‌اثر بودند و تنها انواع *Escherichia coli* به این دو دارو حساسیت نشان دادند. با توجه به این موارد، می‌توان گفت میزان مقاومت میکروبی در بین این باکتریها در حد بالایی بود که این نتایج توسط محققان دیگری نیز گرفته شده است (Pirnary et al., 2003؛ Wonkeum et al., 2001)؛ بهار و همکاران، (۱۳۸۲)

در مطالعه حاضر که اثر عصاره متانولی میوه *Terminalia catappa* (قسمت اپی‌کارپ و مزوکارپ میوه) بر نمونه‌های جدا شده مطالعه شد، بررسی نتایج نشان داد که این گیاه بر بیشتر آنها مؤثر است. به طوری که همهٔ انواع *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter spp.* به آن حساس بودند. از طرفی بیشتر

در بین باکتریهای بدست آمده، میزان بروز *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter spp.* از بقیه بیشتر بود. *Pseudomonas aeruginosa* از این نظر در رتبهٔ نخست قرار داشت. این موضوع با نتایج بسیاری از تحقیقات مشابهت دارد (رضایی و همکاران، ۱۳۸۲؛ Kamel & EL-Megeed et al., 2001؛ Wonkeum et al., 1997). از طرفی گزارشهای مختلف بیانگر این مطلب است که میزان فراوانی انواع *Staphylococcus aureus* در زخم سوختگی زیاد است (Kamel & EL-Megeed, 1997؛ Wonkeum et al., 2001). در بین نمونه‌های جدا شده، میزان بروز انواع باکتریهای خانواده انتروباکتریاسیه کم بود که این امر مشابه نتایج تعدادی از تحقیقات (رضایی و همکاران، ۱۳۸۲؛ Kamel & EL-Megeed et al., 2001؛ Wonkeum et al., 1997) می‌باشد.

در این پژوهش، اغلب آنتی‌بیوتیکهای منتخب بر باکتریها بی‌اثر بودند. انواع *Staphylococcus aureus* همگی به پنی‌سیلین مقاومت نشان دادند. همچنین ۵۰٪ از آنها مقاوم

Escherichia coli اثر نداشت (Babayi et al., 2004). گزارشهای دیگری نیز وجود دارد مبنی بر اینکه عصاره‌های متیلن کلرایدی و کلروفرمی *Terminalia catappa* اثر ضد باکتریایی از خود نشان داده‌اند (Ray et al., 2004).

بنابراین از آنجایی که بر طبق این تحقیق، *Terminalia catappa* بر باکتریهای شایع مولد عفونت زخم سوختگی (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*) و *Staphylococcus aureus*) مؤثر است، می‌توان نتیجه گرفت که به‌طور کلی بر این عفونت مؤثر می‌باشد و باتوجه به مقاومت روزافزون باکتریهای مولد این عفونت به آنتی‌بیوتیکها که در این پژوهش و مطالعات دیگران مشاهده شده است، ضروری به نظر می‌رسد که بررسیهایی به صورت *in vivo* در زمینه اثرهای درمانی این گیاه انجام شود. همچنین می‌توان اثرهای آن را در عفونت‌های دیگر ایجاد شده بوسیله این باکتریها امتحان کرد.

منابع مورد استفاده

- بهار، م.ع، رضایی، ع. و رهبر، پ.، ۱۳۸۲. مقایسه باکتریهای جدا شده از کشت زخم بیماران سوخته و بررسی حساسیتهای دارویی آنها در سالهای ۸۱-۸۰-۷۹-۷۸-۱۶۵-۱۵۸، در: انصاری، ح.، (تدوین)، سوختگی. انتشارات عبادی‌فر، تهران، ۳۲۷ صفحه.
- رضایی، ک.، رفیعی، ع.، جوادی، ط. و طراحی، م. ج.، ۱۳۸۲. تعیین بروز عفونت در سوختگی به روش کشت بافت. ۱۸۷-۱۸۱، در: انصاری، ح.، (تدوین)، سوختگی. انتشارات عبادی‌فر، تهران، ۳۲۷ صفحه.
- زرگری، ع.، ۱۳۶۷. گیاهان دارویی. جلد دوم، مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران، ۹۴۲ صفحه.
- مظفریان، و.، ۱۳۸۳. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، ۱۰۰۳ صفحه.

انواع *Staphylococcus* به آن حساسیت نشان دادند و این موضوع در گونه‌های مختلف این باکتری یکسان بود. حتی بیشتر انواع مقاوم به متی‌سیلین و مقاوم به وانکومایسین به این گیاه حساس بودند و این نکته حائز اهمیت است. اما این گیاه بر باکتریهای خانواده انتروباکتریاسیه، اثر چندانی نداشت و تنها در مورد *Escherichia coli* بر نیمی از انواع این باکتری مؤثر بود.

در این بررسی با توجه به آزمون آماری، فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاهی و وانکومایسین تقریباً یکسان بود و هر دو اثر خوبی بر انواع *Staphylococcus* داشتند. اما حساسیت این باکتریها به گیاه بسیار بیشتر از پنی‌سیلین و آگراسیلین بود. همچنین اثر بازدارندگی *Terminalia catappa* بر انواع *Pseudomonas aeruginosa* بسیار بیشتر از آنتی‌بیوتیکهای سفنازیدیم و توبرامایسین بود. انواع *Acinetobacter spp.* نیز حساسیت خوبی به عصاره گیاهی از خود نشان دادند، در حالی که بیشتر آنها به آنتی‌بیوتیکهای ایمی‌پنم و آمیکاسین مقاوم بودند. انواع *Klebsiella spp.* و *Enterobacter spp.* هم به گیاه و هم به آنتی‌بیوتیکهای منتخب (ایمی‌پنم و آمیکاسین) تقریباً مقاوم بودند. تنها در مورد انواع *Escherichia coli* حساسیت آنها به آنتی‌بیوتیکها (ایمی‌پنم و آمیکاسین) بسیار بیشتر از عصاره گیاهی بود.

در مطالعات دیگران، گزارشهایی وجود دارد مبنی بر اینکه برگ این گیاه خاصیت ضد باکتری دارد. مثلاً در تحقیقی اثر عصاره متانولی برگ *Terminalia catappa* بر چندین سوش استاندارد و بالینی امتحان شد. نتیجه نشان داد که عصاره برگ این گیاه بر انواع *Staphylococcus* (هم بالینی و هم استاندارد) مؤثر است. از طرفی این عصاره بر سوش‌های استاندارد *Pseudomonas* و

- Mahon, C.R., Lehman, D.C. and Manuselis, G., 2007. Textbook of Diagnostic microbiology. Saunders Elsevier, Missouri, 1211p.
- Miri, M.R., Hemmati, H. and Shahraki, S., 2005. Comparison of efficacy of Honey versus silver sulfadiazine and acetate mafenid in the treatment of contaminated bum wounds in piggies. Pakistan Journal medicine Science, 21(2): 168-173.
- Noumi, E. and Yomi, A., 2001. medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo Region, Central province, Cameroon. Fitotrapia, 72: 246-254.
- Pirnary, J.P., Vos, D.D., Cochez, C., Bilocq, F., Pirson, J., Struelens, M., Duinslaeger, L., Comelies, P., Zizi, M. and Vanderkelen, A., 2003. Molecular Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa colonization in Burn unit: Persistence of a Multidrug- Resistant clone and a silver sulfadiazine-Resistant clone. Journal of Clinical Microbiology, 41(3):1192-1202.
- Prajapati, N.D., Purohit, S.S., Sharma, A.K. and Kumar, T., 2003. A Handbook of Medicinal Plants. Agrobios, India, 554p.
- Ray, A.B., Sarma, B.K. and Singh, U.P., 2004. Medicinal properties of plants: Antifungal, Antimicrobial and Antiviral activities. IBDS, 536p.
- Sengupta, S., kumar, P., Ciraj, A.M. and Shivanada, P.G., 2001. Acinetobacter baumannii- An emerging nosocomial pathogen in the burns unit Manipal, India. Burns, 27:140-144.
- Unkhwan, H. and Shouguang, J., 1999. Expression of the soxR Gene of Pseudomonas aeruginosa Is Inducible during Infection of Burn wounds in mice and Is Required to cause Efficient Bacteremia. Infection and Immunity, 67(10): 5324-5331.
- Wonkeum, S., Kyu, M.L., Hee, J.K., Dong, H.S. and Dong, K.K., 2001. Microbiologic aspects of predominant bacteria from the bum patients in korea. Burns, 27:140-144.
- Adam, S., 2003. Terminalia catappa problems of breeding solved. Uk Discus Association (ukdiscus.Co.Uk/ t. catappa. Htm), Author- www.puncharddiscus.co.uk
- Babayi, H., Kolo, I., Okagun, J.I. and Ijan, u.J.J., 2004. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic micro organisms. BIOKEMISTRI, 16(2): 106-111.
- Bowler, P.G., Duerden, B.I. and Armstrong, D.G., 2001. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. Clinical Microbiology Reviews, 14(2): 244-269.
- Brunocardia, F.C., Andersen, D.K., Billiar, T.R., Dunn, D.L., Hunter, J.G. and Pollock, R.E., 2005. Schwartz's PRINCIPLES OF SURGERY. McGraw-Hill Inc, New York, Chicago, 1950p.
- Cakir, B. and Yegen, B.C., 2004. Systemic Responses to burn injury. Turkey Journal medicine Science, 34: 215-226.
- Dale, K.M.R., Schnell, G. and Wong, P.J., 2004. Therapeutic Efficacy of "Nubiotics" against Burn wound Infection by Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and chemotherapy, 48(8): 2918-2923.
- Davis, K.A., Moran, C.K., McAllister, C.K. And Gray, P.G., 2005. multidrug- resistant Acinetobacter Extremity infections in soldiers. Emerging infectious diseases, Available from <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/Vol11no08/05-0105htm>.
- Duke, J.A., Bogenschutz-Godwin, M.J., Duceillier, J. and Duke, P-AK., 2002. Handbook of Medicinal Herbs. CRC press, Boca, Raton, London, 870p.
- Forbes, B.A., Sahn, D.F. and Weissfeld, A.S., 2007. BaLley & SCOTT's Diagnostic Microbiology. Mosby Inc, Baltimore, 1031p.
- Kamel, A.H. and EL-Megeed, E.A., 1997. The role of aztreonam in the control of gram negative burn wound infection. Annals of Burns and fire Disaster, 10(1):1-7.
- Kasper, D.L., Braunwaid, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.I. and Jameson, J.L., 2005. HARRISON'S PRINCIPLES of Internal Medicine. McGraw- Hill Inc, New York, Chicago, 2607p.

Antibacterial activity of *Terminalia catappa* L. extract against bacteria isolated from burn wounds and comparison with effects of selective antibiotics *in vitro*

M.M. Attarpour Yazdi^{1*}, M. Kamalinejad², N.S. Falvaei Koochak³ and S. Mansouri⁴

1*- Corresponding author, Microbiology Department, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

E-mail: mmayazdi@yahoo.com, attarpouryazdi@shahed.ac.ir

2- Pharmacognosy Department, Faculty of Pharmacy, Shaheed Beheshti University, Tehran, Iran

3- Azad University, Tehran, Iran

4- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

Received: March 2009

Revised: April 2009

Accepted: April 2009

Abstract

Burn wound is suitable site for incidence of resistant infections. Thus, the research for finding effective drugs against this problem is necessary. Medicinal herbs with antimicrobial activity have important role in traditional medicine. The purpose of this study was to determine antibacterial activity of methanolic extract of *Terminalia catappa* L. fruit against bacteria isolated from burn wound infections and to compare with effects of some selected antibiotics. First, a sample of methanolic extract of the *Terminalia catappa* fruit was prepared and then its antibacterial activity against 8 bacteria from 100 samples of burn wound infection were evaluated by well diffusion method at concentration of 40 mg/ml and then Agar Serial Dilution method in the range of 0.039-20mg/ml. Also, the MIC (Minimal Inhibitory Concentration) of extract was determined. The antibacterial activity of selective antibiotics was tested by disk diffusion method. The onava test was used to compare the results. The results from the antibacterial tests demonstrated that the *Terminalia catappa* methanolic extract had been effected against all of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* and more than 80% of *Staphylococcus aureus/epidermidis/saprophyticus*, and against 50% of *Escherichia coli*. The MIC of the extract against all the sensitive cases was 20 mg/ml. The bacteria were often resistant to selective drugs. There was significant difference between the effects of plant and antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* ($P<0/001$), *Acinetobacter spp.* ($P<0/05$) and *Staphylococcus* cases ($P<0/05$). This study demonstrated that methanolic extract of *Terminalia catappa* have excellent antibacterial activity against most of bacteria isolated from burn wound infections and its effect is better than selective antibiotics. However, we need more *in vitro* and *in vivo* investigation.

Key words: *Terminalia catappa* L., Burn wound infection, Methanolic extract, Antibacterial.