



بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره خام برگ گیاه حرا بر روی سویه‌های استاندارد و بالینی *Acinetobacter baumannii* در شرایط In-vitro

مهدی محمودپور (MD)^{۱*}، اعظم عسکری (MSc)^۲، فروغ یوسفی (PhD)^{۲**}

^۱ مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر،

بوشهر، ایران

^۲ گروه میکروشناسی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۷/۱۲/۲۲ - پذیرش مقاله: ۹۸/۲/۱۵)

چکیده

زمینه: *اسیتوباکتر بومانی* *Acinetobacter baumannii* یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از عوامل عفونت بیمارستانی است. متأسفانه بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری مسبب مشکلات جدی مانند عدم موفقیت درمان و افزایش بروز مرگ و میر در بیماران می‌باشد. گیاهان مانگرو و بخصوص گیاه حرا *Avicennia marina* منبع زیستی بالقوه‌ای برای ترکیبات دارویی جدید می‌باشند به گونه‌ای که در طب سنتی برای درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف این مطالعه تعیین اثر ضد باکتریایی عصاره خام برگ گیاه حرا بر روی سویه مرجع و بالینی *اسیتوباکتر بومانی* در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه برگ گیاه حرا در هوای آزاد و در سایه خشک شده و سپس به صورت پودر درآمد. از این پودر عصاره گلیسرینه با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد و اثر ضد باکتریایی آن بر سویه مرجع *اسیتوباکتر بومانی* و همچنین سویه بالینی مقاوم به کاربایتم با روش انتشار از چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) آن تعیین گردید.

یافته‌ها در این بررسی در روش انتشار از چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره برگ حرا بر هر ۶ سویه مورد بررسی مؤثر بوده و تأثیری قابل مقایسه با کنترل مثبت نشان داد. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره برگ حرا بر همه سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* مورد استفاده در این مطالعه ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی برگ گیاه حرا بر سویه مرجع *اسیتوباکتر بومانی* ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در این مطالعه مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره برگ حرا، سویه بالینی مقاوم به سفیم بود.

نتیجه‌گیری: عصاره برگ گیاه حرا دارای اثر ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای بر روی سویه مرجع *اسیتوباکتر بومانی* و همچنین سویه‌های بالینی مقاوم به کاربایتم بود.

واژگان کلیدی: *اویسنیا مارینا*، *اسیتوباکتر بومانی*، فعالیت ضد میکروبی، حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی

** بوشهر، گروه میکروشناسی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

مقدمه

اسیتوباکترها باسیل‌های گرم منفی هوازی، بدون حرکت و اکسیداز منفی هستند که منابع طبیعی آن‌ها هنوز به طور کامل مشخص نشده است (۱).

اسیتوباکترها بی‌شک یکی از موفق‌ترین پاتوژن‌ها در سیستم‌های بهداشتی مدرن به حساب می‌آیند (۲). شیوع اسیتوباکترها، با توجه به افزایش انواع روش‌های جراحی، استفاده از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و وجود میزبان‌های مبتلا به ضعف ایمنی، در اکثر بیمارستان‌ها افزایش یافته است. وجود قابلیت‌های ژنتیکی منحصر به فرد در این ارگانیسم که منجر به تولید فاکتورهای دخیل در بروز مقاومت آن‌ها نسبت به محیط‌های خشن شده است و نیز ایجاد اپیدمی‌های گسترده و شیوع آن در سراسر جهان بدلیل قابلیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی چند دارویی (۲)، سبب شده است که این ارگانیسم در طی دو دهه اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار بگیرد.

ابتلا به اسیتوباکترهایی با مقاومت چند دارویی به فاکتورهای مختلفی نظیر آلودگی‌های محیطی و تماس با مراقبین سیستم‌های بهداشتی و درمانی که دارای کلونیزاسیون این ارگانیسم هستند، وابسته است (۳). همچنین فاکتورهای غیر وابسته‌ای که منجر به ابتلا به بعضی گونه‌های اسیتوباکتر می‌شوند شامل بستری در بیمارستان‌های با حجم تخت بالای ۵۰۰، درمان‌های اخیر آنتی‌بیوتیکی، اعمال جراحی بر روی سیستم ادراری تناسلی (۴) و بستری قبلی در بخش مراقبت‌های ویژه می‌باشد (۵).

از آنجایی که آنتی‌بیوتیک‌های اندکی بر روی این ارگانیسم‌ها اثربخشی دارند و نیز به دلیل افزایش احتمال بروز انواع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید با قابلیت کشندگی بالا و با کمترین احتمال بروز مقاومت میکروبی، ضروری است.

دریا به عنوان یک منبع عظیم دربردارنده انواع موجودات و ترکیبات فعال زیستی با توانایی‌های متنوع و شگفت‌انگیز، می‌تواند سرمنشأ و الهام‌بخش انواع تحقیقات بالینی در زمینه تشخیص و درمان بیماری‌ها به حساب آید. نتایج امیدبخش بسیاری از تحقیقات اخیر در زمینه‌های زیست فناوری و استخراج انواع ترکیبات فعال با قابلیت‌های ضد میکروبی، ضدسرطانی و ترمیمی، خود اثبات کننده این ادعاست.

گیاهان مانگرو که مجموعه‌ای از گیاهان شورپسند و مقاوم به نمک دریا بوده و در قالب جنگل‌های بین جزر و مدی دریایی به صورت پراکنده در بعضی نقاط دنیا شکل گرفته‌اند، دارای انواع ترکیبات شیمیایی و بیولوژیکی می‌باشند. گیاه حرا *Avicennia marina* از جمله گونه‌های غالب این اکوسیستم به شمار می‌رود.

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر ضد میکروبی عصاره حاصل از گیاه حرا، بر روی اسیتوباکترهای مرجع و نمونه‌های بالینی جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهدای خلیج فارس و معرفی این عصاره به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی بر ضد اسیتوباکترهای بیمارستانی است.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری و آماده‌سازی عصاره برگ گیاه حرا
در این مطالعه مقطعی برگ‌های گیاه حرا در زمستان سال ۱۳۹۶ از ناحیه "مله گنزه" در سواحل شمالی استان بوشهر که در محدوده منطقه حفاظت شده "مند" قرار دارد، جمع‌آوری، خشک و به صورت پودر درآمد. برای تهیه عصاره ۲۲ گرم پودر حاصل در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول گلیسرین ۲۰ درصد ریخته شده و پس از جذب کامل، حجم نهایی اندازه‌گیری شد. پس از آن مخلوط حاصل حرارت داده شده تا به نقطه جوش رسیده و به

مدت ۲۰ دقیقه در نقطه جوش باقی بماند. سپس عصاره‌ها از کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) عبور داده شده و در نهایت به منظور یکنواخت‌سازی بیشتر، محلول به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول حاصل اتوکلاو شده سپس عصاره بدست آمده با غلظت نهایی ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در میکروتیوب‌های استریل ۲ میلی‌لیتری تقسیم و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

ب) سویه‌های باکتریایی مورد بررسی

در این طرح از سویه مرجع *اسیتوباکتر بومانی* ATCC 19606 و همچنین ۵ سویه بالینی *اسیتوباکتر بومانی* با نام‌های *T1, T2, T3, T4* و *T5* که از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهدای خلیج فارس بوشهر جدا شده بودند، استفاده شد.

ج) تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی*

پس از تأیید نهایی سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی، حساسیت سویه‌های باکتریایی با استفاده از روش آگار دیسک دیفیوژن طبق دستورالعمل مؤسسه مرجع آزمایشگاهی و بالینی CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (۶) بر روی محیط مولر هیتون آگار (Merk, Germany) تعیین شد. در این مطالعه از کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی شامل: آموکسی سیلین، کلانولان، پپراسیلین - تازوباکتام، سفنازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفپیم، آمیکاسین، جتتامیسین، توبرامیسین، سیپروفلوکساسین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، ایمپنم، مروپنم و کولیستین (Mast, UK) استفاده گردید.

د) تعیین فعالیت ضدباکتریایی عصاره برگ *اویسنیا*

مارینا به روش انتشار از چاهک

در این روش ابتدا از سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* مورد نظر سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند (CFU/ml) $10^8 \times 1/5$ تهیه گردید سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر سویه بر روی محیط مولر هیتون آگار با سواب استریل به صورت سفره‌ای کشت داده شد. با استفاده از پی‌پت استریل چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر بر روی آگار ایجاد شده و میزان ۷۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره در هر چاهک ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و قطر هاله عدم رشد اطراف هر چاهک تعیین گردید. در این بررسی از آنتی‌بیوتیک آمیکاسین به عنوان کنترل مثبت و گلیسیرین ۲۰ درصد (حلال عصاره) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

ه) غربالگری فعالیت ضدباکتریایی عصاره برگ گیاه

اویسنیا مارینا

سویه‌های مرجع و بالینی *اسیتوباکتر بومانی* در محیط مایع مولر هیتون (Merk, Germany) در مجاورت عصاره گیاه *اویسنیا مارینا* قرار گرفتند و میزان رشد باکتری بر اساس Colony forming unit (CFU)/ml (واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر) محاسبه گردید و با میزان رشد باکتری در لوله کنترل فاقد عصاره مورد مقایسه قرار گرفت.

ی) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل

غلظت کشندگی عصاره برگ *اویسنیا مارینا*

حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum (MIC) inhibitory concentration) و حداقل غلظت

حداقل غلظت کشندگی عصاره (MBC) در نظر گرفته شد. تمام مراحل فوق با ۳ بار تکرار انجام گردید.

یافته‌ها

الف) تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های

اسیتوباکتر بومانی مورد بررسی

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اسیتوباکتر بومانی مرجع ATCC 19606 و سویه‌های بالینی T1 تا T5 در جدول ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه همه سویه‌های مورد بررسی نسبت به کولیستین حساس بودند. سویه‌های بالینی T2، T3، T4 و T5 به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد ارزیابی از جمله کاربامپنم‌ها مقاوم بودند و همچنین همه آن‌ها نسبت به سفپیم نیمه حساس بودند. در مقابل سویه T1 نسبت به کاربامپنم‌ها حساس ولی به سفپیم مقاوم بود. سویه مرجع اسیتوباکتر بومانی ATCC 19606 نسبت به سفتریاکسون و تری‌متوپریم سولفامتوکسازول مقاوم، نسبت به سفنازیدم، سفوتاکسیم، سفپیم و جنتامایسین نیمه حساس و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود (جدول ۱).

کشندگی (Minimum bactericidal (MBC) concentration) عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر روی سویه مرجع ATCC 19606 و ۵ سویه بالینی اسیتوباکتر بومانی به روش براث ماکرودایلوشن طبق دستورالعمل مؤسسه مرجع آزمایشگاهی و بالینی انجام شد. برای تعیین MIC، میزان CFU/ml $10^5 \times 5$ از هر سویه مورد بررسی در محیط مایع مولر هیتون ۲X در مجاورت رقت‌های دو برابر از عصاره قرار گرفت. در این بررسی کنترل مثبت (باکتری + حلال عصاره + محیط مایع مولر هیتون ۲X) و کنترل منفی (عصاره + محیط مایع مولر هیتون ۲X) نیز افزوده شد. لوله در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شده و نتایج پس از ۲۴ ساعت خوانده شد. اولین لوله از غلظت‌های پایین عصاره‌ها که فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بودند به عنوان حداقل غلظت مهارکننده (MIC) در نظر گرفته شد. حداقل غلظت کشندگی عصاره (MBC) از طریق کشت مجدد ۱۰۰ میکرولیتر از لوله‌های مورد آزمایش بدون کدورت بر روی محیط جامد مولر هیتون تعیین گردید. پس از ۱۸-۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، حداقل غلظتی از عصاره که موجب مهار ۹۹/۹ درصد رشد سویه‌های باکتری‌های مورد آزمایش شد به عنوان

جدول ۱) الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های اسیتوباکتر بومانی مورد استفاده در این مطالعه

SXT	CIP	MEM	IPM	TZP	TOB	GEN	AMK	FEP	CTX	CRO	CAZ	AMC	CST	Code
R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	T1
R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	T2
R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	T3
R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	T4
R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	T5
R	S	S	S	S	S	I	S	I	I	R	I	S	S	ATCC 19606

SXT: تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول، CIP: سیپروفلوکسازین، MEM: مروپنم، IPM: ایمپنم، TZP: پپراسیلین-تازوباکتام، TOB: توپرامایسین، GEN: جنتامایسین، AMK: آمیکاسین، FEP: سفپیم، CTX: سفوتاکسیم، CRO: سفتریاکسون، CAZ: سفنازیدم، AMC: آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید، CST: کولیستین، R: مقاوم، I: نیمه مقاوم، S: حساس.

ب) تعیین فعالیت ضد باکتریایی عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* به روش انتشار از چاهک

نتایج به دست آمده از فعالیت ضدباکتریایی عصاره برگ حرا بر سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. میزان ۷۰ میکرولیتر از عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر سویه T2،

T5 و سویه مرجع با زون مهار رشد به ترتیب ۱۲/۷۸ میلی‌متر، ۱۳/۰۸ میلی‌متر و ۱۳/۰۶ میلی‌متر مؤثر بود. در مقابل میزان ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بر هر ۶ سویه مورد بررسی مؤثر بوده و تأثیری قابل مقایسه با کنترل مثبت نشان داد. بیشترین زون مهار رشد در سویه مرجع با ۱۳/۲۶ میلی‌متر و کمترین در سویه T3 با ۱۲/۰۵ میلی‌متر مشاهده گردید (جدول ۲).

جدول ۲) الگوی حساسیت عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی*

ATCC 19606	T5	T4	T3	T2	T1	C-	C+	Strains Extract
۱۳/۰۶±۰/۰۷	۱۳/۰۸±۰/۰۵	-	-	۱۲/۷۸±۰/۱	-	-	۱۳/۰۱±۰/۰۱	۷۰ میلی‌لیتر
۱۳/۲۶±۰/۰۱	۱۳/۱۳±۰/۰۲	۱۲/۱۴±۰/۰۷	۱۲/۰۵±۰/۰۱	۱۳/۱±۰/۰۱	۱۳/۲۳±۰/۰۸	-	۱۳/۲۱±۰/۰۱	۱۰۰ میلی‌لیتر

نتیجه به صورت میانگین زون مهارتی ± انحراف استاندارد در سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است. کنترل مثبت: آمیکاسین، کنترل منفی: گلیسرین ۲۰ درصد

ج) غربالگری اثر ضدباکتریایی عصاره برگ گیاه *اویسنیا مارینا*

بر اساس نتایج به دست آمده از غربالگری در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیچ‌کدام از سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* مورد بررسی رشد نکردند.

د) تعیین MIC و MBC عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر روی سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی*

حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر همه سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* مورد استفاده در این مطالعه ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی برگ *اویسنیا مارینا* بر سویه مرجع *اسیتوباکتر بومانی* ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که در این غلظت ۳۵۹ کلونی در هر میلی‌لیتر شمارش گردید که با توجه به تعداد اولیه باکتری، این غلظت موجب مهار رشد ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها گردیده است، در نتیجه غلظت مذکور به عنوان MBC در نظر گرفته

شد و در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیچ رشدی مشاهده نگردید. حداقل غلظت کشندگی برگ *اویسنیا مارینا* بر سویه‌های بالینی مقاوم به کاربایتم T4 و T5 برابر با ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که در این غلظت هیچ رشدی مشاهده نگردید. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره، تعداد ۵۵۴ کلونی از سویه T2 و تعداد ۲۷۹ کلونی از سویه T3 بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار رشد کرد ولی از آنجا که غلظت مذکور موجب مهار ۹۹/۹ درصد رشد شده است. به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره برگ *اویسنیا مارینا*، سویه بالینی T1 مقاوم به سفیم بود که در ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر که بیشترین غلظت مورد استفاده در این مطالعه بود تعداد کلونی‌های ایجاد شده غیر قابل شمارش بود (جدول ۳).

جدول ۳) تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) برگ اویسنیا مارینا بر سویه‌های اسیتوباکتر بومانی					
Strain code	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	
T1	MIC	C	C	T	
	MBC	TNTC	TNTC	TNTC	
T2	MIC	C	C	T	
	MBC	۵۵۴	TNTC	TNTC	
T3	MIC	C	C	T	
	MBC	۲۷۹	TNTC	TNTC	
T4	MIC	C	C	T	
	MBC	NG	NG	TNTC	
T5	MIC	C	C	T	
	MBC	NG	NG	TNTC	
ATCC 19606	MIC	C	C	T	
	MBC	NG	NG	۳۵۹	

MBC به صورت واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی لیتر تعیین شده است. T: کدر (رشد قابل مشاهده)، C: شفاف (فاقد رشد قابل مشاهده)، TNTC: غیر قابل شمارش، NG: فاقد رشد.

بحث

گزارشات از خاصیت ضد میکروبی گیاهان مانگرو از قسمت‌های مختلف دنیا در حال افزایش می‌باشد، به ویژه در دهه اخیر گیاهان مانگرو برای شناسایی ترکیبات فعال مورد غربالگری قرار گرفته‌اند و مشخص شده است که این گیاهان یک منبع زیستی بالقوه از ترکیبات داروهای جدید می‌باشند. تاکنون بیش از ۲۰۰ متابولیت فعال از گیاهان مانگرو مانند *اویسنیا مارینا* در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیری جدا شده است (۷). گیاهان مانگرو در طب سنتی برای درمان بیماری‌های زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرند همچنین فعالیت ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدقارچی گیاهان مانگرو تأیید شده است (۸). افزایش روز افزون مقاومت در *اسیتوباکتر بومانی* یکی از چالش‌های درمان این باکتری می‌باشد.

مطالعات زیادی در ارتباط با بروز مقاومت‌های مختلف دارویی در ارتباط با گونه‌های *اسیتوباکتر* جدا شده از بیماران وجود دارد. در اکثر این موارد گونه غالب *اسیتوباکتر بومانی* بوده است (۹). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که در اروپا، آمریکای شمالی، آرژانتین، برزیل، چین، هنگ‌کنگ، تایوان، ژاپن، کره و مناطقی از قسمت‌های جنوبی اقیانوس آرام *اسیتوباکتر بومانی* جدا

شده از بیماران، دارای مقاومت میکروبی چند دارویی بوده است (۱۰).

در یک مطالعه مروری سیستماتیک که توسط مرادی و همکاران بر روی گزارشات مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه *اسیتوباکتر بومانی* جدا شده از مراکز درمانی مختلف در ایران انجام شده است مشخص شد که روند مقاومت چند دارویی در گونه‌های جدا شده *اسیتوباکتر* در ایران در حال افزایش بوده و تبدیل به یک معضل درمانی شده است (۱۱).

با توجه به اینکه یکی از راه‌های مقابله با پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده از داروهای گیاهی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها است، در مطالعه حاضر فعالیت ضدباکتریایی عصاره گلیسیرینه برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بر سویه‌های بالینی مقاوم به سفپیم، سویه‌های بالینی مقاوم به کارباینم و همچنین سویه مرجع *اسیتوباکتر بومانی* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۴ سویه بالینی T2، T3، T4 و T5 مقاوم به کارباینم بودند که آن‌ها نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بجز کلیستین مقاوم بودند و سویه بالینی T1 نسبت به سفپیم نیمه حساس، نسبت به کلیستین، ایمپنم و مروپنم حساس و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی

مقاوم بود. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره گلیسیرینه برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بر سویه مرجع *اسیتوباکتر بومانی* و همچنین سویه‌های بالینی *اسیتوباکتر بومانی* ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بررسی حداقل غلظت کشندگی عصاره گلیسیرینه برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بر سویه مرجع ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، بر سویه‌های T4 و T5 مقاوم به کاربایتم ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بر سویه‌های T3 و T4 مقاوم به کاربایتم ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در غربالگری غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره بر سویه T1 مؤثر بود و هیچ رشدی مشاهده نشد ولی از آنجا که حداکثر غلظت مورد استفاده در تعیین MBC، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، متأسفانه این غلظت نتوانست از رشد ۹۹/۹ درصد سویه بالینی T1 جلوگیری کند.

تمیزهاراسان (Thamizharasan) و همکاران اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی برگ *اویسنیا مارینا* با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را بر *سودوموناس ایروژینوزا* را با روش آگار دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که میزان $100 \mu\text{l}$ / *اویسنیا مارینا* اثر ضدباکتریایی بیشتری در مقایسه با تتراسایکلین بر *سودوموناس ایروژینوزا* داشت و هاله عدم رشد آن‌ها به ترتیب ۲۱ و ۱۴ میلی‌متر گزارش شد (۱۲).

نتایج حاصل از مطالعه دوی (Devi) و همکاران نشان دادند که غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره متانولی *اویسنیا مارینا* به ترتیب بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه*، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس ایروژینوزا* مؤثر بوده است، قابل ذکر است که غلظت مورد استفاده آن‌ها ۱۰ برابر مطالعه حاضر بود (۱۳).

در تحقیقی که توسط شریف محمد و همکاران انجام شد، اثر ضدباکتری عصاره‌های اتانولی، متانولی، اتیل استات و

استونی گیاه *اویسنیا مارینا* بر پروتئوس و لگاریس و *اتروباکتر کلواکه* مورد ارزیابی قرار گرفت. از بین عصاره‌ها فقط عصاره متانولی دارای اثر ضدباکتریایی قابل مقایسه با جنتامایسن (کنترل مثبت) بود.

نتایج حاصل از مطالعات محققان نشان می‌دهد که مؤثرترین نوع عصاره مورد استفاده آن‌ها، عصاره متانولی بوده است. تنها مطالعه‌ای که در آن از عصاره گلیسیرینه برگ گیاه *اویسنیا مارینا* استفاده شده است، مطالعه تاج‌بخش و همکاران می‌باشد که بر روی سویه‌های گرم منفی مرجع *اشریشیاکلی* و *سودوموناس ایروژینوزا* انجام شده است (۱۴). حداقل غلظت کشندگی عصاره گلیسیرینه بر *اشریشیاکلی* و *سودوموناس ایروژینوزا* به ترتیب ۱۵/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۳۳/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که در غلظت‌های مذکور به ترتیب 2×10^2 واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر و ۸۰ واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر مشاهده گردید که موجب مهار ۹۹/۹ درصد رشد گردیده بود. در حالی که در مطالعه حاضر حداقل غلظت کشندگی بر سویه مرجع *اسیتوباکتر بومانی* ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که نسبت به غلظت مؤثر بر *سودوموناس ایروژینوزا* کمتر می‌باشد. متأسفانه مطالعات زیادی بر روی سویه بالینی *اسیتوباکتر بومانی* مقاوم به دارو انجام نشده است و در محدود مطالعات انجام شده نیز نتایج رضایت‌بخشی به دست نیامده است چنانچه در مطالعه قاسمی و همکاران اثر گیاه شنگ (*Tragopogon graminifolius*) بر سویه *اسیتوباکتر بومانی* مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره آبی گیاه شنگ اثر بسیار ضعیف و عصاره الکلی آن فاقد اثر ضدباکتریایی بر علیه *اسیتوباکتر بومانی* بود (۱۵).

مقاوم بود. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره گلیسیرینه برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بر سویه مرجع *اسیتوباکتر بومانی* و همچنین سویه‌های بالینی *اسیتوباکتر بومانی* ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بررسی حداقل غلظت کشندگی عصاره گلیسیرینه برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بر سویه مرجع ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، بر سویه‌های T4 و T5 مقاوم به کاربایتم ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بر سویه‌های T3 و T4 مقاوم به کاربایتم ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در غربالگری غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره بر سویه T1 مؤثر بود و هیچ رشدی مشاهده نشد ولی از آنجا که حداکثر غلظت مورد استفاده در تعیین MBC، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، متأسفانه این غلظت نتوانست از رشد ۹۹/۹ درصد سویه بالینی T1 جلوگیری کند.

تمیزهاراسان (Thamizharasan) و همکاران اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی برگ *اویسنیا مارینا* با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را بر *سودوموناس ایروژینوزا* را با روش آگار دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که میزان $100 \mu\text{l}$ / *اویسنیا مارینا* اثر ضدباکتریایی بیشتری در مقایسه با تتراسایکلین بر *سودوموناس ایروژینوزا* داشت و هاله عدم رشد آن‌ها به ترتیب ۲۱ و ۱۴ میلی‌متر گزارش شد (۱۲).

نتایج حاصل از مطالعه دوی (Devi) و همکاران نشان دادند که غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره متانولی *اویسنیا مارینا* به ترتیب بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه*، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس ایروژینوزا* مؤثر بوده است، قابل ذکر است که غلظت مورد استفاده آن‌ها ۱۰ برابر مطالعه حاضر بود (۱۳).

در تحقیقی که توسط شریف محمد و همکاران انجام شد، اثر ضدباکتری عصاره‌های اتانولی، متانولی، اتیل استات و

نتیجه گیری

مطالعه حاضر اولین ارزیابی اثر ضدباکتریایی برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بومی ایران بر سویه بالینی *اسیتوباکتر بومانی* مقاوم به کاربایم می باشد و نتایج حاصله نشان داد که عصاره گلیرینه این گیاه اثر ضدباکتریایی قابل توجهی بر سویه های بالینی *اسیتوباکتر بومانی* مقاوم به کاربایم دارد. در فاز بعدی مطالعه با استفاده از انواع روش های خالص سازی و با استفاده از حلال های مختلف، این عصاره خام خالص سازی شده و امید است بر اساس روش های شناسایی ترکیبات به یک یا چند ترکیب مؤثر با خاصیت

ضدمیکروبی بر ضدسویه های *اسیتوباکتر بومانی* استاندارد و بیمارستانی، دست پیدا شود.

سپاس و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر به خاطر تأمین مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می شود.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. Nordmann P. *Acinetobacter Baumannii*, the Nosocomial Pathogen Par Excellence. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 6(52): 301-3.
2. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter Baumannii*: from Bench to Bed-side. *World J Clin Cases* 2014; 2(12): 787.
3. Simor AE, Lee M, Vearncombe M, et al. An Outbreak Due to Multiresistant *Acinetobacter Baumannii* in a Burn Unit: Risk Factors for Acquisition and Management. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23(5): 261-7.
4. Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Fernández-Cuenca F, et al. Risk-Factors for the Acquisition of Imipenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii* in Spain: a Nationwide Study. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(11): 874-9.
5. Lee SO, Kim NJ, Choi SH, et al. Risk Factors for Acquisition of Imipenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii*: A Case-Control Study. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 224-8.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087. USA: 2018; 42-44.
7. Saad S, Taher M, Susanti D, et al. In Vitro Antimicrobial Activity of Mangrove Plant *Sonneratia Alba*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(6): 427-9.
8. Ravikumar S, Gnanadesigan M, Suganthi P, et al. Antibacterial Potential of Chosen Mangrove Plants Against Isolated Urinary Tract Infectious Bacterial Pathogens. *Int J Med Med Sci* 2010; 2(3): 94-9.
9. Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* Outbreaks, 1977–2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24(4): 284-95.
10. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(10): 3471-84.
11. Moradi J, Hashemi FB, Bahador A. Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baumannii* in Iran: A Systemic Review of the Published Literature. *Osong Public Health Res Perspect* 2015; 6(2): 79-86.
12. Thamizharasan S, Saravanan NA. Antibacterial Potential of Mangrove Plant *Avicennia Marina* Against a Clinical Pathogen. *Int J Zool Sci* 2016; 1: 14-16.
13. Devi AS, Rajkumar J. In Vitro Antibacterial Activity and Stability of *Avicennia Marina* Against Urinary Tract Infection Pathogens At

- Different Parameters. Pak J Biol Sci 2013; 16(19): 1034-9.
14. Ghasemi M, Habibi R, Sedighi M, et al. In-vitro Investigating of Antibacterial Effect of Tragopogon Graminifolius DC Hydroalcoholic Extracts on Acinetobacter Baumannii. Iran J Infect Dis Trop Med 2017; 22(78): 41-5. (Persian)
15. Tajbakhsh S, Mahmoodpour M, Haghghi MA. Antibacterial Activity of Avicennia Marina Leaves Extract on Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Pseudomonas Aeruginosa. Iran South Med J 2005; 8(1): 1-7. (Persian)

Original Article

Antibacterial Effect Leaf Extract of *Avicennia marina* on Standard and Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*

M. Mahmudpour (MD)^{1*}, A. Askari (MSc)², F. Yousefi (PhD)^{2**}

¹ The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

² Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 13 Mar, 2019

Accepted 5 May, 2019)

Abstract

Background: *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen and a nosocomial infection agent. Antibiotic resistance in this organism results in serious health problem such as treatment failure and increased mortality. Mangrove plants, especially *Avicennia marina*, are a potential bioresource for new drugs as they have been used in traditional medicine. This study aimed to investigate antibacterial effects of *A. marina* leaf extract on standard and clinical stains of *A. baumannii* *in vitro*.

Materials and Methods: *A. marina* leaves were dried in outdoor shade and ground. Then glycerin extract was provided at a concentration of 200 µg/ml and its antibacterial properties were assessed on standard strain and carbapenem-resistant clinical isolates of *A. baumannii* using agar well diffusion method. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were determined.

Results: *A. marina* leaf extract had a significant antibacterial effect on all 6 strains at a concentration of 100 µL in agar well diffusion method. MIC_s were 25µg/ml in all strains. MBC_s were 12.5µg/ml in standard strains. The most resistant strain against the extract was cefepime-resistant clinical strain.

Conclusion: *A. marina* leaf crude extract had significant antibacterial effects on standard and carbapenem-resistant clinical isolates of *A. baumannii*.

Keywords: *Avicennia marina*, *Acinetobacter baumannii*, antibacterial effect, MIC, MBC.

©Iran South Med J. All right reserved

Cite this article as: Mahmudpour M, Askari A, Yousefi F. Antibacterial Effect Leaf Extract of *Avicennia marina* on Standard and Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*. *Iran South Med J* 2019;22(3):150-159

Copyright © 2019 Mahmudpour, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

**Address for correspondence: Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran, Email: Forough.y@gmail.com

*ORCID: 0000-0002-9764-3322

**ORCID: 0000-0001-9342-4686

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>