دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۵، صفحه ۸۸۸– ۸۷۹ (آذر و دی ۱۳۹۳)
ISMJ 2014; 17(5): 879-888

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

بهروز علیزاده‌بهبهانی [*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، به‌صورت 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، به‌نظر می‌رسد این گیاه دارای اثرات ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای باشد. هدف از این پژوهش ارزیابی اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* **PTCC 1435**، *استرپتوکوکوس پایوژنز* **PTCC 1447** و *پسودوموناس آئروژینوزا* **PTCC 1310** در شرایط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش‌ها: اثر ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی بر *پسودوموناس آئروژینوزا* نشان نداد. **MIC** عصاره آبی و اتانولی برای *پسودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب ۳۲ و ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و **MBC** عصاره آبی و اتانولی نیز در خصوص *پسودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب ۶۴ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

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

واژگان کلیدی: گیاه حرا، عصاره آبی، عصاره اتانولی، اثر ضدمیکروبی

[*] مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی
Email :behrooz66behbahani@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

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

یکی از مهم‌ترین چالش‌های درمانی، مقابله با عوامل بیماری‌های عفونی و مسمومیت‌زا به‌دلیل شیوع و گسترش بالای آن می‌باشد. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش مقاومت دارویی در بیشتر باکتری‌ها گردیده است. بنابراین یافتن ترکیبات ضدمیکروبی 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 خلیج‌فارس ایران همچون بندر دیر، بلوچستان، بندر خمیر، جزیره قشم، لافت و بندر گواتر 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 ضدمیکروبی 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 ویژگی هایی مانند سایتوتوکسیسیتی، ضدتوموری، ضدالتهابی، ضدمیکروبی، افزایش فعالیت کولین استیل ترانسفراز و مهار آنزیم لیپید پراکسیداز می‌باشد (۸). شالکون‌ها نیز از جمله ترکیبات فلاوونوئیدی 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. فارنژیت (گلودرد چرکی)، زرد زخم، باد سرخ، سلولیت، فاسئیت نکروزان (قانقاریا) از بیماری‌های مهمی هستند که توسط *استرپتوکوکوس پایوژنز* ایجاد می‌شوند. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* یکی از علل

Archive of SID

www.SID.ir

عفونت‌های فرصت‌طلب 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، باکتریمی (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 ضدمیکروبی 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. سویه‌های 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 این‌صورت 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 به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و هر چند ساعت یک‌بار با یک میله شیشه‌ای به هم زده شد. مخلوط آبی نیز به‌مدت ۲۰ دقیقه با شعله حرارت دید تا مایع کرم رنگی به‌دست 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 به‌منظور 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 میلی لیتر 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 میلی لیتر 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 ۱/۵×۱۰۸ کلونی بر میلی‌لیتر باکتری باشد (۱۳).

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت ضدمیکروبی 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 میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و برای یکنواخت شدن به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول به ظرف‌های پتری استریل اضافه و غلظت نهایی عصاره در این حالت به ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌رسد (۱۴).

در مرحله بعد محیط کشت استریل مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به ظرف‌های پتری اضافه شد و در دمای اتاق قرار گرفت تا اینکه محیط کشت‌ها ببندند. یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. از محیط دارای عصاره و بدون باکتری نیز به‌عنوان کنترل استفاده گردید (۱۴). در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط‌ها کشت داده شد سپس دیسک‌های کاغذی (جنس صافی واتمن و به قطر ۶ میلی‌متر) با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر عصاره‌ها 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 گرم‌خانه‌گذاری به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی با استفاده از خط‌کش به‌طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایش ها با ۳ تکرار انجام گرفت (۱۵).

با استفاده از روش رقت لوله‌ای، 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 رقت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله نیز به‌عنوان کنترل به‌کار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردیدند. پس از طی زمان گرم‌خانه گذاری لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم‌های 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 لوله‌ای 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 رقت‌های مختلف از هر عصاره و یک لوله نیز به‌عنوان کنترل به‌کار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به‌مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از طی زمان گرم‌خانه‌گذاری لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم‌های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، از تمام لوله‌های که هیچ رشدی در آنها مشاهده نشده بود نمونه‌برداری و جهت تعیین MBC کشت داده شدند. لوله‌ای که دارای کم‌ترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به‌عنوان 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 داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS (USA، Il، Chicago،SPSS Inc) ویرایش ۱۷ استفاده شد، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) جهت مقایسه میانگین‌ها و از آزمون Tukey جهت بررسی اختلاف بین میانگین‌ها در سطح ($P<۰/۰۵$) استفاده گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

یافته‌ها

یافته های بررسی اثر ضدمیکروبی 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 پایوژنز* 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 ضدمیکروبی غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا بر *استرپتوکوکوس پایوژنز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* (روش تمام ظرف)

میکروارگانیسم	عصاره آبی برگ گیاه حرا
استرپتوکوکوس پایوژنز PTCC 1447	-
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس PTCC 1435	-
پسودوموناس آئروژینوزا PTCC 1310	-
میکروارگانیسم	عصاره اتانولی برگ گیاه حرا
استرپتوکوکوس پایوژنز PTCC 1447	+
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس PTCC 1435	+
پسودوموناس آئروژینوزا PTCC 1310	-

علامت (+) نشان‌دهنده عدم رشد میکروارگانیسم بر محیط کشت و وجود فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ گیاه حرا می‌باشد. علامت (-) نشان‌دهنده رشد میکروارگانیسم بر محیط کشت و عدم وجود فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا می باشد.

یافته‌های بررسی اثر ضدمیکروبی 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 و۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) *استرپتوکوکوس پایوژنز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* اثر بازدارندگی داشت. عصاره آبی برگ گیاه حرا در غلظت‌های (۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر *استرپتوکوکوس پایوژنز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مؤثر بود و از رشد این باکتری‌ها جلوگیری کرد، اما در غلظت‌های ۱۰ و۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر اثر بازدارندگی مشاهده نشد. عصاره آبی برگ گیاه حرا در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر ضدباکتریایی 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 پایوژنز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب ۸، ۸ و ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که MIC عصاره آبی برای *استرپتوکوکوس پایوژنز*، *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 پایوژنز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب ۱۶، ۱۶ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که MBC عصاره آبی برای *استرپتوکوکوس پایوژنز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس*

Archive of SID

www.SID.ir

آئروژینوزا به‌ترتیب ۳۲، ۳۲ و ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

جدول ۲) میانگین قطر هاله عدم رشد *استرپتوکوکوس پایوژنز*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* بر حسب میلی‌متر در حضور عصاره‌های اتانولی و آبی برگ گیاه حرا (انتشار در آگار)

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه حرا (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
		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	*پسودوموناس 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	*پسودوموناس آئروژینوزا*	–	–	–	۶/۶۰±۰/۵۲ [a]

علامت (–) نشان‌دهنده عدم وجود فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا می‌باشد.
حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

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

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه حرا (میلی گرم بر میلی لیتر)						
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	کنترل
اتانولی	*استرپتوکوکوس پایوژنز*	–	–	+	+	+	+	–
اتانولی	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*	–	–	+	+	+	+	–
اتانولی	*پسودوموناس آئروژینوزا*	–	–	–	+	+	+	–
آبی	*استرپتوکوکوس پایوژنز*	–	–	–	+	+	+	–
آبی	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*	–	–	–	+	+	+	–
آبی	*پسودوموناس آئروژینوزا*	–	–	–	–	+	+	–

+: عدم رشد –: رشد

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

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه حرا (میلی گرم بر میلی لیتر)						
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	کنترل
اتانولی	*استرپتوکوکوس پایوژنز*	–	–	–	+	+	+	–
اتانولی	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*	–	–	–	+	+	+	–
اتانولی	*پسودوموناس آئروژینوزا*	–	–	–	–	+	+	–
آبی	*استرپتوکوکوس پایوژنز*	–	–	–	–	+	+	–
آبی	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*	–	–	–	–	+	+	–
آبی	*پسودوموناس آئروژینوزا*	–	–	–	–	–	+	–

+: عدم رشد –: رشد

بحث

در سال‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها به‌علت مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها رونق یافته است. اغلب اسانس‌ها و عصاره‌ها به‌عنوان منبع ترکیبات ضدمیکروبی، از گیاهان خاص و بومی منطقه تأمین می‌شود. به‌همین دلیل در این پژوهش به بررسی اثر ضدمیکروبی برگ گیاه حرا (بومی مناطق جنوب ایران) پرداخته شد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این پژوهش نشان دادند. اثر ضدمیکروبی هر عصاره بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود، به‌طوری که باکتری‌های گرم مثبت *استرپتوکوکوس پایوژنز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در مقایسه با باکتری گرم منفی *پسودوموناس آئروژینوزا* حساسیت بیشتری داشتند (جدول ۲) و در غلظت کمتری از عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا اثر بازدارندگی نشان دادند.

به‌طور کلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به

Archive of SID
http://bpums.ac.ir
www.SID.ir

عصاره برگ گیاه حرا از خود نشان می‌دهند، علت آن اختلاف ساختمانی دیواره باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی می‌باشد، مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی را می‌توان 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 می‌توان بیان نمود که عصاره اتانولی برگ گیاه حرا در مقایسه با عصاره آبی برگ گیاه حرا دارای اثر بازدارندگی بیشتری روی سوش‌های 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 می‌باشد.

مؤمنی و همکاران به بررسی خصوصیت ضدمیکروبی اسانس و عصاره خام، آبی و الکلی پیاز و زنجبیل در برابر تعدادی از باکتری‌های 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 یافته‌های مطالعه‌ای که توسط مهسنه (Mahasneh) بر روی گونه قطری این گیاه انجام شد، و مشخص گردید که عصاره آبی این گیاه فاقد اثر ضدمیکروبی قابل ملاحظه‌ای بوده و عصاره بوتانولی آن، قادر به مهار *پسودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد هم‌خوانی دارد (۲۱).

نتایج حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی و آبی برگ گیاه حرا به‌روش انتشار در آگار نشان داد، از نظر تئوری قطر هاله عدم رشد عکس‌العملی از غلظت ماده مؤثره موجود در گیاه است. این پدیده یک ارتباط خطی بین اندازه هاله و لگاریتم غلظت ماده مورد آزمایش می‌باشد (۲۲).

نتایج تحلیل آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) نشان داد که با افزایش غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه حرا قطر هاله عدم رشد به‌طور معنی‌داری در سطح ($P<۰/۰۵$) افزایش یافت. همچنین نتایج مقایسه دو به دو میانگین همه غلظت‌ها نشان داد که بین مقایسه میانگین همه غلظت‌ها تفاوت معنی‌دار می‌باشد. به‌طوری که می‌توان 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 به‌ترتیب ۱۶، ۱۶ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود. تاج‌بخش و همکاران اثر ضدباکتری 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* به‌ترتیب برابر با ۷/۹، ۱۵/۸ و ۳۳/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر 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 فیتوالکسین‌ها (آلکالوئیدها و کوینون‌ها)، تانین‌ها، فلاوونوئیدها، ایریدوئیدها و تری‌ترپن‌ها، مورد شناسایی قرار گرفته‌اند (۸). این ترکیبات از جمله ترکیبات اصلی موجود در این گیاه به حساب آمده و در واقع می‌توان خصوصیت ضدمیکروبی این گیاه را به این ترکیبات نسبت می‌دهند (۸).

Archive of SID

www.SID.ir

شالکون‌ها از جمله ترکیبات فلاوونوئیدی موجود در گیاه حرا می‌باشند. یکی از مشقات این ترکیبات ۲-۴-۲- تری‌هیدروکسی-۵- متیل شالکون، دارای خاصیت ضدمیکروبی بر رشد استافیلوکوکوس‌ها و استرپتوکوکوس‌ها دارد (۸). بنابراین می‌توان اثر ضدمیکروبی قوی عصاره اتانولی برگ گیاه حرا را به استخراج بیشتر این ترکیب به‌وسیله 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 ضدمیکروبی 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 بیشتری در زمینه اثر ضدمیکروبی گیاه حرا و شناسایی ترکیبات عصاره آن انجام گیرد تا با یافتن مواد مؤثر ضدمیکروبی 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

بدین‌وسیله 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 ضدمیکروبی عصاره برگ گیاه حرا در شرایط آزمایشگاهی با کد ۳/۲۴۱۵۸ در گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد.

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, edithors. 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, Najarpyrayh SH. Antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts of eucalyptus on *Pseudomonas aeruginosa*. Modares J Med Sci 1384; 8: 19-

www.SID.ir
Archive of SID

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.

Archive of SID

www.SID.ir

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 Acantaceae family. Due to biological active compounds and traditional use of it's 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 *Avicenna 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 *Avicenna marina* leaves for *Pseudomonas aeruginosa* were, 64 and 32 mg/ml respectively.

Conclusions: *Pseudomonas aeruginosa* was resistant to most of the aqueous and ethanolic *Avicenna marina* extracts. The ethanolic extract of *Avicenna 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: *Avicenna 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

Archive of SID
www.SID.ir