

اثر ضد باکتریایی عصاره حاصل از برگ گیاه حرا (*Avicennia marina*) بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا*

دکتر سعید تاج بخش**^۱، دکتر مهدی محمودپور^۲، محمد علی حقیقی^۳

^۱استادیار باکتری شناسی، بخش بیماری های گرمسیری پروفیسور حقیقی، مرکز پژوهش های سلامت خلیج فارس
^۲دانش آموخته پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
^۳کارشناس ارشد میکروبی شناسی، بخش بیماری های گرمسیری پروفیسور حقیقی، مرکز پژوهش های سلامت خلیج فارس

چکیده

زمینه: از جمله معضلات شایع در دنیای پزشکی، مسأله مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها بوده، لذا یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید با کمترین اثرات جانبی امری لازم و ضروری می باشد. با توجه به وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال موجود در گیاه حرا و استفاده هایی که از این گیاه در طب سنتی به عمل می آید به نظر می رسد که این گیاه دارای قابلیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره برگ این گیاه بر روی سه سویه مرجع از استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا بود.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت *In vitro study* طراحی شد و محلول گلیسرین ۲۰ درصد به عنوان حلال در عصاره گیری مورد استفاده قرار گرفت. سپس در محیط کشت TSB (Tryptone Soy Broth) سویه های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923)، اشریشیاکلی (ATCC 25922) و سودوموناس ائروژینوزا (ATCC 27853) به طور جداگانه تحت تأثیر عصاره با غلظت ۹۰ mg/ml قرار گرفتند. پس از غربالگری اولیه، به منظور تعیین **MBC (Minimal Bactericidal Concentration)** هر سه سویه مذکور با غلظت های مختلف عصاره نیز آزمایش شدند. تأثیر غلظت عصاره مذکور در مقاطع زمانی بین صفر تا ۲۴ ساعت نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: **MBC** عصاره برای استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب برابر با ۷/۹، ۱۵/۸ و ۳۳/۸ mg/ml بود. حداقل زمان لازم جهت تأثیر **MBC** این عصاره در مورد استافیلوکوکوس اورئوس ۲۴ ساعت، در رابطه با اشریشیاکلی ۸ ساعت و برای سودوموناس ائروژینوزا ۱۲ ساعت بدست آمد.

نتیجه گیری: عصاره برگ حرا دارای اثرات ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای بر روی اشریشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا به عنوان باکتری های گرم منفی و استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک باکتری گرم مثبت می باشد.

واژگان کلیدی: گیاه حرا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، سودوموناس ائروژینوزا، طب گیاهی

دریافت مقاله: ۸۴/۴/۳ - دریافت اصلاحیه: ۸۴/۵/۶ - پذیرش مقاله: ۸۴/۵/۱۵

* این پروژه با بودجه و امکانات مرکز پژوهشهای سلامت خلیج فارس انجام گردیده است.

** بوشهر، خیابان معلم، دانشگاه علوم پزشکی، مدیریت پژوهشی، تلفن ۰۷۷۱-۲۵۲۸۵۸۷ ص.ب: ۳۶۳۱

مقدمه

وجود مکانیسم های پیچیده و هوشمند ایجاد کننده مقاومت در باکتری ها سبب شده است که مساله مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها، از جمله معضلاتی شود که در طی دهه های اخیر همواره گریبانگیر سیستم های پزشکی و درمانی باشد. لذا یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید با کمترین اثرات جانبی، موضوعی است که همواره ذهن محققان را به خود معطوف ساخته است. از آنجایی که گیاهان به سبب سرشت خاص خود ناگزیر به داشتن مکانیسم های دفاعی خاص و ترکیبات ضد میکروبی بصورت اندوژن در خود می باشند، لذا می توانند منبع بالقوه و عظیمی از ترکیبات ضد میکروبی به حساب آیند.

در حال حاضر روند استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری های مختلف بصورت علمی و سنتی سیر رو به رشدی داشته است و بر اساس مطالعات انجام شده در ایالات متحده، فروش ترکیبات گیاهی به عنوان دارو در سال ۱۹۹۶ روند رو به رشد ۳۷ درصدی در مقایسه با سال ۱۹۹۵ داشته است (۱).

گیاهان مانگرو که مجموعه ای از گیاهان شور پسند و مقاوم به نمک دریا بوده و در قالب جنگل های جزر و مدی دریایی به صورت پراکنده در بعضی نقاط دنیا شکل گرفته اند، دارای انواع ترکیبات شیمیایی و بیولوژیکی می باشند (۲).

گیاه حرا به عنوان یکی از غالب ترین گونه های گیاهی اکوسیستم مانگرو دارای توانایی های بالقوه ای می باشد. این گیاه بصورت بوته ای یا درختچه ای با ارتفاع های متغیر بین ۱ تا ۱۰ متر یافت می شود. پوسته این گیاه به رنگ سفید یا خاکستری یا سبز مایل به زرد می باشد. برگها معمولاً به شکل بیضی یا نوک تیز بوده، در قسمت رویی حالت چرمی و به رنگ سبز روشن و در قسمتهای زیرین به رنگ سفید مایل به خاکستری و پرز دار هستند. گلها نیز حالت لوله ای شکل داشته و دارای گلبرگ های چهار تایی به رنگ سفید یا زرد مایل به نارنجی می باشند (۳). این گیاه دارای انواع ترکیبات فعال نظیر انواع فیتوالکسین ها،

استروئیدها و اسیدهای کربوکسیلیک، تانین ها، فلاونوئیدها، ایریدوئیدها و تری ترین ها می باشد و با توجه به استفاده هایی که از این گیاه در طب سنتی جهت درمان آبله و زخم ها صورت می گرفته است، به نظر می رسد دارای خواص ضد میکروبی قابل ملاحظه ای باشد. علاوه بر این در طب سنتی از این گیاه برای درمان درد های روماتیسمی نیز استفاده می شود (۴).

با توجه به روند رو به رشد استفاده از گیاهان دارویی، وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال موجود در گیاه حرا، وجود اکوسیستم بسیار غنی مانگرو و نحوه رویش منحصر به فرد این گیاه در استان بوشهر، بر آن شدیم تا اثرات ضد باکتریایی عصاره حاصل از برگ این گیاه را بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس اثرورزینوزا و اشریشیاکلی، مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

الف) تهیه پودر برگ و عصاره گیری: در مهرماه سال ۱۳۸۳ با مراجعه به «ناحیه مله گنزه» استان بوشهر واقع در سواحل شمالی خلیج فارس که از جمله رویشگاه های گیاهان حرا در سواحل شمالی خلیج فارس به حساب می آید، برگ این گیاه تهیه گردید. بعد از نمونه گیری، برگ ها به مدت ۴۸ ساعت در هوای آزاد خشک شده و بصورت پودر درآمدند. از محلول گلیسرین ۲۰ درصد، به عنوان حلال جهت عصاره گیری استفاده شد (۵)؛ بدین صورت که ۵۰ گرم پودر حاصل از برگ گیاه در ۲۰۰ میلی لیتر محلول گلیسرین ریخته شد و مخلوط حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در نقطه جوش حرارت دید و سپس توسط گاز، مواد زاید آن گرفته شده و محلول حاصله جهت یکنواخت سازی بیشتر به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی سانتریفیوژ که یک محلول یکنواخت بود به وسیله اتوکلاو استریل گردید و تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از انجام مراحل فوق، غلظت عصاره حاصله 180 mg/ml مورد محاسبه قرار گرفت.

زمان صفر یعنی بلافاصله بعد از تماس باکتری با عصاره و همچنین در زمان های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۲۴ ساعت بعد از تماس، شمارش باکتری مورد محاسبه قرار گرفت (۷). حداقل زمانی که در آن عصاره توانسته بود باکتری ها را نسبت به تعداد اولیه به میزان ۹۹/۹ درصد کاهش دهد، به عنوان حداقل زمان ممکن برای اثر بخشی عصاره بر روی سویه مورد نظر، در نظر گرفته شد.

یافته ها

(۱) **غربالگری:** بر اساس نتایج حاصله، هر سه سویه با غلظت ۹۰ mg/ml از عصاره کاملاً از بین رفتند.

(۲) **تعیین MBC:** تعداد باکتری ها بعد از تماس با غلظت های مختلف عصاره، برای هر سه سویه در جدول ۱ نشان داده شده است.

اشریشیاکلی: طبق نتایج حاصله، MBC این عصاره برای این باکتری ۳۳/۸ mg/ml می باشد. همان طور که مشخص است در غلظت ۳۳/۸ mg/ml، میزان باکتری CFU/ml ۸۰ بوده است و در غلظت های بعدی یعنی ۳۰ mg/ml میزان باکتری CFU/ml $۱۰^۴$ می باشد. از آنجایی که حداقل غلظتی از عصاره که توانسته است بیش از ۹۹/۹ درصد از باکتری های اولیه را از بین ببرد، ۳۳/۸ mg/ml بوده است، لذا این غلظت MBC عصاره برای این سویه به حساب می آید.

سودوموناس ائروژینوزا: در مورد این باکتری نیز غلظت ۱۵/۸ mg/ml برابر با MBC می باشد. چرا که در این غلظت تعداد باکتری CFU/ml $۱۰^۲$ بوده است، اما در غلظت بعدی یعنی ۱۳/۵ mg/ml، تعداد باکتری CFU/ml $۱۰^۳$ ۷/۴ بوده است.

حداقل زمان لازم جهت تاثیر MBC عصاره در مورد اشریشیاکلی ۸ ساعت، در رابطه با سودوموناس ائروژینوزا ۱۰ ساعت و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲۴ ساعت بدست آمد.

(ب) **سویه های مرجع باکتریایی:** جهت انجام این مطالعه سویه های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923)، سودوموناس ائروژینوزا (ATCC27853) و اشریشیاکلی (ATCC 25922) از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و عفونی ایران بصورت آمپول های شیشه ای لیوفیلیزه خریداری شده و پس از انجام مراحل مختلف بازیافت و پرورش میکروبی آماده استفاده شدند.

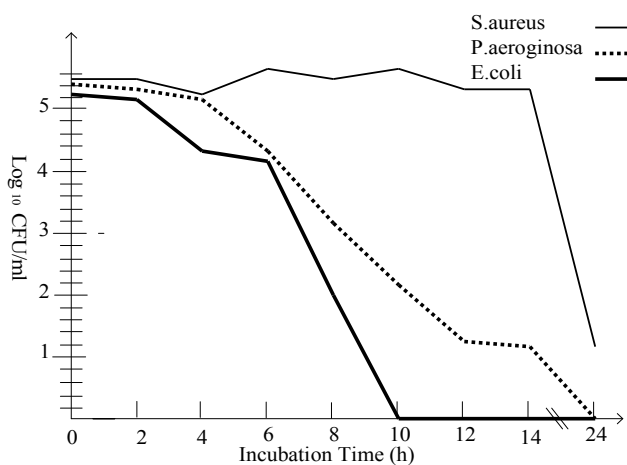
(ج) **غربالگری:** این مطالعه نوعی *In vitro Study* بود و در آن باکتری های مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت در محیط TSB تحت تاثیر عصاره قرار گرفتند و سپس میزان رشد باکتری بر حسب CFU/ml Colony Forming Unit) محاسبه شده و با میزان شمارش باکتری در لوله کنترل که در آن باکتری ها تحت تاثیر عصاره قرار نداشتند مقایسه شد.

(د) **تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره:** در این مطالعه میزان CFU/ml $۱۰^۵$ از باکتریهای مذکور (۶)، به مدت ۲۴ ساعت در محیط (TSB) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تحت تاثیر غلظت های مختلف (جدول ۱) عصاره قرار گرفتند و سپس تعداد باکتری بر اساس معیار CFU/ml محاسبه شد و با تعداد اولیه باکتری مورد مقایسه قرار گرفت. بر اساس تعریف، حداقل غلظتی از عصاره که تعداد باکتری ها را نسبت به تعداد اولیه باکتری (CFU/ml $۱۰^۵$) به میزان ۹۹/۹ درصد کاهش دهد به عنوان MBC در نظر گرفته می شد (۶). در لوله کنترل نیز که باکتری ها فقط در تماس با حلال عصاره قرار داشتند، با شمارش CFU محتویات آن، از توانایی رشد باکتری در حضور حلال عصاره اطمینان حاصل شد.

(ه) **بررسی زمان تاثیر عصاره (Time Kill Study):** به منظور تعیین حداقل زمان لازم جهت شروع اثر کشندگی عصاره، تعداد CFU/ml $۱۰^۵$ از هر سویه به طور جداگانه در محیط TSB با غلظت MBC عصاره مربوط به آن سویه تماس داده شد و در

جدول (۱) میزان رشد باکتری در غلظت های مختلف عصاره حاصل از برگ گیاه حرا و کنترل برای هر سه باکتری

تعداد باکتری در کنترل (CFU/ml)	تعداد باکتری پس از تماس با عصاره (CFU/ml)	غلظت عصاره (mg/ml)	باکتری
7×10^8	۰	۹۰	<i>E. coli</i>
	۱۰	۴۵	
	۸۰	۳۳/۸	
	6×10^2	۳۰	
	غیر قابل شمارش	۲۲/۵	
	غیر قابل شمارش	۱۱/۲	
9×10^8	۰	۹۰	<i>P.a eruginosa</i>
	۰	۴۵	
	۰	۲۲/۵	
	۰	۲۰/۲	
	۰	۱۸	
	2×10^2	۱۵/۸	
	$7/4 \times 10^3$	۱۳/۵	
	غیر قابل شمارش	۱۱/۲	
$4/6 \times 10^8$	۰	۹۰	<i>S. aureus</i>
	۰	۴۵	
	۰	۲۲/۵	
	۰	۱۰/۱۱۲/۲	
	۰	۹	
	۱۰	۷/۹	
	۲۰	۶/۸	



شکل (۱) میزان رشد باکتری در زمان های مختلف بعد از تماس با MBC عصاره برگ حرا برای هر باکتری

بحث

بر اساس نتایج حاصله MBC عصاره حاصل از برگ گیاه حرا برای اشريشیاکلی، سودوموناس اثرورینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۳۳/۸، ۱۵/۸ و ۷/۹ mg/ml خواهد بود و از آنجایی که در مورد هر سه سویه، باکتریها در محیط های کنترل که فقط با حلال (گلیسرین ۲۰ درصد) تماس داشته اند، رشد قابل ملاحظه ای نموده اند، لذا کاهش بیش از ۹۹/۹ درصدی سه سویه مذکور در غلظت های MBC، وابسته به وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال و ضد باکتریایی موجود در عصاره برگ این گیاه می باشد.

در مطالعه ای که توسط مهسنه (Mahasneh) بر روی گونه قطری این گیاه انجام شد، مشخص گردید که عصاره آبی این گیاه فاقد اثر ضد میکروبی بوده و عصاره بوتانولی آن، قادر به مهار سودوموناس اثرورینوزا می باشد (۸). روش کار این محقق جهت ارزیابی اثرات ضد میکروبی این گیاه بر اساس روش های دیسکی بوده است و در مورد میزان MBC، توضیحی داده نشده است. اما در مطالعه حاضر از روش رقیق سازی در محیط مایع (Broth dilution method) استفاده شد و این روش معیار دقیق تری جهت ارزیابی کمی اثرات ضد میکروبی بوده و از طریق آن اندازه گیری MBC میسر می باشد (۶ و ۹). به علاوه در صورت مطالعه این عصاره در شرایط *In vivo* و مدل های حیوانی، محلول گلیسرین ۲۰ درصد (به خصوص با توجه به کاهش قابل ملاحظه غلظت گلیسرین در MBC)، در مقایسه با بوتانول دارای قابلیت سازگاری بیشتری با بیولوژی جاندار می باشد، لذا مطالعه حاضر می تواند مسیر را جهت بررسی اثرات ضد میکروبی این گیاه در مدل های حیوانی هموارتر سازد.

از سوی دیگر باید گفت به نظر می رسد ترکیبات بیولوژیکی موجود در این گیاه با مدل های حیوانی چندان ناسازگار نبوده و دارای اثرات توکسیک کمی می باشند. در مطالعه ای علی (Ali) و همکارانش، اثرات هماتولوژیکی، بیوشیمیایی و پاتولوژیکی این گیاه را بر

روی موش های صحرایی مورد بررسی قرار دادند (۱۰). در این مطالعه این گیاه با دوز ۴ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز و به صورت خوراکی برای سه روز پیپای تجویز شد و اثرات مختلف مذکور مورد بررسی قرار گرفت. در هر دو مورد تقریباً آثار سوئی از نظر رفتاری یا مرگ و میر مشاهده نشد. دوز ۱ gr/kg تغییر قابل ملاحظه ای روی وزن بدن و کبد نداشت، اما دوز ۴ gr/kg منجر به کاهش وزن بدن و کبد شد. هر دو دوز بر روی ایندکس های گلبولهای قرمز خون محیطی تغییر قابل ملاحظه ای نداشت. تاثیر دوزهای مذکور بر روی اجزای بیوشیمیایی خون به صورت کاهش جزئی میزان غلظت پلاسمایی گلوکز و افزایش اندک در سدیم، کلسیم، مس، منیزوم، کلسترول و آنزیمهای کبدی بود. بیوپسی های حاصل از کلیه نیز مقداری جمع شدگی کلیه و دژنراسیون سلول های گلومرولی و مناطقی از خونریزی های مدولاری را نشان داد.

تاکنون تنها بعضی ترکیبات موجود در این گیاه نظیر انواع فیتوالکسین ها، تانین ها، فلاونوئید ها، ایریدوئیدها و تری ترپنها، مورد شناسایی قرار گرفته اند (۴). فیتوالکسین ها خود شامل انواع ترکیبات مختلف نظیر آلکالوئیدها و کوینون ها می باشند. این ترکیبات از جمله ترکیبات اصلی موجود در این گیاه به حساب آمده و در حقیقت یکی از ابزارها و وسایل دفاعی گیاه در برابر عوامل میکروبی بخصوص قارچ ها به حساب می آیند (۴).

تانین ها نیز در گیاهان به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر میکروبیهای مهاجم عمل کرده و به عنوان وسیله ای به منظور دفاع در برابر عوامل مخرب مختلف می توانند وارد عمل شوند (۱۱ و ۱۲). پونیکالین (Punicalin) و پونیکالاگین (Punicalagin) از جمله اصلی ترین تانین های موجود در گیاهان مانگرو به حساب می آیند (۴). در طی مطالعه ای مشخص شده است که پونیکالاگین در غلظت های ۶۰۰ µg/ml و ۱/۲ mg/ml، قادر به مهار رشد قابل ملاحظه مایکوباکتریوم تورکلوزیس انسانی می باشد (۱۳).

لوپئول (Lupeol) و گوزیپول (Gossypol) از جمله

لینالول نوعی ترکیب مونوترپنی است که این ترکیب نیز دارای اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی می باشد (۲۳). اسید الاژیک نیز نوعی ترکیب پلی فنولیکی است که می تواند اثرات مهاری قابل ملاحظه ای بر رشد هلیکو باکتر پیلوری داشته باشد. مکانیسم مهاری این ترکیب بر رشد این باکتری با واسطه مهار آنزیم آریلامین N - استیل ترانسفراز که آنزیم کلیدی در رشد این باکتری است، می باشد و لذا از این ترکیب می توان در موارد گاستریت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری استفاده نمود (۲۴ و ۲۵).

بدین ترتیب می توان نتیجه گرفت با توجه به احتمال وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال مذکور در این گیاه و یا سایر ترکیبات ناشناخته، اثرات ضد باکتریایی این گیاه امری معقول باشد.

در یک نتیجه گیری کلی می توان بیان نمود که عصاره برگ گیاه حرا در شرایط *In vitro* دارای قابلیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای بر روی سویه های مورد مطالعه باشد و در ادامه لازم است مطالعات وسیع تر و دامنه داری در شرایط *In vivo* انجام شود تا دوزاژ مؤثر این عصاره بر باکتری های مورد نظر و سویه های بالینی، اثرات جانبی آن در این دوزاژ و نیز فرمولاسیون دقیق آن جهت دستیابی به بیشترین میزان فراهمی زیستی، مورد ارزیابی قرار گیرد و نهایتاً بتوان این عصاره را به عنوان یک داروی ضد میکروبی جدید به دنیای پزشکی و میکروبیولوژی معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

در پایان از جناب آقای دکتر نبی پور، مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر که در تصویب و تامین بودجه این طرح نقش بسزایی داشتند و همچنین جناب آقای دکتر کیوان زندی، استادیار ویروس شناسی دانشکده پزشکی و سرکار خانم سیروس، کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی که در انجام این طرح ما را یاری فرمودند کمال تشکر و قدردانی نموده، برایشان آرزوی موفقیت داریم.

ترکیبات تری ترپنی هستند که به فراوانی در بعضی گیاهان مانگرو یافت می شوند (۴). این دو ترکیب نیز دارای اثرات ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای می باشند (۱۴). سایر ترکیبات تری ترپنی نیز دارای قابلیت ضد میکروبی بوده (۱۸-۱۵) و بعضی از آنها از طریق ایجاد اختلال در غشای سلولی سبب بروز این اثر می شوند (۱۹).

شالکونها (Chalcones) نیز از جمله ترکیبات فلاونوئیدی بی نظیر در گیاهان مانگرو به حساب می آیند (۴). یکی از مشتقات این ترکیبات به نام ۲و۴و۲ تری هیدروکسی-۵ - متیل شالکون، دارای خاصیت مهاری قابل توجهی بر روی رشد استرپتوکوکوس ها، استافیلوکوکوس ها و لاکتوباسیلوس ها، در غلظتهای ۲۵-۵۰ μg/ml بوده است. در مطالعه ای که ساتو (Sato) و همکارانش بر روی این ترکیب انجام دادند مشخص شد که از این ترکیب می توان جهت درمان استوماتیت های باکتریایی استفاده نمود (۲۰). به علاوه این ترکیب دارای توانایی قابل ملاحظه ای جهت مهار رشد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37Rr می باشد به طوری که با جایگزین ساختن یک گروه هیدروفیل بر روی یک حلقه آروماتیک و جایگزین ساختن یک گروه متصل شونده به هیدروژن بر روی حلقه دیگر این توانایی افزایش می یابد (۲۱).

علاوه بر ترکیبات مذکور بعضی ترکیبات ضد میکروبی دیگر نیز در گیاهان مانگرو مورد شناسایی قرار گرفته اند که ممکن است اثرات ضد باکتریایی این گیاه مربوط به وجود این ترکیبات باشند. از این ترکیبات می توان به بروژیروول (Brugierol)، فاگرونین (Fagaronin) لینالول (Linalool) و اسید الاژیک (Ellagic acid) اشاره نمود (۴).

بروژیروول و بعضی مشتقات سنتتیک آن نظیر کاربامات ها و تری تیان دارای فعالیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای می باشند (۴ و ۲۲). فاگرونین نوعی آلکالوئید است که علاوه بر خواص ضد سرطانی دارای قابلیت ضد باکتریایی نیز می باشد (۴).

References:

- 1- Klink B. Alternative medicine: is natural really better? *Drug Top* 1997; 141:99-100
- 2- Makintosh. D, Zisman S. The status of mangrove ecosystem. (Accessed Agust 25, 2004 at <http://iufro.boku.ac.at/iufro/d1/wu10700/unpub/maint95.htm>)
- 3- Duke JA. Handbook of Energy Crops. 1983 (Accessed August 20, 2004, at http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Avicennia_marina.html)
- 4- Bandaranayake WM. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetland Ecol Manage* 2002;10:421-52.
- 5- Sydiskis RJ, Owen DG, Lohr JL, et al. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrobial Agent chemother* 1991: 2463-6.
- 6- Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. Laboratory methods for detection of antibacterial resistance. In : Baily & Scotts Diagnostic Microbiology. 11 th ed, USA: Mosby, St. Louis, 2002, 229-50.
- 7- Thuille N, Fille M, Nagl M. Bactericidal activity of herbal extracts. *Int J Hyg Environ Health* 2003; 206:1-5.
- 8- Mahansneh AM. Screening of some indigenous Qatari plants for antimicrobial activity. *Phytother Res* 2002;16:751-3.
- 9-European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microb Infection* 2000; 6:509-15.
- 10- Ali BH, Bashir AK. Toxicological study on the leaves of *Avicennia marina* (mangrove) in rats. *J Appl Toxicol* 1998; 18:111-6.
- 11- Bandaranayake WM. Survey of mangrove plants from Northern Australia for phytochemical constituents and UV-absorbing compounds. *Curr Trpoics Phytochem* 1995; 14:69-78.
- 12- Jones GA, McAllister PA, Muir AD. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:1374-1378.
- 13- Asress K. Investigation on anti-mycobacterial activity of some Ethiopian medicinal plants. *Phytother Res* 2001; 15:323-6.
- 14- Goyal MM. Antibacterial activity of natural products from the leaves of *Thespesia populanea*. *Acta Cien Indian Chem* 1989;15:117-24.
- 15- Ahmed AA, Mahmoud AA, Williams HJ. New sesquiterpene alpha-methylene lactones from the Egyptian plant *Jasonia candicans*. *J Nat Prod* 1993; 56:1276-80.
- 16- Amaral JA, Ekins A, Richards SR. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:520-5.
- 17- Habtemariam S, Gray AI, Watremans PG. A new antibacterial sesquiterpene from *Premna oligotricha*. *J Nat Prod* 1993 ;56:140-3.
- 18- Himejima M, Hobson KR, Otsuka T. Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: a defense mechanism against microbial invasion. *J Chem Ecol* 1992; 18:1809-18.
- 19- Mendoza L, Wilkens M, Urzua A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 1997;58:85-8.
- 20- Sato M, Tsuchia H, Akagiri M, et al. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. *Aust Dent J* 1997;42:343-6
- 21- Lin YM, Zhou Y, Flavin MT, et al. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorg Med Chem* 2002;10:2795-802.
- 22- Kato A, Takahashi J. A new naturally occurring 1,2-dithiolane from *Bruguiera cylindrical*. *Phytochem* 1975; 14:1458.
- 23- Pattnaik S. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 1997; 89:39-46
- 24- Chung JG. Inhibitory actions of ellagic acid on growth and arylamin N-acetyltransferase activity in strain of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients. *Microbios* 1998; 93:115-27.
- 25- Iino T, Tashima K, Umeda M, et al. Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rats stomachs following ammonia or reperfusion. *Life Sci* 2002; 70:1139-50.