

Estudio comparativo de la actividad antibacteriana in vitro de los neumatóforos de *Heritiera fomes* y *Xylocarpus moluccensis*

A comparative study on the in vitro antibacterial activity of the pneumatophores of Heritiera fomes and Xylocarpus moluccensis

MONDAL S,¹ PAUL SK,¹ UDDIN SJ,¹ NAHAR L,² AUZI AA,³ SARKER SD^{2,*}

¹Pharmacy Discipline, Life Science School, Khulna University, Khulna-9208, Bangladesh

²School of Biomedical Sciences, University of Ulster, Cromore Road, Coleraine BT52 1SA, Co. Londonderry, Irlanda del Norte, Reino Unido. Autor de contacto: s.sarker@ulster.ac.uk

³Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, El-Fateh University, Trípoli, Libia

RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de etanol de los neumatóforos de *Xylocarpus moluccensis* (Familia: Meliaceae) y *Heritiera fomes* (Familia: Sterculiaceae) frente a diversas cepas bacterianas utilizando el ensayo de difusión en disco. Ambos extractos presentaron perfiles antibacterianos similares, y las zonas de inhibición fueron >10 mm en la mayoría de los casos. Estos extractos presentaron la máxima actividad frente a aerógenos *Enterobacter*, siendo las zonas de inhibición de 19 y 21 mm, respectivamente. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó mediante el método de dilución en caldo de cultivo. El extracto de *X. moluccensis* fue el más potente frente a *Shigella boydii* y *Shigella sonnie* (CIM = 200 y 300 µg/mL, respectivamente). Se puede asumir que *X. moluccensis* y *H. fomes* podrían ser fuentes potenciales de nuevos descubrimientos para el desarrollo de fármacos.

PALABRAS CLAVE: *Heritiera fomes*. *Xylocarpus moluccensis*. Plantas de Bangladesh. Sundori. Possur. Antibacteriano.

ABSTRACT

The ethanol extracts of the pneumatophores of Xylocarpus moluccensis (Family: Meliaceae) and Heritiera fomes (Family: Sterculiaceae) were assessed for in vitro antibacterial activities against a number of bacterial strains using the disc diffusion assay. Both extracts showed similar antibacterial profiles, and the zones of inhibitions were >10 mm in the most cases. These extracts exhibited the most prominent activity against Enterobacter aerogenes, with the zones of inhibition of 19 and 21 mm, respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth dilution method. The extract of X. moluccensis was the most potent against Shigella boydii and Shigella sonnie (MIC = 200 and 300 µg/mL, respectively). It can be assumed that that X. moluccensis and H. fomes could be potential sources for novel 'lead' discovery for antibacterial drug development.

KEY WORDS: *Heritiera fomes*. *Xylocarpus moluccensis*. Bangladeshi plants. Sundori. Possur. Antibacterial.

Fecha de recepción: 06-09-2006

Fecha aceptación: 07-03-2008

INTRODUCCIÓN

Xylocarpus moluccensis (Lamk.) M. Roem. (Syn: *X. mekongensis*, *Carapa moluccensis*) (Meliaceae), conocido comúnmente como 'Possur', es un árbol sin pelo de tamaño mediano que crece en los bosques de la costa de Bengala, Burma, el Índico, el archipiélago y la península de Malasia, Australia, Fiji y África. En Bangladesh, esta especie crece en la parte norte, alejada del mar, principalmente en las regiones bajas y pantanosas de los Sundarbans, el mayor manglar del mundo^{1,2}. *Heritiera fomes* Buch.-Ham. (Sterculiaceae), nombre común 'Sundari', es un árbol de hoja perenne de tamaño moderado, que crece en abundancia en los Sundarbans y se encuentra en casi todas las regiones pantanosas tropicales del mundo³.

Los usos medicinales tradicionales del *X. moluccensis* incluyen su uso como astringente y febrífugo, y en el tratamiento de la disentería, la diarrea y otros problemas abdominales⁴. Los frutos de *X. moluccensis* se han utilizado tradicionalmente en el tratamiento de la elefantiasis y en la hinchazón del pecho. El ungüento preparado a base de cenizas de semillas, azufre y aceite de coco se utiliza para aliviar el picor⁴. Recientemente, se ha comunicado la actividad antibacteriana de la corteza de *X. moluccensis*, especialmente frente a diversas especies bacterianas asociadas a la diarrea y la disentería⁵. Aunque no existe ningún registro comprobado del uso medicinal de *H. fomes*, se usa ampliamente como postes en la construcción de palafitos, para pilares y como leña. Como parte de nuestro análisis farmacológico continuado de plantas de Bangladesh seleccionadas aleatoriamente, especialmente de los manglares de los Sundarbans⁵⁻¹⁰, informamos ahora de la actividad antibacteriana in vitro de los neumatóforos de *H. fomes* y *X. moluccensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de la planta: Los neumatóforos de *Heritiera fomes* y *Xylocarpus moluccensis* se recolectaron en la región sur de los Sundarbans, en el distrito de Khulna, Bangladesh, en octubre de 2005 y agosto de 2003, y fueron identificados por expertos del Herbario Nacional de Bangladesh (Bangladesh National Herbarium), Dhaka, Bangladesh. Los especímenes de catá-

INTRODUCTION

Xylocarpus moluccensis (Lamk.) M. Roem. (Syn: *X. mekongensis*, *Carapa moluccensis*) (Meliaceae), commonly known as 'Possur', is a glabrous, medium-sized tree found in littoral forests of Bengal, Burma, the Andaman's, the Malay Peninsula and Archipelago, Australia, Fiji and Africa. In Bangladesh, this species grows in the north tract, remote from the sea, chiefly in low lying swampy locality, of the Sundarbans, the largest mangrove forest in the world.^{1,2} *Heritiera fomes* Buch.-Ham. (Sterculiaceae), common name 'Sundari', is a moderate size evergreen tree that grows abundantly in the Sundarbans, and is found in almost all the tropical swamp areas of the world.³

The folkloric medicinal uses of *X. moluccensis* include its use as an astringent and febrifuge, and for the treatment of dysentery, diarrhoea and other abdominal problems.⁴ Fruits of *X. moluccensis* have traditionally been used as a cure for elephantiasis and swelling of the breast. An ointment prepared from seed ash, sulphur and coconut oil is a cure for itch.⁴ Recently, the anti-bacterial activity of the bark of *X. moluccensis*, especially against a number of bacterial species known to be associated with diarrhoea and dysentery, has been reported.⁵ While there is no proven recorded for any medicinal uses of *H. fomes*, it is used extensively as cottage poles, pillars, piles and fuel woods. As a part of our on-going pharmacological screening of randomly selected Bangladeshi plants, especially from the Sundarbans mangrove,⁵⁻¹⁰ we now report on the *in vitro* anti-bacterial activity of the pneumatophores of *H. fomes* and *X. moluccensis*.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials: The pneumatophores of *Heritiera fomes* and *Xylocarpus moluccensis* were collected from the southern region of the Sundarbans in the district of Khulna, Bangladesh, in October, 2005 and August, 2003 and identified by the experts of Bangladesh National Herbarium, Dhaka, Bangladesh. The Voucher specimens were deposited in the Bangladesh National Herbarium, Dhaka, Bangladesh (*H. fomes*; DACB-30,225 and *X. moluccensis*; DACB-30320).

logo se depositaron en el Herbario Nacional de Bangladesh (Bangladesh National Herbarium), Dhaka, Bangladesh (*H. fomes*; DACB-30,225 y *X. moluccensis*; DACB-30320).

Extracción: Los materiales de las plantas se secaron al aire, se molieron y se maceraron con 80% EtOH a temperatura ambiente. Los extractos se filtraron y secaron al aire para obtener extractos secos crudos. Los porcentajes de rendimiento fueron del 17% y el 19% para *H. fomes* y *X. moluccensis*, respectivamente.

Ensayo antibacteriano: Se impregnaron discos blancos estériles de 6,0 mm de diámetro (BBL, Cocksville, EE. UU.) con sustancias de prueba a una dosis de 500 µg/disco. Estos discos se colocaron, junto con los discos de control positivo (kanamicina, Oxoid Ltd., Reino Unido, 30 µg/disco) y los discos de control negativo, en placas de Petri que contenían un medio de agar Mueller-Hinton sembrado con los organismos de prueba con una aguja de transferencia estéril, y se conservaron a 4 °C para facilitar una difusión máxima. Las placas se conservaron en un incubador (37 °C) para favorecer el crecimiento de la bacteria. Las actividades antibacterianas de los agentes de prueba se determinaron mediante la medición del diámetro de la zona de inhibición en milímetros.

Se comprobó la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* (NCIMB 8110), *Enterobacter aerogenes* (NCIMB 10102), *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 6750), *Salmonella typhi* (NCTC 6585), *Shigella boydii* (NCTC 12985), *Shigella dysenteriae* (NCTC 4837), *Shigella flexneri* (NCTC 24570), *Shigella sonnei* (NCTC 8574), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Staphylococcus epidermidis* (NCIMB 8558), *Streptococcus pyogenes* (NCTC 2218) y *Vibrio cholerae* (NCTC 6585)^{11,12}.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM): La CIM de los extractos de etanol se determinó mediante el método de dilución en caldo de cultivo¹³. Siguiendo este método se añadieron concentraciones de disolvente cada vez mayores a distintos tubos de ensayo. Se tomaron trece tubos con tapón de rosca, cada uno de ellos con 3 ml de medio de caldo de cultivo. Seguidamente, se añadió extracto de etanol de la

Extraction: The air-dried and powdered plant materials were macerated with 80% EtOH at room temperature. The extracts were filtered and air-dried to obtain the crude dried extracts. The percentages of yield are 17% and 19% for *H. fomes* and *X. moluccensis*, respectively.

Antibacterial assay: Sterile 6.0 mm diameter blank discs (BBL, Cocksville, USA) were impregnated with test substances at the dose of 500 µg/disc. These discs, along with positive standard disc (30 µg/disc) (Kanamycin, Oxoid Ltd., UK) and negative control discs were placed in Petri dishes containing the Mueller-Hinton agar medium seeded with the test organisms using sterile transfer loop and kept at 4°C to facilitate maximum diffusion. The plates then kept in an incubator (37°C) to allow the growth of the bacteria. The antibacterial activities of the test samples were determined by measuring the diameter of the zone of inhibition in terms of millimetre.

Antibacterial activity was tested against *Escherichia coli* (NCIMB 8110), *Enterobacter aerogenes* (NCIMB 10102), *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 6750), *Salmonella typhi* (NCTC 6585), *Shigella boydii* (NCTC 12985), *Shigella dysenteriae* (NCTC 4837), *Shigella flexneri* (NCTC 24570), *Shigella sonnei* (NCTC 8574), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Staphylococcus epidermidis* (NCIMB 8558), *Streptococcus pyogenes* (NCTC 2218) and *Vibrio cholerae* (NCTC 6585).^{11,12}

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination: The MIC of the ethanol extracts was determined by the broth dilution method.¹³ In this method an increasing concentration of solvent extract added to different test tube. Thirteen sterilized screw cap tubes each containing 3 ml of Nutrient broth media were taken. Now ethanol extract was added from the stock solution to the 10 test tubes to obtain different concentrations (200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 µg/ml respectively) of the extract. Then 10 µl (from log phase of growth; 5x10⁶ cells/ml) of inoculum was added. Additional three test tubes were also included as control for media (Cm; only media without inoculum, solvent and extract), control for inoculum (Ci; inoculum and medium without solvent and extract) and control for solvent (Cs; inoculum and solvent and me-

solución de almacenamiento a los 10 tubos de ensayo para obtener distintas concentraciones de extracto (200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente). A continuación, se añadieron 10 μl (de la fase de registro; 5×10^6 células/ml) de inóculo. Se añadieron tres tubos de ensayo adicionales como control para medio (Cm; sólo medio sin inóculo, disolvente y extracto), control para inóculo (Ci; inóculo y medio, sin disolvente ni extracto) y control para disolvente (Cs; inóculo, disolvente y medio). El primer tubo de control (Cm) se incluyó para comprobar la esterilidad del medio; el segundo (Ci) para producir crecimiento y, por tanto, turbidez, sin ningún extracto de disolvente; y el tercero (Cs) para comprobar si el propio disolvente provocaba alguna inhibición. A continuación, se incubaron los tubos a 37 °C durante la noche. Después de la incubación, los tubos con las concentraciones de extracto más bajas no presentaron turbidez considerada como CIM para ese extracto de disolvente específico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron las propiedades antibacterianas de los extractos de etanol de los neumatóforos *X. moluccensis* y *H. fomes* mediante el método de difusión en disco convencional utilizando extractos de 500 $\mu\text{g/disco}$, contra un panel de 11 cepas bacterianas patogénicas, y los resultados se compararon con la actividad del control positivo, kanamicina (30 $\mu\text{g/disco}$) (Tabla 1). Ambos extractos presentaron una actividad bacteriana considerable contra todos los organismos del análisis. Los perfiles antibacterianos de estos extractos fueron muy similares. A excepción de *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae*, las zonas de inhibición de estos extractos fueron de > 10 mm. Si bien los extractos de *X. moluccensis* y *H. fomes* presentaron la máxima actividad frente a *Enterobacter aerogenes*, con zonas de inhibición de 19 y 21 mm, respectivamente, la actividad más destacada se observó frente a las tres especies de *Shigella* analizadas (zonas de inhibición de >10 mm). Aunque todos los microorganismos del análisis son patogénicos, las especies de *Shigella* son de especial importancia, ya que son una de las principales causas de disentería y diarrea mortal en Bangladesh. La diarrea y la disentería por infecciones de *Shigella*

dia). The first control tube (Cm) was included to check the sterility of the media, the second (Ci) was to produce the growth and thus turbidity without any solvent extract and the third control tube (Cs) was to check whether the solvent itself caused any inhibition. Now all the tubes were incubated at 37° C over night. After incubation, tubes having lowest concentrations of extract showing no turbidity considered MIC to that particular solvent extract.

RESULTS AND DISCUSSION

The anti-bacterial properties of the ethanol extracts of the pneumatophores of *X. moluccensis* and *H. fomes* were assessed by conventional disc diffusion method using dried extracts of 500 $\mu\text{g/disc}$ against a panel of 11 pathogenic bacterial strains, and the results were compared with the activity of the positive control, kanamycin (30 $\mu\text{g/disc}$) (Table 1). Both extracts showed considerable antibacterial activities against all test organisms. The anti-bacterial activity profiles of these extracts were very similar. Except against *Salmonella typhi* and *Vibrio cholerae*, the zones of inhibition with these extracts were > 10 mm. While the extracts of *X. moluccensis* and *H. fomes* exhibited the most prominent activity against *Enterobacter aerogenes*, with the zones of inhibition of 19 and 21 mm, respectively, the most noteworthy activity was observed against all three *Shigella* species tested (zones of inhibition >10 mm). Although all test microorganisms are pathogenic, the *Shigella* species are of particular importance, as they are one of the major causes of deadly diarrhoea and dysentery in Bangladesh. Diarrhoea and dysentery, caused by *Shigella* infections, are one of the major causes of morbidity and mortality, particularly among children under 10 years of age, not only in Bangladesh, but also in many other poor and under-developed countries. Countries that are affected by recurrent flood, e.g. Bangladesh, are under specific threat from water and food borne *Shigella* infections. It is interesting to note that the antibacterial activity of the pneumatophores of *X. moluccensis* observed in this study is quite similar to that of the bark of this plant, previously reported elsewhere.⁵ Thus, it is reasonable to assume that the pneumatophores and bark of *X. moluccensis* may possess same or similar chemical profiles.

son una de las principales causas de mortalidad, especialmente entre niños menores de 10 años, no sólo en Bangladesh, sino también en muchos otros países pobres y subdesarrollados. Los países afectados por inundaciones recurrentes, como Bangladesh, están especialmente amenazados por infecciones de *Shigella* presente en el agua y en los alimentos. Es interesante observar que la actividad antibacteriana de los neumatóforos de *X. moluccensis* observados en este estudio es bastante similar a la de la corteza de esta planta, anteriormente publicada en otro sitio⁵. Por tanto, es razonable asumir que los neumatóforos y la corteza de *X. moluccensis* pueden tener los mismos perfiles químicos o similares.

TABLA 1. Actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de etanol de los neumatóforos de *Heritiera fomes* (HF) y *Xylocarpus moluccensis* (XM).

TABLE 1. *In vitro* anti-bacterial activity of the ethanol extracts of the pneumatophores of *Heritiera fomes* (HF) and *Xylocarpus moluccensis* (XM).

Cepas bacterianas	Zona de inhibición en mm			CIM en µg/mL	
	Kanamicina (30 µg/disco)	HF (500 µg/disco)	XM (500 µg/disco)	HF	XM
<i>Escherichia coli</i>	30	10	12	500	400
<i>Enterobacter aerogenes</i>	30	21	19	400	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	12	13	400	700
<i>Salmonella typhi</i>	28	8	7	800	600
<i>Shigella boydii</i>	27	15	12	400	200
<i>Shigella dysenteriae</i>	31	12	13	500	600
<i>Shigella flexneri</i>	25	10	12	600	500
<i>Shigella sonnei</i>	30	13	14	500	300
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	12	13	600	500
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	28	13	14	500	400
<i>Streptococcus pyogenes</i>	25	10	12	800	600
<i>Vibrio cholerae</i>	29	8	10	900	700

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos de etanol de *X. moluccensis* y *H. fomes* se determinó mediante el método de dilución en caldo de cultivo (Tabla 1). A partir de este experimento, si bien se observó que el extracto de *X. moluccensis* fue el más potente frente a *Shigella boydii* (CIM = 200 µg/mL) y *Shigella sonnei* (CIM = 300 µg/mL), los valores de CIM de extracto de *H. fomes* frente a estos microbios fueron de 400 y 500 µg/ML, respectivamente. Aunque la actividad antibacteriana presentada por estos extractos puede no ser tan

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the ethanol extracts of *X. moluccensis* and *H. fomes* was determined by the broth dilution method (Table 1). From this experiment, while the extract of *X. moluccensis* was found to be most potent against *Shigella boydii* (MIC = 200 µg/mL) and *Shigella sonnei* (MIC = 300 µg/mL), the MIC values of *H. fomes* extract against these microbes were, 400 and 500 µg/ML, respectively. Although the antibacterial activities exhibited by these extracts might not be as potent as the positive control, one should bear in mind the fact

potente como el control positivo, se debe tener en cuenta el hecho de que los extractos crudos contienen diversos compuestos en una mezcla compleja, y es posible que sólo unos pocos de ellos sean activos. Por tanto, los compuestos activos aislados e identificados de este extracto tendrán casi con seguridad mucha más potencia frente a los organismos del análisis.

Dado que los extractos de etanos de los neumatóforos de *Xylocarpus moluccensis* y *Heritiera fomes* presentaron una actividad antibacteriana considerable frente a un amplio espectro de cepas bacterianas patogénicas, se puede asumir que *X. moluccensis* y *H. fomes* podrían ser fuentes potenciales para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos.

that the crude extracts contain several compounds as a complex mixture, and only a few of these compounds might be active. Thus the isolated and identified active compound(s) from these extract will almost certainly have much improved potency against the test organisms.

Since the ethanol extracts of the pneumatophores of *Xylocarpus moluccensis* and *Heritiera fomes* showed considerable antibacterial activity against a wide range of pathogenic bacterial strains, it can be assumed that *X. moluccensis* and *H. fomes* could be potential sources for novel 'lead' discovery for antibacterial drug development.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. GRIN Taxonomy Database. USDA, ARS, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland, USA. 2007. Available on-line at: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?42120>
2. Kiritikar KR and Basu BD. 1999. *Indian Medicinal Plants*, 2nd edition, Allahabad, India.
3. Rahman LM. The Sundarbans: A unique wilderness of the world. USDA Forest Service Proceedings RMPRS-P-15. 2000; 2: 143-148.
4. Ghani A. 1998. Medicinal Plants of Bangladesh. Asiatic Society of Bangladesh, Dhaka.
5. Uddin SJ, Shilpi JA, Alam SMS, Alamgir M, Rahman MT, Sarker SD. Antidiarrhoeal activity of the methanol extract of the barks of *Xylocarpus moluccensis* in castor oil and magnesium sulphate-induced diarrhoea models in mice. *J. Ethnopharmacology*. 2005; 101: 139-143.
6. Shilpi SJ, Uddin SJ, Rouf R, Billah MM. Central nervous system depressant activity of *Diospyros peregrina* bark. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 2004; 4:249-252.
7. Uddin SJ, Shilpi JA, Barua J, Rouf R. Antinociceptive activity of *Ceriops decandra* leaf and pneumatophore. *Fitoterapia*. 2005; 76:261-263.
8. Uddin SJ, Shilpi JA, Delazar A, Nahar L, Sarker SD. Free radical scavenging activity of some Bangladeshi plant extracts. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 2004; 4:185-193.
9. Rouf R, Uddin SJ, Shilpi JA, Rahman MT, Ferdous MM, Sarker SD. Anti-diarrhoeal effects of *Diospyros peregrina* in the castor oil-induced diarrhoea model in mice. *ARS Pharmaceutica*. 2006; 47: 81-89.
10. Uddin SJ, Shilpi JA, Rahman MT, Ferdous MM, Rouf R, Sarker SD. Assessment of neuropharmacological effects of *Pandanus foetidus* (Pandanaceae) in mice. *Die Pharmazie*. 2006; 61: 262-264.
11. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology* 1966; 45: 493-496.
12. Cruickshank R. 1968. *Medical microbiology: A guide to diagnosis and control of infection*, E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London, pp. 888.
13. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*, 1999; 7th Edition, American Society of Microbiology, USA.