



اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا (*Avicennia marina*) بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس پایوژنز و پseudomonas آئروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی

بهروز عزیزاده‌به‌بهانی^{۱*}، فریده طباطبایی‌یزدی^۱، فخری شهیدی^۱، محبت محبی^۱

^۱ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(دریافت مقاله: ۹۱/۱۲/۲- پذیرش مقاله: ۹۲/۱/۲۰)

چکیده

زمینه: گیاه حرا با نام علمی *Avicennia marina* (Forssk) Vierh متعلق به خانواده آکانتاسه، به صورت گسترده در طب سنتی جهت درمان رماتیسم و زخم‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است. با توجه به وجود ترکیبات زیستی فعال موجود در گیاه حرا، به نظر می‌رسد این گیاه دارای اثرات ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای باشد. هدف از این پژوهش ارزیابی اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس PTCC 1435، استرپتوکوکوس پایوژنز PTCC 1447 و پseudomonas آئروژینوزا PTCC 1310 در شرایط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش‌ها: اثر ضد میکروبی عصاره به دو روش پخش عصاره در سطح محیط کشت و انتشار در آگار (دیسک) مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از برنامه آنالیز واریانس (ANOVA) انجام شد.

یافته‌ها: در روش انتشار در آگار همه غلظت‌های عصاره اتانولی بر استرپتوکوکوس پایوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس اثر بازدارندگی داشت. در روش پخش عصاره در سطح محیط کشت عصاره آبی اثر ضد میکروبی بر پseudomonas آئروژینوزا نشان نداد. MIC عصاره آبی و اتانولی برای پseudomonas آئروژینوزا به ترتیب ۶۴ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر و MBC عصاره آبی و اتانولی نیز در خصوص پseudomonas آئروژینوزا به ترتیب ۶۴ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

نتیجه‌گیری: پseudomonas آئروژینوزا بیشترین مقاومت را به عصاره‌های آبی و اتانولی نشان داد. عصاره اتانولی برگ گیاه حرا در شرایط آزمایشگاهی دارای اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر پseudomonas آئروژینوزا به عنوان باکتری گرم منفی و استرپتوکوکوس پایوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان باکتری‌های گرم مثبت نشان داد.

واژگان کلیدی: گیاه حرا، عصاره آبی، عصاره اتانولی، اثر ضد میکروبی

*مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی طی قرن‌های متمادی تنها منبع درمان بیماری‌ها بوده، و امروزه نیز علی‌رغم پیشرفت علوم و توسعه کاربرد داروهای صنایع هنوز این گیاهان به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱).

یکی از مهم‌ترین چالش‌های درمانی، مقابله با عوامل بیماری‌های عفونی و مسمومیت‌ها به‌دلیل شیوع و گسترش بالای آن می‌باشد. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش مقاومت دارویی در بیشتر باکتری‌ها گردیده است. بنابراین یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید با کم‌ترین اثرات جانبی امری مهم و ضروری به‌نظر می‌رسد (۲).

بنابر گزارش سازمان بهداشت جهانی بیش از ۸۰ درصد مردم جهان (نزدیک به ۵ میلیارد نفر) برای درمان بیماری‌ها هنوز از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند. تقریباً یک چهارم داروهای تهیه شده در دنیا دارای منشأ گیاهی هستند که یا مستقیماً از گیاهان عصاره‌گیری شده‌اند و یا براساس ترکیب گیاهی، سنتز گردیده‌اند (۳).

مطالعات نشان می‌دهد که تمایل زیاد، به استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان عفونت‌ها به‌دلیل عوارض پایین‌تر این داروهای طبیعی، نسبت به داروهای شیمیایی است (۴). در کنار این روند رو به افزایش، کمبود اطلاعات دارویی و درمانی در گروه بزرگی از فراورده‌های طب گیاهی، مشکلی بزرگ می‌باشد (۵).

گیاه حرا به‌عنوان یکی از غالب‌ترین گونه‌های گیاهی اکوسیستم مانگرو دارای توانایی‌های بالقوه‌ای می‌باشد. گیاهان مانگرو که مجموعه‌ای از گیاهان شورپسند و مقاوم به نمک دریا بوده و در قالب جنگل‌های جزر و مدی دریایی به‌صورت پراکنده در برخی نقاط دنیا

شکل گرفته‌اند، دارای انواع ترکیبات شیمیایی و زیستی می‌باشند (۶).

پوشش انبوه گیاه حرا با داشتن تاریخچه طولانی از اثرات درمانی و کاربرد در طب سنتی در نواحی حاشیه‌ی خلیج فارس ایران همچون بندر دیر، بلوچستان، بندر خمیر، جزیره قشم، لافت و بندر گوادر بسیار ارزشمند و بررسی هر چه بیشتر ویژگی‌های بالقوه گیاه حرا از ارزش بالایی برخوردار است (۷).

تاکنون تنها برخی از ترکیبات گیاه حرا که ویژگی ضد میکروبی دارند مشخص شده است از جمله این ترکیبات می‌توان به زانتون‌ها اشاره نمود (۸).

زانتون‌ها از جمله مواد بسیار فعال موجود در این گیاهان می‌باشند. این ترکیبات دارای ویژگی‌هایی مانند سایتوتوکسیسیته، ضدتوموری، ضدالتهابی، ضد میکروبی، افزایش فعالیت کولین استیل ترانسفراز و مهار آنزیم لیپید پراکسیداز می‌باشد (۸). شالکون‌ها نیز از جمله ترکیبات فلاونوئیدی در گیاهان مانگرو به حساب می‌آیند، در مطالعه‌ای که ساتو (Sato) و همکاران روی این ترکیب انجام دادند مشخص شد که از این ترکیب می‌توان جهت درمان استوماتیت‌های باکتریایی استفاده نمود (۹).

باکتری‌ها عمومی‌ترین عامل در ارتباط با مسمومیت‌ها و عفونت‌ها می‌باشند. بیشتر عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی توسط *پسودوموناس آئروژینوزا*، *استرپتوکوکوس پایوژنز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* اتفاق می‌افتد. فانرژیت (گلودرد چرکی)، زرد زخم، باد سرخ، سلولیت، فاسیت نکروزان (قانقاریا) از بیماری‌های مهمی هستند که توسط *استرپتوکوکوس پایوژنز* ایجاد می‌شوند. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* یکی از علل

عفونت‌های فرصت طلب می‌باشد و هم اکنون نیز از اهمیت زیادی برخوردار است (۱۰).

پسودوموناس *آئروژینوزا* سبب عفونت‌های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، التهاب و آماس پوست، عفونت‌های بافت‌های نرم، باکتری (وجود باکتری در خون) عفونت‌های استخوان و مفاصل، عفونت‌های معده و روده‌ای و عفونت‌های سیستمیک گوناگون به‌ویژه در بیماران با سوختگی‌های شدید، بیماران دچار به سرطان و ایدز که سیستم ایمنی آن‌ها سرکوب شده‌است، می‌نماید (۱۰).

بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا علیه برخی از میکروارگانیسم‌های عامل بیماری‌های عفونی و مسمومیت بوده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش آزمایشگاهی در فاصله آبان‌ماه ۱۳۹۱ تا بهمن‌ماه ۱۳۹۱ در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی و فناوری‌های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. سوبه‌های میکروبی توسط دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد اهدا گردید. برگ‌های تازه گیاه حرا در شهریورماه ۱۳۹۱ از جزیره قشم جمع‌آوری شد، سپس نمونه برگ‌ها با همکاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی شد. در پایان برگ‌های حرا در شرایط مناسب (سایه) خشک گردید و جهت تهیه عصاره با آسیاب مدل Waring پودر شد.

برای تهیه عصاره از روش خیساندن استفاده گردید. به این صورت که مقدار ۵۰ گرم از پودر برگ گیاه حرا را به ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه یا آب مقطر به آن اضافه

شد. برای تهیه عصاره اتانولی مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و هر چند ساعت یکبار با یک میله شیشه‌ای به هم زده شد. مخلوط آبی نیز به مدت ۲۰ دقیقه با شعله حرارت دید تا مایع کرم رنگی به دست آمد. مایع‌رویی پس از جمع‌آوری با ۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس از صافی ۰/۴۵ میکرونی عبور داده و در ادامه از دستگاه روتاری (تقطیر در خلأ) جهت حذف حلال استفاده شد، در پایان و به منظور جلوگیری از اثر نور و گرما در ظروفی استریل با پوشش ورق آلومینیوم تا زمان آزمایش در دمای یخچال نگهداری گردید (۱۱ و ۱۲).

برای تعیین وزن خشک عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا ابتدا وزن یک لوله آزمایش تعیین و پس از آن ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی و اتانولی در آن ریخته شد، سپس محتوی لوله در دمای اتاق خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره، وزن لوله آزمایش مجدداً تعیین شد. اختلاف وزن لوله معادل با وزن ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی یا اتانولی بود. میانگین سه بار تکرار، به‌عنوان وزن خشک عصاره محاسبه گردید (۱۲).

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت تازه از هر میکروارگانیسم بود. بنابراین ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیبدار نوترینت آگار تلقیح انجام شد، سپس کشت مربوطه توسط محلول رینگر شستشو و سوسپانسیون میکروبی تهیه گردید. مقداری از این سوسپانسیون میکروبی در لوله آزمایش حاوی محلول رینگر استریل ریخته شد و کدورت آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق شد. سوسپانسیون تولیدی باید حاوی $1/5 \times 10^8$ کلونی بر میلی‌لیتر باکتری باشد (۱۳).

فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا با استفاده از دو روش پخش عصاره در سطح محیط کشت (تمام ظرف) و روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی شد. در روش تمام ظرف ۰/۲ گرم از عصاره آبی و اتانولی به ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و برای یکنواخت شدن به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. سپس ۱ میلی لیتر از این محلول به ظرف های پتری استریل اضافه و غلظت نهایی عصاره در این حالت به ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر می رسد (۱۴).

در مرحله بعد محیط کشت استریل مولر هیتتون آگار (مرک آلمان) به ظرف های پتری اضافه شد و در دمای اتاق قرار گرفت تا اینکه محیط کشت ها ببندند. یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. از محیط دارای عصاره و بدون باکتری نیز به عنوان کنترل استفاده گردید (۱۴). در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط ها کشت داده شد سپس دیسک های کاغذی (جنس صافی واتمن و به قطر ۶ میلی متر) با غلظت های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ها در آب مقطر استریل تهیه و با عصاره حرا آغشته گشت و توسط پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شد و با کمی فشار بر روی محیط کشت ثابت گردید. بعد از گرم خانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی با استفاده از خط کش به طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. تمامی آزمایش ها با ۳ تکرار انجام گرفت (۱۵).

با استفاده از روش رقت لوله ای، حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا تعیین گردید. برای تعیین MIC برای هر عصاره از یک سری ۷ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۶ لوله

برای آزمایش رقت های مختلف هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنترل به کار رفت. پس از کشت تمام لوله های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری گردیدند. پس از طی زمان گرم خانه گذاری لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، این روش برای هر دو عصاره آبی و اتانولی و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد (۱۶).

حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش رقت لوله ای برای عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا تعیین گردید. برای تعیین MBC برای هر عصاره از یک سری ۷ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۶ لوله برای آزمایش رقت های مختلف از هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنترل به کار رفت. پس از کشت تمام لوله های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. پس از طی زمان گرم خانه گذاری لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، از تمام لوله های که هیچ رشدی در آنها مشاهده نشده بود نمونه برداری و جهت تعیین MBC کشت داده شدند. لوله ای که دارای کم ترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد. این روش برای هر دو عصاره آبی و اتانولی و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار گردید (۱۷).

برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری SPSS (USA, Il, Chicago, SPSS Inc) ویرایش ۱۷ استفاده شد، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) جهت مقایسه میانگین ها و از آزمون Tukey جهت بررسی اختلاف بین میانگین ها در سطح ($P < 0.05$) استفاده گردید.

یافته‌ها

یافته‌های بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی به‌روش پخش عصاره در سطح محیط کشت (تمام ظرف) در جدول ۱، آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره اتانولی در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر *استرپتوکوکوس پایونز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* کاملاً مؤثر بود و از رشد آن‌ها بر روی محیط کشت جلوگیری به‌عمل آورد، اما عصاره آبی هیچ اثر بازدارندگی را نشان نداد. عصاره اتانولی و آبی در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر *پسودوموناس آئروژینوزا* تأثیر نداشت و از رشد آن بر محیط کشت جلوگیری به‌عمل نیاورد.

جدول ۱) اثر ضد میکروبی غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا بر *استرپتوکوکوس پایونز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* (روش تمام ظرف)

میکروارگانیزم	عصاره آبی برگ گیاه حرا
<i>استرپتوکوکوس پایونز</i> PTCC 1447	-
<i>استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس</i> PTCC 1435	-
<i>پسودوموناس آئروژینوزا</i> PTCC 1310	-
میکروارگانیزم	عصاره اتانولی برگ گیاه حرا
<i>استرپتوکوکوس پایونز</i> PTCC 1447	+
<i>استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس</i> PTCC 1435	+
<i>پسودوموناس آئروژینوزا</i> PTCC 1310	-

علامت (+) نشان‌دهنده عدم رشد میکروارگانیزم بر محیط کشت و وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ گیاه حرا می‌باشد. علامت (-) نشان‌دهنده رشد میکروارگانیزم بر محیط کشت و عدم وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا می‌باشد.

یافته‌های بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا به‌روش انتشار در آگار در جدول ۲، آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره اتانولی برگ گیاه حرا در تمامی غلظت‌ها (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) *استرپتوکوکوس پایونز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* اثر بازدارندگی داشت. عصاره آبی برگ

گیاه حرا در غلظت‌های (۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر *استرپتوکوکوس پایونز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مؤثر بود و از رشد این باکتری‌ها جلوگیری کرد، اما در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر بازدارندگی مشاهده نشد. عصاره آبی برگ گیاه حرا در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر ضد باکتریایی بر *پسودوموناس آئروژینوزا* نشان داد و در سایر غلظت‌ها هیچ اثر بازدارندگی مشاهده نشد.

غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی برگ گیاه حرا قادر به جلوگیری از رشد باکتری نبود، و تنها غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی از رشد آن جلوگیری نمود.

نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا در جدول ۳، آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد MIC عصاره اتانولی برگ گیاه حرا برای *استرپتوکوکوس پایونز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب ۸، ۸ و ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که MIC عصاره آبی برای *استرپتوکوکوس پایونز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب ۱۶، ۱۶ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا در جدول ۴، آورده شده است.

نتایج نشان می‌دهد MBC عصاره اتانولی برگ گیاه حرا برای *استرپتوکوکوس پایونز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب ۱۶، ۱۶ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که MBC عصاره آبی برای *استرپتوکوکوس پایونز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس*

آئروژینوزا به ترتیب ۳۲، ۳۲ و ۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

جدول ۲) میانگین قطر هاله عدم رشد / استرپتوکوکوس پایوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و پseudomonas آئروژینوزا بر حسب میلی متر در حضور عصاره های اتانولی و آبی برگ گیاه حرا (انتشار در آگار)

غلظت عصاره برگ گیاه حرا (میلی گرم بر میلی لیتر)					
نوع عصاره	میکروارگانیسم	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰
اتانولی	استرپتوکوکوس پایوژنز	۷/۸۰±۰/۵۷ ^a	۹/۲۰±۰/۵۰ ^b	۱۱/۴۰±۰/۵۰ ^c	۱۳/۹۰±۰/۵۲ ^d
اتانولی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۷/۳۰±۰/۲۸ ^a	۸/۹۰±۰/۵۷ ^b	۱۰/۶۰±۰/۵۳ ^c	۱۲/۹۰±۰/۵۰ ^d
اتانولی	پseudomonas آئروژینوزا	-	-	-	۷/۶۰±۰/۲۸ ^a
آبی	استرپتوکوکوس پایوژنز	-	-	۷/۴۰±۰/۵۲ ^a	۸/۱۰±۰/۲۸ ^b
آبی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	-	-	۶/۹۰±۰/۵۲ ^a	۷/۸۰±۰/۲۸ ^b
آبی	پseudomonas آئروژینوزا	-	-	-	۶/۶۰±۰/۵۲ ^a

علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا می باشد.
حروف غیر مشابه در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی دار در سطح (P<۰/۰۵) می باشد.

جدول ۳) نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره های اتانولی و آبی عصاره برگ گیاه حرا بر استرپتوکوکوس پایوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و پseudomonas آئروژینوزا

غلظت عصاره برگ گیاه حرا (میلی گرم بر میلی لیتر)								
نوع عصاره	میکروارگانیسم	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
اتانولی	استرپتوکوکوس پایوژنز	-	-	+	+	+	+	-
اتانولی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	-	-	+	+	+	+	-
اتانولی	پseudomonas آئروژینوزا	-	-	-	+	+	+	-
آبی	استرپتوکوکوس پایوژنز	-	-	-	+	+	+	-
آبی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	-	-	-	+	+	+	-
آبی	پseudomonas آئروژینوزا	-	-	-	-	+	+	-

+: عدم رشد - : رشد

جدول ۴) نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های اتانولی و آبی عصاره برگ گیاه حرا بر استرپتوکوکوس پایوژنز، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و پseudomonas آئروژینوزا

غلظت عصاره برگ گیاه حرا (میلی گرم بر میلی لیتر)								
نوع عصاره	میکروارگانیسم	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
اتانولی	استرپتوکوکوس پایوژنز	-	-	-	+	+	+	-
اتانولی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	-	-	-	+	+	+	-
اتانولی	پseudomonas آئروژینوزا	-	-	-	-	+	+	-
آبی	استرپتوکوکوس پایوژنز	-	-	-	-	+	+	-
آبی	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	-	-	-	-	+	+	-
آبی	پseudomonas آئروژینوزا	-	-	-	-	-	+	-

در سال های اخیر استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری ها به علت مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها رونق یافته است. اغلب اسانس ها و عصاره ها به عنوان منبع ترکیبات ضد میکروبی، از گیاهان خاص و بومی منطقه تأمین می شود. به همین دلیل در این پژوهش به بررسی اثر ضد میکروبی برگ گیاه حرا (بومی مناطق جنوب ایران) پرداخته شد.

بر اساس نتایج به دست آمده عصاره های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه در این پژوهش نشان دادند. اثر ضد میکروبی هر عصاره بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود، به طوری که باکتری های گرم مثبت استرپتوکوکوس پایوژنز و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در مقایسه با باکتری گرم منفی پseudomonas آئروژینوزا حساسیت بیشتری داشتند (جدول ۲) و در غلظت کمتری از عصاره های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا اثر بازدارندگی نشان دادند.

به طور کلی باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به

عصاره برگ گیاه حرا از خود نشان می دهند، علت آن اختلاف ساختمانی دیواره باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی می باشد، مقاومت بالاتر باکتری های گرم منفی را می توان به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی تقریباً غیرقابل نفوذ به ترکیبات چربی دوست نسبت داد که این امر در نتایج سایر محققان هم گزارش شده است (۱۸ و ۱۹).

با توجه به نتایج می توان بیان نمود که عصاره اتانولی برگ گیاه حرا در مقایسه با عصاره آبی برگ گیاه حرا دارای اثر بازدارندگی بیشتری روی سوش های مورد مطالعه داشت. علت آن درصد استحصال بیشتر عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی و در نتیجه استخراج بیشتر مواد مؤثر در برگ گیاه حرا توسط حلال اتانول می باشد.

مؤمنی و همکاران به بررسی خصوصیت ضد میکروبی اسانس و عصاره خام، آبی و الکلی پیاز و زنجبیل در برابر تعدادی از باکتری های گرم مثبت و منفی پرداختند. نتایج نشان داد که عصاره الکلی زنجبیل بیش از سایرین مهار کننده رشد میکروبی بود (۲۰). همچنین این نتیجه با یافته های مطالعه ای که توسط مهسنه (Mahasneh) بر روی گونه قطری این گیاه انجام شد، و مشخص گردید که عصاره آبی این گیاه فاقد اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه ای بوده و عصاره بوتانولی آن، قادر به مهار *پسودوموناس آئروژینوزا* می باشد هم خوانی دارد (۲۱).

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های اتانولی و آبی برگ گیاه حرا به روش انتشار در آگار نشان داد، از نظر تئوری قطر هاله عدم رشد عکس العملی از غلظت ماده مؤثره موجود در گیاه است. این پدیده یک ارتباط خطی بین اندازه هاله و لگاریتم غلظت ماده مورد آزمایش می باشد (۲۲).

نتایج تحلیل آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) نشان داد که با افزایش غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه حرا قطر هاله عدم رشد به طور معنی داری در سطح ($P < 0.05$) افزایش یافت. همچنین نتایج مقایسه دو به دو میانگین همه غلظت ها نشان داد که بین مقایسه میانگین همه غلظت ها تفاوت معنی دار می باشد. به طوری که می توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه حرا میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا کرد.

نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی MBC عصاره اتانولی برگ گیاه حرا برای *استرپتوکوکوس پایوژنز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب ۱۶، ۱۶ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود. تاج بخش و همکاران اثر ضد باکتری عصاره برگ گیاه حرا بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* و *پسودوموناس آئروژینوزا* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد MBC عصاره برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب برابر با ۷/۹، ۱۵/۸ و ۳۳/۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

همچنین حداقل زمان لازم جهت تأثیر MBC عصاره در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۴ ساعت، در رابطه با *اشرشیا کلی* ۸ ساعت و برای *پسودوموناس آئروژینوزا* ۱۲ ساعت بود (۲۳).

تاکنون تنها برخی ترکیبات موجود در گیاه حرا نظیر انواع فیتوالکسین ها (آکالوئیدها و کوینونها)، تانن ها، فلاونوئیدها، ایریدوئیدها و تری ترپن ها، مورد شناسایی قرار گرفته اند (۸). این ترکیبات از جمله ترکیبات اصلی موجود در این گیاه به حساب آمده و در واقع می توان خصوصیت ضد میکروبی این گیاه را به این ترکیبات نسبت می دهند (۸).

بیشتری در زمینه اثر ضد میکروبی گیاه حرا و شناسایی ترکیبات عصاره آن انجام گیرد تا با یافتن مواد مؤثر ضد میکروبی گیاه حرا و فرمولاسیون آن تهیه اشکال دارویی مختلف از آن ممکن شده و اقدام ارزنده‌ای جهت بهبود بیماری‌هایی عفونی و مسمومیت‌زا ناشی از سوش‌های مختلف میکروبی، انجام گیرد.

سپاس و قدردانی

بدین وسیله از خانم مهندس افشاریان و خانم مهندس خادمی‌پور که در انجام آزمایش‌ها و جمع‌آوری نمونه‌ها ما را یاری نمودند، قدردانی می‌شود. مقاله علمی-پژوهشی حاضر مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی با عنوان بررسی اثر ضد میکروبی عصاره برگ گیاه حرا در شرایط آزمایشگاهی با کد ۳/۲۴۱۵۸ در گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد.

شالکون‌ها از جمله ترکیبات فلاوونوئیدی موجود در گیاه حرا می‌باشند. یکی از مشتقات این ترکیبات ۲-۴-۲-تری‌هیدروکسی-۵-متیل شالکون، دارای خاصیت ضد میکروبی بر رشد استافیلوکوکوس‌ها و استرپتوکوکوس‌ها دارد (۸). بنابراین می‌توان اثر ضد میکروبی قوی عصاره اتانولی برگ گیاه حرا را به استخراج بیشتر این ترکیب به وسیله اتانول نسبت داد. لینالول نیز نوعی ترکیب مونوترپنی است که در طب سنتی استفاده‌های فراوانی داشته و در گیاه حرا نیز یافت می‌شود. این ترکیب دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد (۲۴).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره برگ گیاه حرا در شرایط "in vitro" اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر سویه‌های مورد مطالعه داشت. در ادامه لازم است مطالعات وسیع‌تر و دامنه‌داری در شرایط "in vivo" انجام شود تا دوز مؤثر این عصاره مشخص شود. انتظار می‌رود در آینده تحقیقات

References:

1. Taheri A, Seyfan A, Jalalinezhad S, et al. Antibacterial Effect of Myrtus Communis Hydro-Alcoholic Extract on Pathogenic Bacteria. Zahedan J Rese Med Sci 2013; 15: 19-24.
2. Trick WE, Weinstein RA, DeMarais PL, et al. Colonization of skilled care facility residents with antimicrobial resistant pathogens. J Am Geriatr Soc 2001; 49(3): 270-6.
3. WHO. WHO traditional medicine strategy 2002-2005. Geneva: WHO 2002, p.74-9.
4. Voravuthikunchai SP, Kitpipit L. Activity of medicinal plant extracts against hospital isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbio Infec 2005; 11(6): 510-2.
5. Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, et al. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. Genomics 2000; 70(1): 113-22.
6. Field C. Rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. Mar Pollu Bull 1999; 37(8-12): 383-92.
7. Kathiresan K, Bingham BL. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. Adv Mar Biol 2001; 40: 81-251.
8. Bandaranayake WM. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. Wet Eco Manag 2002; 10: 421-52.
9. Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, et al. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti candidal chalcones. Aust Dent J 1997; 42(5): 343-6.
10. Doyle MP, Beuchat LR, Montville T, editors. Food microbiology: fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press: 2001.
11. Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J Ethnopharmacol 2001; 74(2): 113-23.
12. Sattari M, Shahbazi A, Najarpayrah SH. Antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts of eucalyptus on *Pseudomonas aeruginosa*. Modares J Med Sci 1384; 8: 19-

- 23.(Persian).
- 13.Valero M, Salmeron MC. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *Int J Food Microbiol* 2003; 85(1-2): 73-81.
- 14.Babayi H, Kolo I, Okogun J, et al. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biokemistri* 2004; 16(2): 106-11.
- 15.Shariati L, Validi M, Shojapour M, et al. Comparison of the performance of Disk diffusion, Agar screening and E-test methods with Real-time PCR for the detection of methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus* strains isolated from clinical samples of Shahrekord university hospitals, 2008. *ISMJ* 2012; 15 (2): 93-100.
- 16.Benger S, Townsend P, Ashford RL, et al. An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of *Melaleuca alternifolia* against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *The Foot* 2004; 14(2): 86-91.
- 17.Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, et al. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9): 3204-8.
- 18.Ghalem BR, Mohamed B. Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African J Pharma Pharmaco* 2008; 2(10): 211-5.
- 19.Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, et al. Antimicrobial effects of *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Sci J Microbio* 2013; 2: 15-22.
- 20.Moumeni L, Zamanizadeh B. The Antibacterial Properties of *Allium cepa* (onion) and *Zingiber officinale* (ginger) Extracts on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* Isolated from Vaginal Specimens. *J Shahrekord Uni Med Sci* 2010; 11: 81-7.
- 21.Mahasneh AM. Screening of some indigenous Qatari medicinal plants for antimicrobial activity. *Phytother Res* 2002; 16(8): 751-3.
- 22.Neef H, Declercq P, Laekeman G. Hypoglycaemic activity of selected European plants. *Phyto Res* 1995; 9(1): 45-8.
- 23.Tajbakhsh S, Mahmoodpour M, Haghighi MA. Antimicrobial effect of *Avicennia marina* extract on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *pseudomonas aeruginosa*. *ISMJ* 2005; 8(1): 1-7(Persian).
- 24.Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, et al. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 1997; 89(358): 39-46.

Original Article

Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Avicennia marina* extracts on *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*” in vitro”

B. Alizadeh Behbahani ^{1*}, F. Tabatabaei Yazdi ¹, F. Shahidi ¹,
M. Mohebbi ¹

¹ Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, IRAN

(Received 20 Feb, 2013 Accepted 9 Apr, 2013)

Abstract

Background: *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. belongs to Acanthaceae family. Due to biological active compounds and traditional use of its leaves to treat rheumatic disease and wounds, seems that this plant has significant anti-microbial effects. The aim of this study was to determine antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic extracts of *Avicennia marina* (different concentrations) on *Staphylococcus epidermidis* PTCC 1435, *Streptococcus pyogenes* PTCC 1447 and *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1310” in vitro”.

Material & Methods: In this study, antimicrobial effect of the extracts was evaluated by two methods, “Collins method” (spreading of the extract on medium surface) and “disk agar diffusion method”. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for both species determined using a dilution method. Statistical analysis was carried out by analysis of variance (ANOVA).

Results: The results showed that in “disk agar diffusion test”, ethanolic extract had inhibitory effect on *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus pyogenes*. The results showed that in, “Collins method” aqueous extract did not show any inhibitory effect on *Pseudomonas aeruginosa*. The result showed that MIC of *Avicennia marina* leaves of the aqueous and ethanolic extracts for *Pseudomonas aeruginosa* were 32 and 16 mg/ml, respectively. The MBC aqueous and ethanolic extracts of *Avicennia marina* leaves for *Pseudomonas aeruginosa* were, 64 and 32 mg/ml respectively.

Conclusions: *Pseudomonas aeruginosa* was resistant to most of the aqueous and ethanolic *Avicennia marina* extracts. The ethanolic extract of *Avicennia marina* leaves “in vitro” have a significant antimicrobial effect on gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and the gram-positive bacteria *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus pyogenes*.

Key words: *Avicennia marina*, Aqueous extract, Ethanolic extract, Antimicrobial effect

*Address for correspondence: Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, IRAN. Email: behrooz66behbahani@gmail.com