علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره هفدهم، شماره سه، پاییز ۹۴

بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره شاخه جوان و برگ بالغ گیاه حرا (*Avicennia marina*) در خورتیاب، استان هرمزگان

فرشید کفیل زاده[۱*]

Kafilzadeh@jia.ac.ir

شکوفه زینلی[۲]

کاووس صلح جو[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۷ **تاریخ پذیرش:۹۳/۷/۱۵**

چکیده

زمینه و هدف: بسیاری از عوامل بیماری‌زای انسانی در اثر تغییر در ساختار ژنی به اکثریت آنتی بیوتیک ها مقاوم شده‌اند و در نتیجه یافتن مواد ضدمیکروبی جدید ضروری است. با توجه به استفاده از گیاه حرا (*Avicennia marina*) در طب سنتی در منطقه جنوب ایران، این تحقیق به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره شاخه جوان و برگ بالغ گیاه حرا انجام گردید.

روش بررسی: عصاره‌های شاخه و برگ خشک‌شده گیاه حرا با استفاده از دستگاه سوکسیله و حلال‌های اتیل‌استات و متانل تهیه گردید. سپس اثرات ضدباکتریایی این گیاه با روش انتشار در چاهک، بر ضد چند باکتری گرم مثبت و گرم منفی، در سه حجم ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرولیتر با غلظت ۱۰۰ mg/ml بررسی و قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری شد. هم‌چنین میزان MIC و MBC عصاره‌های شاخه و برگ گیاه حرا تعیین گردید.

یافته‌ها: بیشترین قطر هاله عدم رشد با ۲۸ میلی متر هم با عصاره شاخه و هم با عصاره برگ گیاه حرا با استفاده از حلال اتیل‌استات در حجم ۳۰ میکرولیتر برای باکتری *شیگلا دیسانتری* وکمترین مقدار MIC و MBC برای باکتری *باسیلوس سابتیلیس* با عصاره شاخه با حلال اتیل‌استات به ترتیب ۰/۴mg/ml و۰/۵mg/ml تعیین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره شاخه گیاه حرا با حلال اتیل‌استات، اثر ضدباکتریایی مناسبی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت دارد و به نظر می‌رسد که بافت گیاهی شاخه دارای ترکیبات بیولوژیک فعال ضدمیکروبی بیشتری نسبت به بافت برگ باشد.

واژه‌های کلیدی: *Avicennia marina* ، گیاه حرا، اثر ضد باکتریایی، خور تیاب، بندرعباس

۱- دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران *(مسوول مکاتبات)

۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران

۳- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، گروه میکروبیولوژی، جهرم، ایران

مقدمه

گیاهان حرا در حد فاصل خشکی و دریا و در نواحی جزرومدی رشد می‌کنند (۱). پراکنش این گیاه در ایران در حاشیه خلیج فارس در جزیره قشم، بندرخمیر، بندرگواتر، بندردیر و خلیج نایبند(منطقه عسلویه) بوده که نام علمی آن *اویسینیا مارینا*(*Avicennia marina*) متعلق به خانواده اویسینیاسه (*Avicenniaceae*) می‌باشد. خلیج نایبند آخرین نقطه پراکنش این درختان در جنوب غرب آسیا محسوب می‌شود(۲). این گیاه در طب سنتی کاربرد فراوانی داشته و می‌توان به استفاده از ریشه و پوست آن برای تقویت قوای جنسی و درمان دندان درد و از برگ آن برای بهبودی بیماری‌های معده و پوست اشاره نمود (۲،۳،۴). امروزه استفاده تجاری از گیاهان حرا نه‌تنها برای چوب و سوخت بلکه به‌عنوان یک منبع غنی از ترکیبات با پتانسیل درمانی بالا برای درمان بیماری‌هایی نظیر دیابت، آسم، سرطان معده و ایدز می‌باشد (۵،۶). گیاهان حرا که مجموعه‌ای از گیاهان شورپسند و مقاوم به نمک دریا بوده و درقالب جنگل‌های جزرومدی دریایی به‌صورت پراکنده در بعضی نقاط دنیا شکل گرفته‌اند، دارای انواع ترکیبات شیمیایی و بیولوژیک می‌باشند (۷).

گیاه حرا دارای ترکیبات شیمیایی فراوانی نظیر انواع فیتوالکسین‌ها، استروییدها، تری‌ترپن‌ها، ساپونین‌ها، فلاونوییدها و تانن‌ها بوده که از پتانسیل‌آنتی‌اکسیدانی بالایی برخور دارند (۶،۸). فیتوالکسین‌ها شامل انواع ترکیبات مختلف نظیر الکالوییدها و کوینون‌ها می باشند. این ترکیبات از جمله ترکیبات اصلی موجود در این گیاه به حساب می‌آیند که یکی از ابزارهای دفاعی گیاه در برابر عوامل میکروبی به خصوص قارچ‌ها هستند (۹). ترکیبات تری‌ترپنی نیز دارای قابلیت ضدباکتریایی بوده (۱۰،۱۱) که بعضی از آن‌ها از طریق ایجاد اختلال در غشای سلولی سبب بروز این اثر می‌شوند (۱۲). لینالول نوعی دیگر از ترکیبات مونوترپنی است که این ترکیب نیز دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی می‌باشد (۱۳). اسید الاژیک نوعی ترکیب پلی فنولیکی است که می‌تواند اثرات مهاری قابل ملاحظه‌ای در رشد *هلیکوباکترپیلوری* داشته باشد. مکانیسم مهاری بر رشد این باکتری با واسطه مهارآنزیم آریلامین N-استیل‌ترانسفراز می‌باشد که آنزیم اصلی در رشد این باکتری است (۱۴،۱۵). اثرات ضدمیکروبی گیاه حرا با استفاده از حلال‌های مختلف بر علیه پاتوژن‌های باکتریایی در تحقیقات متعددی بررسی شده است.

عصاره قسمت‌های هوایی گیاه حرا در پاکستان با استفاده ازحلال‌های اتیل‌استات، استن و متانل با روش سوکسیله (Soxhlet) تهیه و اثر ضدباکتریایی آن بررسی شده است (۱۶).

فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های برگ گیاهان حرای جمع آوری‌شده از جنگل‌های حرا در هندوستان که با روش سوکسیله و با حلال‌های متانل، اتانل، کلروفرم و پترولیم اتر فراهم شد مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷).

اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره برگ‌های بالغ، شاخه‌های جوان، گل و برگ‌های جوان گیاهان مختلف از جمله *اویسینیا مارینا* ازجنگل‌های حرا در سریلانکا با روش سوکسیله و با استفاده از حلال‌های پترولیم اتر، کلروفرم، اتیل‌استات و اتانل تهیه و مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۸).

عصاره‌های برگ و شاخه گیاهان مختلف حرا با استفاده از حلال‌های پترولیم اتر، اتیل‌استات، اتانل و آب با روش سوکسیله از جنگل‌های حرای سریلانکا استخراج و فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها بر باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک ارزیابی شده است (۱۹).

با توجه به روند رو به رشد استفاده از گیاهان دارویی، وجود ترکیبات بیولوژیک فعال موجود در گیاه حرا، وجود اکوسیستم بسیار غنی حرا و نحوه رویش منحصر به فرد این گیاه در استان هرمزگان و هم‌چنین سابقه استفاده دارویی از آن، در این تحقیق اثرات ضدباکتریایی عصاره حاصل از برگ بالغ و شاخه جوان این گیاه، بر ضد گروهی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

الف) تهیه پودر برگ، شاخه و عصاره‌گیری

در مرداد ماه سال ۱۳۹۰ نمونه‌های گیاهی برگ بالغ و شاخه جوان گیاه حرا از خور تیاب در سواحل شمالی دریای عمان با عرض جغرافیایی ۱۸َو ۰۵َ و ۲۷ْ شمالی و طول جغرافیایی ۳۷َ و۵۰َ و ۵۶ْ شرقی که یکی از رویشگاه‌های طبیعی گیاه حرا به شمار می‌آید جمع آوری شد. برگ‌های سبز سالم و شاخه‌های جوان نازک با آب معمولی شسته و به مدت یک‌هفته در سایه خشک شده و با آسیاب برقی به‌صورت پودر در آمدند (۱۸،۱۷،۱۶).

به منظور تهیه عصاره‌ها، ۷۵گرم از پودر برگ بالغ و شاخه جوان با ۹۰۰میلی لیتر از حلال‌های متانل واتیل‌استات (شرکت مرک) با استفاده از دستگاه سوکسیله عصاره‌گیری گردید. سپس عصاره صاف و توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان (Rotary evaporator) تحت حرارت ملایم ۵۰-۳۰ درجه سانتی گراد وفشار پایین تغلیظ شد. عصاره‌های تغلیظ یافته تا زمان استفاده در دمای ۴درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۸،۱۷).

ب) سویه‌های مرجع باکتریایی

جهت انجام این مطالعه، سویه‌های استاندارد گرم منفی *شیگلا دیسانتری* (*Shigella dysenteriae*) (PTCC۱۱۸۸)، گرم مثبت *باسیلوس سابتیلس* (*Bacillus subtilis*) (ATCC٦٦٣٣)، گرم منفی *کلبسیلا نمونیا* (*Klebsiella pneumonia*) (NCTC٥٠٥٦)، گرم مثبت *استرپتوکوکوس پیوژن* (*Streptococcus pyogenes*) (ATCC٨٦٦٨)، گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) (ATCC٦٥٣٨) و گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC٢٧٨٥٣) از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران به‌صورت لیوفیلیزه خریداری و پس از انجام مراحل بازیافت و پرورش میکروبی، آماده استفاده شدند.

ج) بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها:

با استفاده از روش انتشار در چاهک (Agar well diffusion)، عصاره‌های مختلف در معرض آزمایش ضدباکتریایی قرار گرفتند. عصاره‌ها جهت استریل‌شدن از فیلتر سرنگی با قطر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شدند (۱۸).

برای انجام تست چاهک گذاری، ابتدا سوسپانسیون میکروبی از باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت براث، معادل نیم مک فارلند تهیه گردید. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی روی پلیت به قطر۱۰سانتی متر حاوی محیط مولرهینتون آگار ریخته و با گوی‌های شیشه‌ای (Glass spreader) کشت داده شدند. سپس در محیط کشت به‌وسیله پیپت‌های استریل چهار چاهک ایجاد گردید. سه چاهک موجود در پلیت‌ها با مقادیر ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرولیتر از عصاره‌ها با غلظت ۱۰۰ mg/ml پر شد. چاهک باقی‌مانده به‌عنوان کنترل به‌وسیله انواع حلال (بستگی به نوع حلال عصاره) پر گردید. پس از ۴۵دقیقه جهت انتشار بهتر عصاره، پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. اندازه قطرهاله مهار رشد به‌وسیله خط کش (Antibiotic zone scale) برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و آزمایش‌ها در سه بار متوالی تکرار گردیدند (۱۹).

د) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (Minimum Inhibitory Concentration) **و حداقل غلظت کشندگی** (Minimum Bactericidal Concentration)

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش رقت لوله‌ای تعیین گردید (۲۰، ۲۱). برای تعیین MIC هر عصاره، از یک سری ده تایی از لوله‌های آزمایش با رقت‌های مختلف هر عصاره و کنترل‌های مثبت و منفی استفاده شد. هر عصاره با رقت‌های مختلف از لوله شماره یک (۰/۴ mg/ml) تا لوله شماره ۸ (۱۳/۵mg/ml) در محیط کشت نوترینت براث به همراه ۱ml از سوسپانسیون باکتری تهیه گردید. کنترل منفی حاوی ۹ ml محیط کشت و ۱ml از سوسپانسیون باکتری وکنترل مثبت حاوی ۹ ml محیط کشت و ۱ml از عصاره بود. همه لوله‌های آزمایش برای مدت ۲۴ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از طی زمان گرم‌خانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده، مورد بررسی قرار گرفتند (۱۹

و۲۲). از همه لوله‌هایی که در آن‌ها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود، نمونه‌برداری و جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری نتایج بررسی گردید.

این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی با توجه به نوع باکتری (*کلبسیلا نمونیا*، *شیگلا دیسانتری*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سابتیلیس* و *استرپتوکوکوس پیوژن*)، نوع بافت گیاهی(شاخه و برگ)، نوع حلال(اتیل‌استات و متانل) و حجم عصاره (۱۰، ۲۰ و ۳۰میکرولیتر) با استفاده از نرم افزار (Statistical Analysis System (SAS ۹,۱ تجزیه و تحلیل شد و نتایج در سطح ۱٪ آزمون دانکن بررسی گردیدند.

یافته‌ها

اثر ضدباکتریایی عصاره‌های برگ بالغ و شاخه جوان گیاه حرا با استفاده ازحلال‌های متانل و اتیل‌استات با سه مقدار ۱۰، ۲۰ و۳۰ میکرولیتر با غلظت۱۰۰mg/mlبر علیه باکتری‌های مختلف براساس میانگین قطر هاله عدم رشد در جدول(۱) نشان شده است.

بیشترین و کمترین قطر هاله‌های عدم رشد عصاره برگ بالغ گیاه حرا به همراه اتیل‌استات به ترتیب درحجم ۳۰ میکرولیتر برای *شیگلا دیسانتری* با ۲۸ میلی‌متر و درحجم ۱۰ میکرولیتر برای *استرپتوکوکوس پیوژن* با ۱۰/۳ میلی‌متر مشاهده گردید. بیشترین و کمترین قطر هاله‌های عدم رشد عصاره برگ بالغ گیاه حرا با استفاده از حلال متانل به ترتیب درحجم ۳۰ میکرولیتر برای *باسیلوس سابتیلیس* با ۱۸/۷ میلی‌متر و درحجم ۲۰ میکرولیتر برای *شیگلا دیسانتری* با ۱۴ میلی‌متر مشاهده گردید. در تمام موارد فوق بین میانگین‌ها تفاوت معنی داری وجود داشت (P<۰/۰۱).

بیشترین و کمترین قطر هاله‌های عدم رشد عصاره شاخه جوان گیاه حرا با استفاده از حلال اتیل‌استات به ترتیب در حجم ۳۰ میکرولیتر برای *شیگلادیسانتری* با ۲۸ میلی‌متر و در حجم ۱۰ میکرولیتر برای *استرپتوکوکوس پیوژن* با ۱۱/۷ میلی‌متر مشاهده شد. بیشترین و کمترین قطر هاله‌های عدم رشد عصاره شاخه جوان گیاه حرا با استفاده از حلال متانل به‌ترتیب در حجم ۳۰ میکرولیتر برای *استرپتوکوکوس پیوژن* با ۱۶ میلی‌متر و در حجم ۲۰ میکرولیتر برای *استافیلوکوکوس اورئوس* با ۱۰/۳ میلی‌متر مشاهده گردید. در تمام موارد ذکرشده بین میانگین‌ها تفاوت معنی داری وجود داشت (P<۰/۰۱).

عصاره شاخه جوان و برگ گیاه حرا با استفاده از حلال اتیل-استات در حجم ۱۰ میکرولیتر هیچ تاثیری بر باکتری‌های *کلبسیلا نمونیا* و *سودوموناس آئروژینوزا* نداشت. هم‌چنین عصاره برگ گیاه حرا به همراه اتیل‌استات در حجم ۱۰ میکرولیتر تاثیری بر *استافیلوکوکوس اورئوس* نداشت.

از میان باکتری‌های مورد آزمایش، *باسیلوس سابتیلیس* حساس‌ترین و *کلبسیلا نمونیا* مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به تاثیر عصاره‌های مذکور بودند.

جدول (۱)- مقایسه اثر متقابل نوع باکتری، نوع بافت گیاهی، نوع حلال و حجم عصاره بر قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)

نوع حلال و غلظت عصاره		اتیل استات(میکرولیتر)			متانل(میکرولیتر)		
نوع باکتری و نوع بافت گیاهی		۱۰	۲۰	۳۰	۱۰	۲۰	۳۰
کلبسیلا نمونیا	برگ	۰	۱۳/۳	۱۴/۷	۰	۰	۰
	شاخه	۰	۱۳/۷	۱۶/۳	۰	۰	۰
شیگلا دیسانتری	برگ	۱۸/۰	۲۷/۳	۲۸/۰	۰	۱۴/۰	۱۴/۷
	شاخه	۱۹/۰	۲۶/۰	۲۸/۰	۰	۰	۰
سودوموناس آئروژینوزا	برگ	۰	۱۷/۰	۱۹/۳	۰	۱۰/۳	۱۳/۰
	شاخه	۰	۱۷/۳	۱۹/۷	۰	۰	۰
استافیلوکوکوس اورئوس	برگ	۰	۱۵/۷	۱۸/۳	۰	۰	۰
	شاخه	۱۳/۰	۱۷/۳	۱۹/۳	۰	۱۰/۳	۱۳/۰
باسیلوس سابتیلیس	برگ	۱۳/۷	۲۰/۰	۲۳/۷	۰	۱۲/۷	۱۸/۷
	شاخه	۱۵/۰	۲۱/۷	۲۵/۳	۰	۱۱/۷	۱۵/۰
استرپتوکوکوس پیوژن	برگ	۱۰/۳	۱۵/۰	۱۶/۷	۰	۱۵/۷	۱۵/۷
	شاخه	۱۱/۷	۲۲/۰	۲۳/۳	۰	۱۵/۳	۱۶/۰

میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) برای عصاره‌های شاخه با استفاده از حلال اتیل‌استات mg/ml ۱/۵-۰/۴، در عصاره‌های برگ با استفاده از حلال اتیل‌استات mg/ml ۱/۵-۰/۵، در عصاره‌های شاخه با استفاده از حلال متانل mg/ml ۱۳/۵-۲ و عصاره‌های برگ با استفاده از حلال متانل ۱۲mg/ml-۷/۵ به‌دست آمد. میزان حداقل غلظت کشندگی (MBC) برای عصاره شاخه با استفاده از حلال اتیل استات mg/ml ۲-۰/۵، در عصاره برگ با استفاده از حلال اتیل استات mg/ml ۲-۱، عصاره شاخه با استفاده از حلال متانل mg/ml ۱۴-۲/۵ و در عصاره برگ با استفاده از حلال متانل ۱۲/۵mg/ml-۸ تعیین گردید.

کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی رشد(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) برای باکتری *باسیلوس سابتیلیس*به ترتیب ۰/۴mg/ml و ۰/۵ mg/ml با عصاره شاخه با استفاده از حلال اتیل استات و بیشترین مقدار MIC و MBC برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب۱۳/۵mg/ml و ۱۴mg/ml با عصاره شاخه با استفاده از حلال متانل به‌دست آمد (جدول ۲).

جدول (۲)- مقادیر MIC و MBC بر حسب mg/ml عصاره شاخه جوان و برگ گیاه حرا به همراه حلال‌های مختلف

نوع حلال و غلظت عصاره		اتیل استات(میکرولیتر)		متانل(میکرولیتر)	
نوع باکتری و نوع بافت گیاهی		MIC	MBC	MIC	MBC
کلبسیلا نمونیا	برگ	۱/۵	۲	-	-
	شاخه	۱/۵	۲	-	-
شیگلا دیسانتری	برگ	۱	۱/۵	۷/۵	۸
	شاخه	۱	۱/۵	-	-
سودوموناس آئروژینوزا	برگ	۱	۱/۵	۱۰/۵	۱۱
	شاخه	۰/۵	۱	-	-
استافیلوکوکوس اورئوس	برگ	۱/۵	۲	-	-
	شاخه	۱	۱/۵	۱۳/۵	۱۴
باسیلوس سابتیلیس	برگ	۰/۵	۱	۸/۵	۹
	شاخه	۰/۴	۰/۵	۲	۲/۵
استافیلوکوکوس پیوژن	برگ	۱/۵	۲	۱۲	۱۲/۵
	شاخه	۱/۵	۲	۱۱/۵	۱۲

بحث

طی تحقیقی، فعالیت ضدباکتریایی ۱۰۰µl عصاره‌های برگ *اویسینیا* را با استفاده از حلال متانل با غلظت ۱۵۰۰µg/ml با روش چاهک‌گذاری بررسی نمودند. در این مطالعه اثر ضدباکتریایی عصاره متانلی برگ *اویسینیا مارینا* بر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*(MTCC ۹۶) و *باسیلوس سابتیلیس*(MTCC ۴۴۱۱) و گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* (MTCC۷۴۱) و *کلبسیلا نمونیا* (MTCC ۳۹) تعیین گردید که تاثیر ضدباکتریایی عصاره مذکور بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی‌ها گزارش شد (۱۷). در پژوهش حاضر، اثر ضدباکتریایی عصاره‌های برگ بالغ و شاخه جوان گیاه *اویسینیا مارینا* بر ضد چند باکتری پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد و اثر ضدباکتریایی اکثر عصاره‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر مشاهده گردید. دلیل احتمالی این تفاوت را می‌توان در ساختار دیواره سلولی دو دسته باکتری مذکور جستجو کرد. برخلاف باکتری‌های گرم مثبت، لایه لیپوپلی ساکاریدی همراه با پروتیین و فسفولیپیدها قسمت اصلی لایه خارجی باکتری‌های گرم منفی را تشکیل می‌دهد. بنابراین لایه خارجی لیپوپلی ساکاریدی ممکن است مانع دسترسی ترکیبات ضدباکتریایی در لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باشد (۱۹).

هم‌چنین با توجه به جداول ۱ و ۲ مشخص شد که اتیل‌استات حلال مناسب تری نسبت به متانل جهت استخراج ترکیبات ضد

میکروبی گیاه حرا می‌باشد. عصاره‌هایی که با استفاده از حلال اتیل‌استات استخراج گردیدند در مقایسه با عصاره‌هایی که با استفاده از متانل به‌دست آمدند، اثر ضدباکتریایی بیشتری نشان دادند، زیرا احتمالا" عصاره متانل شامل غلظت کمتری از ترکیبات ضدباکتریایی بوده و ترکیبات ضدباکتریایی بیشتری در طی عصاره‌گیری به‌وسیله اتیل‌استات استخراج شده است. فعالیت ضدباکتریایی به‌علت ترکیبات موجود در گیاه می‌باشد، اما بعضی عصاره‌ها فعالیت ضدباکتریایی ندارند. ممکن است باکتری‌های مذکور دارای مکانیسم‌های مقاومتی مثل غیر فعال-سازی آنزیمی، اصلاح جایگاه فعال آنزیم وکاهش تجمع دارویی درون سلولی باشند و یا این‌که غلظت اجزای استفاده‌شده کافی نبوده باشد (۲۳).

طی تحقیقی، فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های برگ بالغ و شاخه گیاه حرا را با استفاده از حلال اتیل‌استات بر گونه‌هایی از *استافیلوکوکوس*، *شیگلا*، *سودوموناس*که از نمونه‌های بالینی زخم، ادرار و خون جدا شده بودند، بررسی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره شاخه اتیل استات در مقایسه با دیگر عصاره‌ها اثر بازدارندگی قوی‌تری دارد (۱۸).

طبق نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌توان بیان داشت که نوع ترکیب و غلظت موثر در بافت شاخه جوان گیاه *اویسینیا مارینا* نسبت به بافت برگ بالغ آن اثر ضد باکتریایی قوی‌تری داشته است زیرا عصاره‌های مختلف شاخه اثربازدارندگی رشد بیشتری نسبت به عصاره‌های برگ آن بر ضدباکتری‌های مورد آزمایش از خود نشان دادند.

طی تحقیقی، اثر ضد باکتریایی عصاره قسمت‌های هوایی گیاه *اویسینیا مارینا* با استفاده از حلال متانل و اتیل‌استات بر باکتری‌های *کلبسیلا نمونیا*، *سودوموناس آئروژینوزا* و گونه هایی از *استافیلوکوکوس* و *استرپتوکوکوس* بررسی گردید. بیشترین تاثیر عصاره متانلی گیاه حرا بر گونه‌ای از باکتری *استافیلوکوکوس* و کمترین تاثیر بر باکتری *کلبسیلا نمونیا* به‌دست آمد. هم‌چنین بیشترین اثر عصاره اتیل‌استاتی گیاه حرا برگونه باکتری *استافیلوکوکوس* و کمترین تاثیر آن بر باکتری *کلبسیلا نمونیا* تعیین گردید (۱۶). در تحقیق حاضر نیز باکتری *کلبسیلا نمونیا* مقاومترین باکتری نسبت به عصاره‌ها بود.

در مطالعه‌ای، فعالیت ضدباکتریایی برگ و شاخه گیاه حرا با استفاده از حلال اتیل‌استات بر باکتری*استافیلوکوکوس اورئوس* و گونه باکتری *پروتئوس*مقاوم به آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که همه عصاره‌ها به همراه اتیل‌استات بیشترین اثر بازدارندگی را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به گونه باکتری *پروتئوس* داشته و نیز عصاره‌های شاخه و برگ گیاه *اویسینیا مارینا* بیشترین اثر مهارکنندگی را بر رشد دو باکتری نشان دادند (۱۹).

در تحقیقی، میزان تغییرات MIC عصاره‌های گیاه حرا با استفاده از حلال متانول mg/ml ۴ - ۰/۱۲۵ و کمتر از عصاره با استفاده از آب بوده و میزان MBC در رابطه با عصاره با استفاده از حلال متانولmg/ml ۸–۰/۲۵ و برای عصاره آبی mg/ml ۳۲به‌دست آمد (۲۴). در تحقیق جاری، میزان تغییرات MIC و MBC بیشتر تعیین گردید، به‌طوری‌که میزان تغییرات MIC در عصاره های شاخه با استفاده از حلال متانول mg/ml ۱۳/۵-۲ و عصاره های برگ با استفاده از حلال متانول mg/ml ۱۲-۷/۵ و میزان حداقل غلظت کشندگی MBC شاخه با استفاده از حلال متانول mg/ml ۱۴-۲/۵ و در عصاره برگ با استفاده از حلال متانول mg/ml ۱۲/۵-۸ به‌دست آمد.

هم‌چنین طی مطالعه‌ای، فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های گیاه حرا با استفاده از حلال متانل و کلروفرم بر باکتری‌های دهانی بررسی گردید. میزان MIC عصاره‌ها با استفاده از حلال متانل mg/ml ۹۰-۵ و در رابطه با عصاره‌ها با استفاده از حلال کلروفرم mg/ml ۱۰۰-۱۵تعیین شد (۲۵).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق اثرات قابل‌توجه فعالیت ضدباکتریایی عصاره شاخه جوان و برگ بالغ گیاه *اویسینیا مارینا* بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به خوبی مشاهده گردید و پیشنهاد می-شود عصاره‌های برگ و شاخه این گیاه با روش‌های دقیق‌تری

آنالیز گردند و مواد موثره آن‌ها تخلیص و جهت تاثیرات ضد میکروبی بررسی شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مدیریت محترم آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی جهرم، آزمایشگاه بیمارستان خاتم الانبیاء خنج و پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان (بندرعباس) سپاس و قدردانی فراوان دارند.

منابع

۱. Kathiresan, K., Binghan, BL. ۲۰۰۱. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. Advances in Marine Biology, ۴۰: ۸۱-۲۵۱.

۲. Safyari, S. ۲۰۰۳. Mangrove forests. Research institute of forests and rangelands. ۳۱۴.

۳. Ghonemi, A. *Avicennia marina*. ۱۹۹۳. In Encyclopedia of the Medicinal plants of the United Arab Emirates, UAE University, AL-Ain; ۵۲۱-۵۲۴.

۴. Bandaranayake, W. ۱۹۹۸. Traditional and medicinal uses of mangroves. Mangroves and Salt Marshes, ۲(۳):۱۳۳-۴۸.

۵. Premanathan, M., Kathiresan K, Yamamoto, N., Nakashima, H. ۱۹۹۹. In vitro anti–human immunodeficiency virus activity of polysaccharide from *Rhizophora mucronata* Poir. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, ۶۳(۷): ۱۱۸۷-۹۱.

۶. Itoigawa, M., Ito, C., Tan, H.T.W., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H. ۲۰۰۱. Cancer chemopreventive activity of naphthoquinones and their analogs from Avicennia plants. Cancer letters, ۱۷۴(۲): ۱۳۵-۹.

۷. Macintosh, D., Zisman, S. ۱۹۹۹. The status of mangrove ecosystems: trends in the utilisation and management of mangrove resources. Available at http://iufro.ffp.csiro.au/iufro/iufronet/d۱/wu۱۰۷۰۰/unpub/macint۹۵.htm.

۸. Khafagi, I., Gab-Alla, A., Salama, W., Fouda, M. ۲۰۰۳. Biological activities and phytochemical constituents of the gray mangrove *Avicennia marina* (Forssk) Vierh. Egyptian Journal of Biology, ۵: ۶۲-۹.

۹. Bandaranayake, W.M. ۲۰۰۲. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. Wetlands Ecology and Management, ۱۰:۴۲۱ -۵۲.

۱۰. Ahmed, A.A., Mahmoud, A.A., Williams, H.J., Scott, A.I., Reibenspies, J.H., Mabry, T.J. ۱۹۹۹. New sesquiterpene alpha-methylene lactones from the Egyptian plant *Jasoniacandicans*. Journal of Natural Products, ۵۶(۸):۱۲۷۶ –۸۰.

۱۱. Himejima, M., Hobson, K.R., Otsuka, T., Wood, D.L., Kubo, I. ۱۹۹۲. Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree pinus ponderosa: adefense mechanism against microbial invasion. Journal of Chemical Ecology, ۱۸(۱۰):۱۸۰۹ –۱۸.

۱۲. Mendoza, L., Wilkens, M., Urzua, A. ۱۹۹۷. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean Pseudognaphalium

(Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology, ۵۸(۲): ۸۵- ۸.

۱۳. Pattnaik, S., Sabramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole CR. ۱۹۹۷. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. Microbios, ۸۹:۳۹ -۴۶.

۱۴. Chung, J.G. ۱۹۹۸. Inhibitory actions of ellagic acid an growth and arylamin N-acetyltransferase activity in strain of *Helicobacter pylori*from peptic ulcer patients. Microbios, ۹۳: ۱۱۵ -۲۷.

۱۵. Iino, T., Tashima, K., Umeda, M., Ogawa, Y., Takeeda, M., Takata, K., Takeuchi, K. ۲۰۰۲. Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rat stomachs following ammonia or reperfusion. Life Sciences, ۷۰(۱۰): ۱۱۳۹-۵۰.

۱۶. Subashree, M., Mala, P., Umamaheswari, M., Jayakumari, M., Maheswari, K., Sevanthi, T., Manikandan, T. ۲۰۱۰. Screening of the antibacterial properties of *Avicennia marina* from pichavaram mangrove. International Journal of Current Research, ۱: ۱۶-۱۹.

۱۷. Kumar, V.A., Ammani, K., Siddhardha, B. ۲۰۱۱. In vitro antimicrobial activity of leaf extracts of certain mangrove plants collected from Godavari estuarine of Konaseema delta, India. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants, ۱(۲):۱۳۲-۱۳۶.

۱۸. Abeysinghe, P.D., Wanigatunge, R.P., Pathirana, RN. ۲۰۰۶. Evaluation of antibacterial activity of different mangrove plant extracts. Ruhuna Journal of Science, ۱: ۱۰۴-۱۱۲.

۱۹. Abeysinghe, P. D. ۲۰۱۰. Antibacterial activity of some medicinal mangroves against antibiotic resistant pathogenic bacteria. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, ۷۲(۲): ۱۶۷-۱۷۲.

۲۰. Vanden Berghe, D.A., Vlietinck. A.J. ۱۹۹۱. Screening for antibacterial and antiviral agents, In: Hostettmann, K. (Ed.), Methods in Plant Biochemistry, Vol. ۶, Academic Press, London, pp. ۴۷-۶۹.

۲۱. Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Cos, P., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A., VandenBerghe, D. ۱۹۹۹. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activites. Journal of Ethnopharmacology, ۶۵(۱): ۷۱-۷.

۲۲. Bandaranayake, W.M. ۱۹۹۵. Survey of mangrove plants from Northern Australia for phytochemical constituents and UV-absorbing compounds. Current Topics in Phytochemistry, ۱۴: ۶۹-۷۸.

۲۳. Schwarz, S., Noble, W.C. ۱۹۹۹. Aspects of bacterial resistance to antimicrobials used in veterinary dermatological practice. Veterinary Dermatology, ۱۰(۳): ۱۶۳-۱۷۶.

۲۴. Chandrasekaran M., Kannathasan K., Venkatesalu, V., Prabhakar, K. ۲۰۰۹. Antibacterial activity of some salt marsh halophytes and mangrove plants against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. World Journal

Avicennia alba on selected plant and oral pathogens. Internatinal Journal of ChemTech Research, ۱(۴): ۱۲۱۳-۱۲۱۶.

of Microbiology and Biotechnology, ۲۵:۱۵۵-۱۶o.

۲۵. Vadlapudi, V., Naidu K.C. ۲۰۰۹. Bioactivity of marine mangrove plant

Evaluation of antibacterial activity of *Avicennia marina* young branch and mature leaf extract in Khoor-e-Tiab, Hormozgan province

Farshid Kafilzadeh[۱] *(Corresponding author)*

Kafilzadeh@jia.ac.ir

Shekoufeh Zeinali[۲]

Kavous Solhjoo[۳]

Abstract

Introduction and objective: Many pathogens responsible for human disease have become resistant to antibiotics and therefore finding new antibacterial agents are essential. Regarding to the fact that mangrove plant (*Avicennia marina*) has been used in traditional herbal medicine in south of Iran, this study has been designed to identify the antibacterial effect of extract of mature leaf and young branch of the mangrove plant.

Methods: The extracts of dried leaf and branch were prepared using Soxhlet extraction method and ethyl acetate and methanol were used as solvents. Then the antibacterial effects of this plant were screened by using well agar diffusion technique against few gram positive and negative bacteria, in three different volumes of ۱۰, ۲۰, and ۳۰ microliter, with concentration of ۱۰۰mg/ml and the diameter of inhibitory zone was measured. Also MIC and MBC of extract of leaf and branch of mangrove plant were measured.

Results: The highest inhibitory zone (۲۸mm) with ethyl acetate extract of both branch and leaf of mangrove plant in volume of ۳۰ µl, was in *Shigella dysenteriae*. Lowest MIC (۰٫٤mg/ml), MBC (۰٫٥mg/ml) with extracts of branch using ethyl acetate as solvent was shown for *Bacillus subtilis*.

Conclusions: Results of this research has shown that extract from branch of mangrove plant using ethyl acetate as solvent has beneficial antibacterial effect against gram positive bacteria and it appears that plant structure of the branch has bigger active biological antimicrobial effect in compare to leaf.

۱- Associate Professor, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

۲- Master of Science in Microbiology, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

۳- Assistant Professor, Department of Microbiology, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Keywords: *Avicennia marina*, Mangrove plant, Antibacterial effect, Khoor-e-Tiab, Bandar Abbas