مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
بهار ۱۳۹۳؛۶(۱):۱۰۹-۹۹

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Spring2014;6(1): 99-109

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی برگ گیاه حرا (Avicennia marina) بر میکروارگانیسم های عامل عفونت و مسمومیت در شرایط آزمایشگاهی

بهروز علیزاده بهبهانی[*1]*، فریده طباطبایی یزدی*[2]*، فخری شهیدی*[3]*، محبت محبی*[2]*، علیرضا وسیعی*[4]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[2] دانشیار و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[3] استاد و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[4] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[*] **نویسنده مسئول**: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد
پست الکترونیک: behrooz66behbahani@gmail.com

وصول:۹۱/۱۰/۱۱ اصلاح:۹۱/۱۲/۲ پذیرش:۹۱/۱۲/۲۱

چکیده

زمینه و اهداف: گیاه حرا با نام علمی Avicennia marina (Forssk.) Vierh رایج ترین گونه این گیاهان در جنگل‌های مانگرو ایران است. با توجه به وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال و استفاده سنتی از برگ آن جهت درمان آبله و زخم‌ها، به نظر می‌رسد این گیاه دارای اثرات ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای باشد. هدف از این پژوهش ارزیابی اثر ضد میکروبی غلظت های مختلف برگ گیاه حرا بر سه میکروارگانیسم شاخص عامل عفونت و مسمومیت در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش کار: اثر ضد میکروبی عصاره به دو روش تمام ظرف و انتشار در آگار بر میکروارگانیسم‌های Staphylococcus aureus PTCC 1337، Escherichia coli PTCC 1330 و Penicillium digitatum PTCC 5251 مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC)، (MBC) با استفاده از روش رقت لوله ای تعیین گردید.

یافته‌ها: همه غلظت‌های عصاره الکلی بر Staphylococcus aureus و Penicillium digitatum اثر بازدارندگی داشت. عصاره آبی در غلظت ۶۰ و ۸۰ درصد بر Staphylococcus aureus و غلظت ۸۰ درصد بر Penicillium digitatum اثر بازدارندگی داشت. عصاره الکلی در غلظت ۶۰ و ۸۰ درصد بر Escherichia coli موثر بود. MFC عصاره الکلی و آبی برگ گیاه حرا برای پنی‌سیلیوم ۱۶mg/ml و Escherichia coli ۶۴mg/ml بود. بیشترین مقاومت را به عصاره‌های آبی و الکلی نشان داد.

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی در مقایسه با عصاره آبی اثر بازدارندگی بیشتر و موثرتری روی هر سه سوش میکروبی داشت. عصاره برگ گیاه حرا در شرایط in vitro دارای اثر ضدمیکروبی قابل ملاحظه ای بر روی سویه‌های مورد مطالعه داشت.

واژه های کلیدی: مانگرو، عصاره آبی و اتانولی، اثرات ضد میکروبی

مقدمه

خواص درمانی گیاهان دارویی از دیرباز برای انسان مشخص بوده و بشر آن ها را به عناوین مختلف در درمان بیماری ها و زخم ها به کار می برده است. پیشرفت های علمی و فن آوری طی سه دهه اخیر اهمیت و نقش سازنده گیاهان دارویی را در تامین نیازهای بشر به ویژه در حیطه دارو و درمان را دو چندان ساخته است. اثر گیاهان دارویی از دوران باستان برای انسان به خوبی شناخته شده بود [۱]. از اواخر قرن نوزدهم آزمایش های خاصی در زمینه بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی گیاهان معطر و اجزای آن ها به ثبت رسیده است [۲]. اولین آزمایشات اندازه گیری خصوصیات ضد باکتریایی اسانس های روغنی به وسیله دلارویکس در سال ۱۸۸۱ انجام گرفت [۱،۳].

مطالعات حاکی از آن است که گیاهان به عنوان منابع غنی از ترکیبات ضد میکروبی، حاوی مقادیر قابل توجهی از انواع ترکیبات فنولی از قبیل اسیدهای فنولیک،

فلاونوئیدها، تانن‌ها و دی ترپن های فنولی می باشد. به همین دلیل، امروزه استفاده از گروه وسیعی از گیاهان به ویژه گیاهان دارویی مورد توجه محققین قرار گرفته است [۴]. گیاه حرا به عنوان یکی از غالب ترین گونه های گیاهی اکوسیستم مانگرو دارای توانایی های بالقوه ای می باشد. گیاهان مانگرو که مجموعه ای از گیاهان شور پسند و مقاوم به نمک دریا بوده و در قالب جنگل های جزرومدی دریایی به صورت پراکنده در بعضی نقاط دنیا شکل گرفته اند، دارای انواع ترکیبات شیمیایی و بیولوژیکی می باشد [۵]. انتشار گیاه حرا در ایران به نواحی حاشیه ی خلیج فارس همچون بلوچستان، بندر خمیر، جزیره قشم، لافت، بندر گواتر و بندر دیر محدود می شود. انتشار جهانی این گیاه در سواحل و مرداب های ساحلی مصر و عربستان، باتلاق‌ها و مرداب‌های ساحلی دریای سرخ، دریای عربی از سواحل پاکستان تا بمبئی در هندوستان می باشد [۶].

عنصر اصلی سازنده جنگل های مانگرو گونه ای به نام Avicennia marina است که به نام دانشمند بزرگ ایرانی ابوعلی سینا نامگذاری شده و از مقاوم ترین گونه های مانگرو موجود در جهان است. پوشش انبوه گیاه حرا با یک تاریخچه طولانی در طب سنتی برای درمان آبله، زخم‌ها و روماتیسم در نواحی جنوبی ایران بسیار حائز اهمیت بوده و بررسی هر چه بیشتر خصوصیات بالقوه اش از ارزش بالایی برخوردار است [۷]. ۹۰درصد از عفونت ها توسط باکتری ها ایجاد می گردد، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و گونه های پروتئوس، از جمله مهم ترین عوامل مسبب عفونت هستند. قارچ هایی همانند پنی‌سیلیوم می‌تواند اثرات زیان‌باری بر سلامت انسان داشته باشد و منجر به بروز عفونت، آلرژی و حتی عوارض توکسیک ناشی از تماس با این عوامل گردد.

بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی برگ گیاه حرا علیه برخی از پاتوژن-های عامل بیماری‌های عفونتی، تنفسی و آلرژی می‌باشد.

روش‌کار

برگ‌های تازه گیاه حرا از جزیره قشم جمع آوری شد. سپس، برگ ها در شرایط مناسب و در سایه خشک گردید و جهت تهیه عصاره با آسیاب خرد شدند. برای تهیه عصاره از روش خیساندن استفاده شد. به این صورت که مقدار g ۵۰ از پودر برگ گیاه حرا را به ml ۲۵۰ اتانول ۹۶ درجه یا آب مقطر به آن اضافه شد. برای عصاره الکلی مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و هر چند ساعت یک بار با یک میله شیشه ای به هم زده شد. مخلوط آبی نیز به مدت ۲۰ دقیقه با شعله پایین جوشانده شد تا مایع کرم رنگی به دست آمد. مایع رویی پس از جمع آوری با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره به دست آمده (مایع رویی) را با اتانول یا آب مقطر به حجم اولیه رسانده، پس از عبور از صافی µ ۰/۴۵ در ظرف تیره ریخته و تا انجام آزمایشات در دمای یخچال نگهداری شد [۸]. برای تعیین وزن خشک عصاره های آبی و الکلی برگ گیاه حرا ابتدا وزن یک لوله آزمایش تعیین و پس از آن ۱ml از عصاره های آبی و الکلی در آن ریخته شد، سپس محتوی لوله در دمای اتاق خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره، وزن لوله آزمایش مجددا تعیین شد. اختلاف وزن لوله معادل با وزن ml ۱ از عصاره های آبی یا الکلی است. میانگین سه بار تکرار، به عنوان وزن خشک عصاره محاسبه شد.

سویه های میکروبی Staphylococcus aureus PTCC 1337، E coli PTCC 1330T و Penicillium PTCC 5251 digitatum از دانشکده داروسازی دانشگاه فردوسی تهیه و برای هر آزمون جهت بررسی اثرات ضد میکروبی هر بار کشت تازه تهیه گردید. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت تازه از هرمیکروارگانیسم 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 شسته شد 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 اندازه گیری شد. و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق شد. سوسپانسیون تولیدی بایستی حاوی CFU/ml ۱.۵×۱۰^{۸} باشد [۹،۱۰].

فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی برگ گیاه حرا با استفاده از دو روش اضافه نمودن عصاره به محیط کشت (تمام ظرف) و روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی شد. در روش تمام ظرف ۲/ . گرم از عصاره آبی و الکلی 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 گشت غلظت نهایی عصاره در این حالت ۲۰۰۰ µg/ml می باشد [۱۱]. در مرحله بعد محیط کشت استریل مولر هینتون آگار (مرک آلمان) برای باکتری و محیط کشت سابروز دکستروز آگار برای کپک پنی سیلیوم به ظرف های پتری اضافه شده و در دمای اتاق قرار گرفت تا اینکه محیط کشت ها ببندند. یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط ها کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای باکتری ها و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد برای کپک پنی سیلیوم قرار گرفت. از محیط دارای عصاره و بدون باکتری و کپک نیز به عنوان کنترل استفاده شد [۱۱،۱۲]. 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 ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ درصد عصاره ها درآب 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 گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد برای باکتری ها و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد برای کپک پنی سیلیوم با استفاده از خط کش به طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. تمامی آزمایشات با ۳ تکرار انجام گرفت [۱۳].

با استفاده از روش رقت لوله ای، حداقل غلظت مهارکننده 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 یک لوله هم به عنوان کنترل بکار رفت. پس از کشت تمام لوله های آزمایش به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد برای قارچ پنی سیلیوم و به مدت ۲۴ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای باکتری گرمخانه گذاری شد. پس از طی زمان گرمخانه 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 [۱۴].

با استفاده از روش رقت لوله ای حداقل غلظت کشندگی(MFC و MBC) عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا تعیین گردید. برای تعیین MFC و MBC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت های مختلف هر عصاره یک لوله هم به عنوان کنترل بکار رفت. پس از کشت تمام لوله های آزمایش به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد برای قارچ پنی سیلیوم و به مدت ۲۴ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای باکتری گرمخانه گذاری شد. از تمام لوله های که هیچ رشدی در آنها مشاهده نشده بود نمونه برداری و جهت تعیین MFC و MBC کشت داده شدند. لوله ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به عنوان MFC و MBC در نظر گرفته شد. این روش برای هر دو عصاره آبی و اتانولی و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد [۱۵].

برای محاسبات آماری از نرم افزار SPSS استفاده شد، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) جهت مقایسه میانگین ها و از آزمون Tukey جهت بررسی اختلاف بین میانگین ها استفاده گردید.

یافته ها

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی به روش تمام ظرف در جدول ۱ آورده شده است. این نتایج نشان می دهد که عصاره آبی و الکلی درغلظت ۲۰۰۰µg/ml برروی S. aureus کاملا موثر بوده و از رشد آن ها بر روی محیط کشت جلوگیری به عمل آورد. عصاره الکلی درغلظت ۲۰۰۰ µg/ml برروی P.digitatum کاملا موثر بوده، اما عصاره آبی درغلظت ۲۰۰۰ µg/ml برروی P.digitatum موثر نبوده و از رشد آن ها بر روی محیط

جدول ۱: اثر فعالیت ضد میکروبی غلظت µg/ml ۲۰۰۰ عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا بر استافیلو کوکوس ارئوس، اشرشیا کلی وپنی‌سیلیوم دیجیتاتوم (روش تمام ظرف)

میکروارگانیسم	عصاره آبی برگ گیاه حرا
Escherichia coli PTCC 1330	–
Staphylococcus aureus PTCC 1337	+
Penicillium digitatum PTCC 5251	–
میکروارگانیسم	عصاره اتانولی برگ گیاه حرا
Escherichia coli PTCC 1330	–
Staphylococcus aureus PTCC 1337	+
Penicillium PTCC 5251 digitatum	+

- علامت (-) نشان دهنده رشد میکروارگانیسم بر روی محیط کشت و عدم وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا می باشد.

- علامت (+)نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم بر روی محیط کشت و وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا می باشد.

کشت جلوگیری به عمل نیاورد. هر دو عصاره آبی و الکلی در غلظت µg/ml ۲۰۰۰ فاقد اثر ضد باکتریایی مشخصی بر روی E. coli بوده و قادر به جلوگیری از رشد این باکتری بر روی محیط کشت نمی باشد. نتایج حاصله از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی برگ گیاه حرا به روش انتشار در آگار در (جدول ۲) آورده شده است. این نتایج نشان می دهد که عصاره الکلی برگ گیاه حرا در تمامی غلظت ها (۲۰، ۴۰، ۶۰ و۸۰ ٪) بر روی P.digitatumو S. aureus دارای اثر بازدارندگی بود. درمورد تاثیر عصاره آبی بر رویS. aureus در غلظت های ۶۰ و ۸۰ ٪ عصاره آبی از رشد این باکتری جلوگیری کرد، اما غلظت های ۲۰ و۴۰ ٪ اثر بازدارندگی مشاهده نشد. هم چنین غلظت های۲۰، ۴۰و ۶۰ ٪ عصاره آبی روی P.digitatum موثر نبوده، وفقط غلظت ۸۰ ٪ عصاره آبی برگ گیاه حرا اثر بازدارندگی را نشان داد. در تمامی غلظت های عصاره آبی برگ گیاه حرا هیچ گونه اثر ضد باکتریایی بر روی E. coli مشاهده نشد. همچنین غلظت های ۲۰ و ۴۰ ٪ عصاره الکلی برگ گیاه حرا قادر به جلوگیری از رشد باکتریE. coli نبود، اما در غلظت های ۶۰ و ۸۰ ٪ عصاره الکلی از رشد این باکتری جلوگیری کرد. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا در (جدول ۳ و نمودار۱) آورده شده است. نتایج نشان می دهد MIC عصاره اتانولی برگ گیاه حرا برای قارچ پنی‌سیلیوم ۸mg/ml، استافیلو کوکوس ارئوس ۴mg/ml و برای اشرشیا کلی mg/ml ۱۶بود، در حالیکه MIC عصاره آبی برای قارچ پنی‌سیلیوم ۳۲mg/ml، استافیلوکوکوس ارئوس ۱۶mg/ml و برای اشرشیا کلی ۶۴mg/ml بود. نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی MFC عصاره های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا در جدول ۴ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد MFC عصاره اتانولی برگ گیاه حرا برای قارچ پنی‌سیلیوم ۱۶mg/ml، MFC عصاره آبی برای قارچ پنی‌سیلیوم - ۶۴mg/ml بود. نتایج حاصل از حداقل غلظت کشندگی MBC عصاره های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا در جدول ۵ آورده شده است. نتایج نشان می دهد MBC عصاره اتانولی استافیلوکوکوس ارئوس ۸mg/ml و برای اشرشیا کلی mg/ml ۱۶بود، در حالیکه MBC عصاره آبی استافیلو کوکوس ارئوس ۳۲mg/ml و برای اشرشیا کلی ۱۲۸mg/ml بود.

جدول۲: میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا بر استافیلو کوکوس ارئوس، اشرشیا کلی وپنی-سیلیوم دیجیتاتوم (انتشار در آگار)

میکروارگانیسم			استافیلوکوکوس ارئوس	
غلظت عصاره آبی برگ گیاه حرا (٪)	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر	-	-	۲۸/۰±۷/۳۰	۵۷/۰±۹/۱۰

میکروارگانیسم			اشرشیاکلی	
غلظت عصاره آبی برگ گیاه حرا (٪)	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر	-	-	-	-

میکروارگانیسم			پنی سیلیوم دیجیتاتوم	
غلظت عصاره آبی برگ گیاه حرا (٪)	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر	-	-	-	۲۸/۰±۷/۱۰

میکروارگانیسم			استافیلو کوکوس ارئوس	
غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه حرا (٪)	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر	۵۰/۰±۱۴/۲۰	۵۷/۰± ۱۶/۴۰	۲۸/۰±۱۹/۱۰	۵۷/۰± ۲۱/۵۰

میکروارگانیسم			اشرشیاکلی	
غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه حرا (٪)	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر	-	-	۲۸/۰±۷/۳۰	۲۸/۰±۹/۴۰

میکروارگانیسم			پنی سیلیوم دیجیتاتوم	
غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه حرا (٪)	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر	۵۷/۰±۶/۵۰	۵۷/۰±۷/۲۰	۲۸/۰±۱۱/۱۰	۲۸/۰±۱۳/۳۰

- علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا می باشد.

جدول۳: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا

غلظت عصاره آبی برگ گیاه حرا (mg/ml)							
کنترل	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	میکروارگانیسم
-	-	-	-	+	+	+	استافیلو کوکوس ارئوس
-	-	-	-	-	-	+	اشرشیا کلی
-	-	-	-	-	+	+	پنی سیلیوم
غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه حرا (mg/ml)							
کنترل	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	میکروارگانیسم
-	-	+	+	+	+	+	استافیلو کوکوس ارئوس
-	-	-	-	+	+	+	اشرشیا کلی
-	-	-	+	+	+	+	پنی سیلیوم

+: عدم رشد

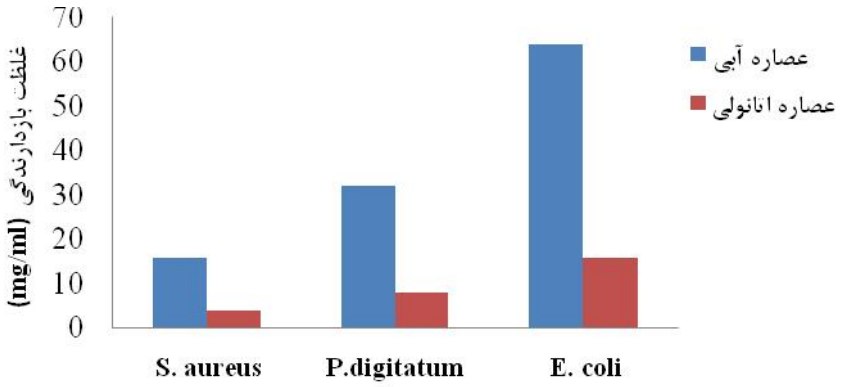
-: رشد

جدول ۴: نتایج حداقل غلظت کشندگی (MFC) عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا

غلظت عصاره آبی برگ گیاه حرا (mg/ml)								
کنترل	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	میکروارگانیسم
-	-	-	-	-	-	+	+	+	پنی سیلیوم دیجیتاتوم
غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه حرا (mg/ml)								
کنترل	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	میکروارگانیسم
-	-	-	-	+	+	+	+	+	پنی سیلیوم دیجیتاتوم

+: عدم رشد

-: رشد



نمودار۱- مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا

جدول۵: نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه حرا

(mg/ml) غلظت عصاره آبی برگ گیاه حرا									
کنترل	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	میکروارگانیسم
-	-	-	-	-	+	+	+	+	استافیلو کوکوس ارئوس
-	-	-	-	-	-	-	+	+	اشرشیاکلی

(mg/ml) غلظت عصاره اتانولی برگ گیاه حرا									
کنترل	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	میکروارگانیسم
-	-	-	+	+	+	+	+	+	استافیلو کوکوس ارئوس
-	-	-	-	+	+	+	+	+	اشرشیاکلی

+: عدم رشد

-: رشد

بحث

استفاده از گیاهان دارویی از گذشته های دور در سنت ملل مختلف، جهت درمان بیماری ها رواج داشته است. اغلب اسانس ها و عصاره ها به عنوان منبع ترکیبات ضد میکروبی، از گیاهان خاص و بومی منطقه تامین می شده است. به همین دلیل در این پژوهش به بررسی اثرات ضد میکروبی برگ گیاه حرا پرداخته شد. براساس نتایج به دست آمده عصاره آبی و اتانولی حاصل از برگ گیاه حرا فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این پژوهش داشت. اثر ضد میکروبی هر عصاره بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود، به طوریکه باکتری گرم مثبت استافیلو کوکوس ارئوس در مقایسه با باکتری گرم منفی اشرشیاکلی حساسیت بیشتری داشت (جدول۲) و در غلظت کمتری از عصاره حاصل از برگ گیاه حرا اثر بازدارندگی را نشان داد. به طور کلی باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به روغن های فرار برگ گیاه حرا از خود نشان می دهند، علت آن اختلاف ساختمانی دیواره باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی می باشد، به طوری که باکتری های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ترکیب موکوپپتید بوده، در حالی که باکتری های گرم منفی فقط لایه نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آن ها لیپوپروتئین و لیپو پلی ساکارید است به همین دلیل باکتری های گرم منفی مقاوم ترند [۱۶،۱۷]. این مطالب با نتایج به دست آمده در این پژوهش همخوانی داشت. پونیکالین و پونیکالاگین از جمله اصلی ترین تانین‌های موجود در گیاهان مانگرو می باشد. در طی مطالعات آزمایشگاهی مشخص شده است که پونیکالاگین قادر به مهار رشد مایکوباکتریوم تربوکلوزیس انسانی در غلظت های ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۱/۲ میلی گرم در میلی لیتر، بوده است. در طب سنتی از این دو ترکیب برای درمان هپاتیت و درماتیت استفاده می شده است. به علاوه در طی مطالعه ای که لین[1] و همکاران انجام دادند مشاهده کردند که این دو ترکیب دارای خصوصیات آنتی اکسیدانی نیز می باشند [۱۸].

نتایج نشان می دهد که عصاره آبی برگ گیاه حرا در مقایسه با عصاره اتانولی برگ گیاه حرا در غلظت های بالاتر اثر ضد میکروبی دارد به طوری که عصاره الکلی برگ گیاه حرا در تمامی غلظت ها (۲۰، ۴۰، ۶۰ و۸۰ ٪) روی P.digitatumو S. aureus اثر بازدارندگی داشت اما عصاره آبی در غلظت های ۶۰ و ۸۰ ٪ بر روی S. aureus و غلظت ۸۰ ٪ بر رویP.digitatum اثر بازدارندگی را نشان داد، همچنین تمامی غلظت های عصاره آبی برگ گیاه حرا فاقد اثر ضد باکتریایی بر روی E. coli بود، در حالی که عصاره اتانولی برگ گیاه حرا در غلظت های ۶۰ و ۸۰ ٪ از رشد این باکتری جلوگیری کرد. در نتیجه می-توان بیان نمود که عصاره الکلی در مقایسه با عصاره آبی موثرتر بوده و دارای قدرت بازدارندگی بیشتری است که علت آن ممکن است استخراج بیشتر مواد موثر در برگ گیاه حرا به وسیله اتانول بوده باشد. که این نتیجه با یافته های مطالعه ای که توسط مهاسنه[2] 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 سودوموناس ائروژینوزا می باشد هم خوانی دارد[۱۹]. همچنین تیان[3] و همکاران در بررسی اثرات ضد باکتریایی Galla chinesis (نوعی گیاه دارویی بومی کشور چین است)، گزارش داد که عصاره های استراج شده توسط حلال های اتیل استات، اتانول و آب به ترتیب بیشترین اثر ضد باکتریایی را دارند. در این مطالعه، باکتری‌های گرم مثبت (باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سوبتلیس) حساسیت بیشتری را نسبت به باکتری‌های گرم منفی (اشرشیاکلی، شیگیلا دیسانتریا) در مقابل عصاره های گیاهی نشان دادند این نتایج با یافته های این مطالعه همخوانی داشت [۲۰]. در تحقیقی دیگر زرگری[4] و همکاران اثر آنتی باکتریال گیاه .Triticum sativum Lam مورد مطالعه قرار دادند و آزمایش هایی به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره های آبی، اتانولی، اتیل اتری و هگزانی گیاه گندم بر روی چند میکروارگانیسم انجام شد و به

1- Lin

2 -Mahasneh
3 -Tian
4 -Zargari

ماهیت ضدمیکروبی گیاه پی بردند. از نتایج این بررسی مشخص شد عصاره آبی هیچ گونه اثر ضد میکروبی نداشته و به عکس، عصاره های آلی بر باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی اثر بهتری اعمال نموده است. این نتیجه با یافته های این مطالعه (جدول۲) مطابقت دارد [۲۱].

غلظت MIC عصاره اتانولی برگ گیاه حرا برای استافیلوکوکوس ارئوس ۴mg/ml و برای اشرشیا کلی ۱۶ mg/mlبود، در حالیکه MIC عصاره آبی برای استافیلوکوکوس ارئوس ۱۶mg/ml و برای اشرشیا کلی ۶۴mg/ml بود. مکانیسم های مختلفی برای توجیه ضد میکروبی بیان شده است، کتزوکیدو[1] و همکاران دریافتند که ترکیبات ضد میکروبی در عصاره برگ گیاهان ضمن تداخل با غشای فسفو لیپیدی دو لایه ای، نفوذ پذیری غشای سلول های میکروبی را تحت تاثیر قرار داده و موجب خروج ترکیبات درون سلولی می گردند [۲۲]. بسیاری از مطالعات مکانیسم اثر را بر دیواره سلولی می دانند و گزارش نموده اند که دیواره سلولی و غشای سلولی تحت تاثیر قرار گرفته و نفوذ پذیری آنها تغییر می نماید و باعث آزاد سازی محتویات درون سلولی می گردد که می تواند با مختل کردن عملکرد غشا مثل انتقال الکترونی، فعالیت آنزیمی یا جذب مواد مغذی همراه باشد. شالکون‌ها نیز از جمله ترکیبات فلاونوئیدی در گیاهان مانگرو به حساب می آیند در مطالعه ای که ساتو[2] و همکاران بر روی این ترکیب انجام دادند مشخص شد که از این ترکیب می توان جهت درمان استوماتیت های باکتریایی استفاده نمود [۲۳]. غلظت MBC عصاره اتانولی استافیلوکوکوس ارئوس ۸mg/ml و برای اشرشیا کلی ۱۶ mg/mlبود، در حالیکه MBC عصاره آبی استافیلوکوکوس ارئوس ۳۲mg/ml و برای اشرشیا کلی ۱۲۸mg/ml بود. برت[3] و همکاران وجود یک غشای خارجی هیدروفیل متشکل از لیپو پروتئین ها و لیپوپلی ساکارید با خاصیت نفوذ پذیری انتخابی را در باکتری های گرم منفی از عوامل مهم در مقاومت آن ها نسبت به ترکیبات ضد میکروبی می دانند [۲۴]. نتایج نشان داد که MFC عصاره اتانولی برگ گیاه حرا برای قارچ پنی‌سیلیوم ۱۶mg/ml و MFC عصاره آبی قارچ پنی‌سیلیوم ۶۴mg/ml بود. از جمله ترکیبات فعال موجود در گیاه حرا لاتکس می باشد، اگر چه این ترکیب منجر به بروز آلرژی می شود ولی ازسوی دیگر تا حدی از رشد قارچها نیزمی تواند ممانعت به عمل آورد. به علاوه باکتری‌های موجود در خاک و مخمرها منجر به تجزیه و غیرفعال کردن این ماده در محیط می شوند و لذا از اثرات مخرب و سمی این ترکیب در محیط جلوگیری به‌عمل می آورند. در طب سنتی از لاتکس، برای درمان زخم ها استفاده می شود [۲۵]. زانتون‌ها از جمله مواد بسیار فعال موجود در این گیاهان می باشند. این ترکیبات دارای خصوصیاتی نظیر سایتوتوکسیسیتی، خواص ضد توموری، ضد التهابی، ضد قارچی، افزایش فعالیت کولین استیل ترانسفراز و مهار آنزیم لیپید پراکسیداز می باشد [۷]. بنابراین میتوان فعالیت ضد قارچی عصاره برگ گیاه حرا را به این ترکیبات نسبت داد.

تاکنون تنها برخی از ترکیبات این گیاه شناسایی شده است که می‌توان تاثیرات ضد میکروبی عصاره برگ حرا را به آن‌ها نسبت داد. از جمله این ترکیبات میتوان به 2-Benzoxazolin اشاره نمود این ترکیب دارای خصوصیات ضد تبی، خواب آوری و شل کنندگی عضلانی می باشد. هم چنین منجر به بروز مقاومت نسبت به قارچ ها نیز می شود. مشتقات ریبوزاین را می توان به عنوان عوامل ضد سرطانی و ضد ویروسی بکار برد [۲۶]. جانگ سوات[4] و همکاران در سال ۱۹۸۱ دریافتند که عصاره گیاه حرا بر روی موش‌های آزمایشگاهی هیچ اثر سویی نداشته و دارای خاصیت آنتی لوکمیک قابل ملاحظه ای نیز است [۷]. ماده روتنون از جمله ترکیبات بیواکتیو بسیار فعال در گیاهان مانگرو می باشد. این ترکیب نوعی سم ماهی به حساب می آید و دارای فعالیت حشره کشی نیز می باشد. این ترکیب به فراوانی در گونه های گرمسیری نظیر Lonchocarpus، Derris Tephrosia یافت می شود [۲۷].

لوپئول و گوزیپول از جمله ترکیبات تری ترپنوئیدی هستند که در گونه Thespesia populnea به فراوانی

1 -Kotzekidou
2 -Sato
3- Burt
4- Jongsuvat

یافت می شود و خصوصیات ضد میکروبی برگهای این گونه را وابسته به وجود این دو ترکیب دانسته اند [۲۸].
لینالول نوعی ترکیب مونوترپنی است که در طب سنتی استفاده های فراوانی داشته و در گیاهان مانگرو نیز یافت می شود. این ترکیب دارای اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی قابل ملاحظه ای نیز می باشد [۲۹]. بنابراین می-توان با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش بیان نمود که عصاره برگ گیاه حرا دارای اثر ضد میکروبی مناسبی برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم های پاتوژن و بیماری زا می‌باشد. از آنجایی که مطالعه اخیر نشان داده که اثر ضد میکروبی عصاره گیاه حرا در حد مناسب و معقول می باشد امید است در آینده تحقیقات بیشتری در زمینه اثر ضد میکروبی این گیاه بر گونه های مختلف میکروبی انجام گیرد تا با یافتن مواد موثره ضد میکروبی گیاه حرا و فرمولاسیون آن تهیه اشکال دارویی مختلف از آن ممکن شده و اقدام ارزنده ای جهت بهبود بیماری هایی عفونی ناشی از گونه های مختلف میکروبی، انجام گیرد.

نتیجه گیری

در یک نتیجه گیری کلی می توان بیان نمود که عصاره برگ گیاه حرا در شرایط ''in vitro'' دارای قابلیت ضد میکروبی قابل ملاحظه ای بر روی سویه های مورد مطالعه داشت و در ادامه لازم است مطالعات وسیع تر و دامنه داری در شرایط
''in situ'' انجام شود تا دوز مؤثر این عصاره بر میکروارگانیسم های مورد نظر مشخص شود و نهایتًا بتوان این عصاره را به عنوان یک ماده ضد میکروبی طبیعی و جدید برای جلوگیری از بیماریهای عفونی و تنفسی معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از خانم مهندس افشاریان که در انجام آزمایشات ما را یاری نمودند، قدردانی می شود. مقاله علمی - پژوهشی مستخرج از پایان نامه دانشجویی با عنوان بررسی اثر ضد میکروبی عصاره برگ گیاه حرا در شرایط آزمایشگاهی مطابق پرسش نامه طرح با کد ۳/۲۴۱۵۸ در جلسه ۳۱۴ مورخ ۱۳۹۱/۸/۲۹ گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد به تصویب رسید.

References

1. Bullerman L, Lieu F, Seier SA, Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, Cinnamic aldehyde and eugenol. J. F. Science 2006; 42(4):1107-9.
2. Oyedeji A, Ekundayo O, Olawore ON, Adeniyi BA, Koenig WA, Antimicrobial activity of the essential oils of five Eucalyptus species growing in Nigeria, Fit 1999; 70(5):526-8.
3. Burt S, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. I. J. F. Microbiology 2004; 94(3):223-53.
4. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M, Use of different methods for testing tioxidative activity of oregano essential oil. F. Chemistry 2004; 85(4):633-40.
5. Makintosh, D,Zisman S, The status of mangrove ecosystem. (Accessed Agust 25, 2004 at http://iufro.boku.ac.at/iufro/d1/wu10700/unpub/macint95.htm)
6. Kathiresan K, Bingham BL, Biology of mangroves and mangrove ecosystems, Advances in marine biology. 2001; 40:81-251.
7. Bandaranayake WM, Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. W. E. M. 2002; 10(6):421-52.
8. Ahmad I, Beg AZ, Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens, J. E 2001; 74(2):113-23.
9. Naderinasab M, Rashed T, Nazem M, Laboratory bacteriology In Mashhad: Imam Reza press 1997; 24- 9[Persian]
10.Valero M, Salmeron M. Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. I. J. F. M. 2003; 85(1):73-81.
11.Babayi H, Kolo I, Okogun J, Ijah U, The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms, Biokemistri. 2004; 16(2): 106-11.

12.Ahmad I, Mehmood Z, Mohammad F, Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties, J. E 1998; 62(2):183-93[Persian]
13.Bauer A, Kirby W, Sherris JC, Turck M, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. A. J. C. Y 1966; 45(4):493-6.
14.Benger S, Townsend P, Ashford RL, Lambert P, 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.
15.Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi M, Walsh T, Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for Aspergillus spp.: NCCLS collaborative study, J. Clin, Microbiology 2002; 40(9):3204-8.
16.Tassou C, Nychas G, Antimicrobial activity of the essential oil of Mastic fum on gram–positive and gram–negative bacteria in broth and model food systems, I. B. B 1996; 14:411-20.
17.Ghalem BR, Mohamed B, Antibacterial activity of leaf essential oils of Eucalyptus globulus and Eucalyptus camaldulensis. A. J. P. P. 2008; 2(10):211-5.
18.Lin CC, Hsu YF, Lin TC, Hsu HY, Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats, P. R. 2001; 15(3):206-12.
19.Mahasneh AM, Screening of some indigenous Qatari medicinal plants for antimicrobial activity, Phytotherapy, R. 2002; 16(8):751-3.
20.Tian F, Li B, Ji B, Yang J, Zhang G, Chen Y, "et al", Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from Galla chinensis: The polarity affects the bioactivities, F. chemistry. 2009; 113(1):173-9.
21.Zargari A, Plants medicine, 6nd ed. Tehran University Press 1998; 4: 682 - 97.
22.Kotzekidou P, Giannakidis P, Boulamatsis A, Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate, LWT-F. Science & Tech. 2008; 41(1): 119-27.
23.Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M, Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones, Aus.D. J. 2008; 42(5): 343-6.
24.Burt S, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. I. J. food microbiology 2004; 94(3): 223-53.
25.Ramamurthi R, Jayasundaramma B, Lakshmi Rajyam C, Prasad D, Varalakshmi C, Studies on marine bioactive substances from the Bay of Bengal: Bioactive substances from the latex of the mangrove plant Excoecaria agallocha L.: Effects pm the oxidative metabolism of crabs 1991; 4(2): 10-22.
26.Van Kiem P, Quang TH, Huong TT, Nhung LTH, Cuong NX, Van Minh C, "et al", Chemical constituents of Acanthus ilicifolius L. and effect on osteoblastic MC3T3E1 cells, Archives of pharmacal research 2008; 31(7): 823-9.
27.Cunningham ML, Soliman MS, Badr MZ, Matthews H, Rotenone, an anticarcinogen, inhibits cellular proliferation but not peroxisome proliferation in mouse liver. C. L. 1995; 95(1): 93-7.
28.Sunitha S, Nagaraj M, Varalakshmi P, Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. F. 2001; 72(5): 516-23.
29.Chun KH, Kosmeder JW, Sun S, Pezzuto JM, Lotan R, Hong WK, "et al", Effects of deguelin on the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells. J. Nati. C. I. 2003; 95(4): 291-302.

Original Article

Antimicrobial effect aqueous and ethanolic extract of Avicennia marina on microorganisms the infection and intoxication in vitro

*Alizadeh Behbahani B[1 *], Tabatabaei Yazdi F[2], Shahidi F[3], Mohebbi M[2],Vasiee AR[4]*

[1]M.Sc.Student, Department of Food science and technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food science and technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[3]Professor, Department of Food science and technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[4]Msc Student Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

[*]**Corresponding Author:** Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Email: behrooz66behbahani@gmail.com

Submitted:31 Dec 2012
Revised:20 Feb 2013
Accepted: 11 Mar 2013

Abstract

Background & objectives: *Avicennia marina (Forssk.) Vierh is the most current species among these plants in Iranian mangrove forest. Regarding to the biologically active compounds and traditional use of the leaves for treatment of smallpox and wounds, it seems that this plant has significant anti-microbial effects. The aim of this study was to evaluate antimicrobial effects of various concentrations of mangrove leaves on Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Penicillium digitatum.*

Material &Methods: *In this study, antimicrobial effect of extracts evaluated by two methods, "Collins method" and "disk agar diffusion method" on Staphylococcus aureus PTCC 1337, Escherichia coli PTCC 1330 and Penicillium digitatum PTCC 5251 microorganisms. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for both species were determined by using a dilution method.*

Results: *The results showed that in "disk agar diffusion test ", extract with 20, 40, 60 and 80 percent concentration has inhibition effect on Staphylococcus aureus and Penicillium digitatum, but only 60 and 80 percent of alcoholic extract has prevention effect on Escherichia coli. There was inhibition effect for watery extract in 60 and 80 percent on Staphylococcus aureus and 80 percent on Penicillium digitatum. MFC for mangrove alcoholic leaves was 16 mg/ml for Penicillium, however, MFC of aqueous extracts was 64 mg/ml for Penicillium.*

Conclusions: *Alcoholic extract was more effective than watery extract as antimicrobial against on Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Penicillium digitatum. The mangrove leaves extract, in vitro showed significant antimicrobial effect on studied microorganisms.*

Key words: *Mangrove, watery and alcoholic extract, antimicrobial effect.*