

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره ریشه زرشک بی دانه حاصل از استخراج توسط آب مادون بحرانی

نرگس رحیمی^{1*}، سید علی مرتضوی²، عبدالمجید مسکوکی³، امیر حسین الهامی راد⁴، قدیر رجب زاده⁵

¹ دانش آموخته دکترای علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

² گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

³ گروه فراوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، مشهد، ایران

⁴ گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

⁵ گروه نانو فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: 93/11/11

تاریخ دریافت: 93/3/13

چکیده

افزایش مقاومت به انواع آنتی بیوتیک‌ها از مهمترین چالش‌های هائیسیت که در زمان مصرف این داروها مطرح می‌باشد. در همین راستا علاقه به استفاده از داروهای با منشأ گیاهی در سطح جهان رو به افزایش است. در این پژوهش به منظور ارزیابی تاثیر روش استخراج بربرین توسط آب مادون بحرانی، در مقایسه با بربرین استاندارد، بر فعالیت ضد میکروبی عصاره از پودر ریشه زرشک، استفاده گردید و اثرات ضد میکروبی این پودر بر علیه باکتری استفیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و مخمر کاندیدا آلیکنس بررسی و با بربرین خالص مقایسه گردید. نتایج نشان دادند که فعالیت ضد میکروبی این ماده بر علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از انواع گرم منفیست و میزان MBC برای اشرشیاکلی و میزان لازم برای کشتندگی کاندیدا آلیکنس بیش از 80 میلی‌گرم/میلی‌لیتر در حالیکه برای استفیلوکوکوس اورئوس حدود 70mg/ml تعیین گردید. فعالیت ضد میکروبی بربرین نیز در غلظت‌های مشابه با عصاره نتایج مشابهی داشت. در واقع ترکیبات همراه با بربرین در عصاره، تاثیری بر میزان فعالیت بربرین موجود در عصاره نداشت.

واژه های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، ریشه زرشک بی دانه، استخراج توسط آب مادون بحرانی، استفیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، کاندیدا آلیکنس

1- مقدمه

مواد گیاهی را می توان منابع نا محدود و باارزشی برای تامین انواع افزودنی های غذایی، انواع مواد معطره و داروئی، رنگ ها و یا برای کاربرد مستقیم در پزشکی دانست. کاربردهای متعدد منابع متنوع گیاهی در سراسر جهان و در اغلب کشورهای دنیا سابقه ای طولانی دارد و بتدریج بشر روش های نوینی را برای استفاده از این مواد گیاهی توسعه می دهد (2). امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی در درمان بیماری ها در حال افزایش می باشد که این امر را می توان تا حدودی بدلیل عدم کفایت طب نوین در درمان کامل برخی از بیماریها و یا بروز عوارض جانبی استفاده از داروها و درمان های شیمیائی دانست (2 و 5).

عصاره های گیاهی اساسا بصورت مخلوطی از ترکیبات متعدد می باشند که از بخش های مختلف گیاه خشک یا تازه مانند گل، دانه، برگ ها، ریشه و پوست ساقه توسط تکنیک های مختلف استخراج حاصل می گردد. کاملا مشهود است که حین استخراج، ترکیبات فعال موجود در گیاه همراه با سایر مواد گیاهی استخراج می گردد. می توان استخراج مواد زیست فعال از مواد گیاهی را در گروه تکنولوژی مواد غذایی و داروهای گیاهی¹ دانست (5). به همین علت روش های مختلف مورد استفاده در آماده سازی مواد گیاهی در فارماکوپه های کشورهای متعددی مورد توجه قرار گرفته است.

زرشک بی دانه² بعنوان یکی از گیاهان مورد استفاده در طب سنتی به ثبت رسیده و در فارماکوپه های مختلف جهان نیز بعنوان گیاه داروئی موثر درج شده است (1 و 2). این گیاه متعلق به خانواده بربریداسه³ بوده و بومی اروپا و آسیاست. لذا در ایران غالبا در نواحی شمالی ایران، ارتفاعات البرز، جنگل های مازندران و نواحی وسیعی از خراسان می روید. ریشه ها و پوست ساقه این گیاه از داروهای تلخ بشمار می آید و دارای اثرات مقوی صفرابری و مسهل است. میوه زرشک دارای مقادیر زیادی ویتامین C است که از لیموترش بیشتر است. بهمین جهت در درمان آسکوربوت از آن استفاده می شود. از ریشه ها و پوست زرشک بصورت سنتی برای ناراحتی های گوارشی، ناراحتی های کبد و درمان بیماریهای کلیوی و مجاری ادراری مصرف می شده است (1 و 2).

تاکنون از عصاره ریشه زرشک بعنوان عامل ضد روماتیسمی⁴ و عامل ضد التهاب در طب سنتی استفاده شده است که این خاصیت بحضور ترکیبات آلکالوئیدی در آن نسبت داده می شود. عصاره الکلی این گیاه دارای آلکالوئیدهای بیس بنزیل ایزوکوئینولین⁵ و پروتوبربرین⁶ می باشد (2 و 9). تقریبا تمام گونه های جنس بربریس حاوی آلکالوئیدهای دارای فعالیت زیستی بوده و در پزشکی مورد استفاده قرار می گیرند (9).

در سالهای اخیر علاقه به استفاده از داروهای با منشاء گیاهی در سطح جهان رو به افزایش می باشد. بهمین دلیل گیاهان سنتی بمنظور کاربرد داروئی و ضد میکروبی فوق العاده مورد توجه می باشند که این امر تاکنون منجر به شناسائی ترکیبات زیست فعال متعددی در گیاهان شده است. در سال 1998 سازمان بهداشت جهانی اعلام کرد که 80% از جمعیت ساکن در کشورهای در حال توسعه غالبا به منظور درمان از داروهای سنتی استفاده می کنند (12 و 13).

نتایج حاصل از پژوهش های پیشین فعالیت های بیولوژیکی مختلفی مانند فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریائی و آنتی اکسیدانی را در انواع ترکیبات زیست فعال گیاهی اثبات کرده اند (11-20). آلکالوئیدها گروه بزرگی از متابولیت های ثانویه با ساختاری متنوع می باشند، که در طبیعت بمیزان وسیعی پراکنده شده و دارای فعالیتهای زیستی گوناگونی می باشند. آلکالوئید از موضوعات مورد توجه محققین از نظر علمی و فرهنگی می باشد و مخصوصا در طب سنتی بدان توجه زیادی شده است. آلکالوئید برای اولین بار در سال 1983 توسط Pelletier معرفی شد و تدریجا بدین گونه تعریف گردید: " آلکالوئیدها تمام ترکیبات طبیعی نیتروژنداری می باشند که جزء گروه پپتیدها، آنتی بیوتیک ها، آمینواسیدهای فاقد پروتئین، آمین ها، گلیکوزیدهای سیانوژنیک، گلوکوزینولاتها، کوفاکتورها و کلیه متابولیت های اولیه قرار نمی گیرند". آلکالوئیدها در 15% از گیاهان، باکتری ها، قارچها و تعدادی از حیوانات یافت می شوند. در سلسله های گیاهی نیز هم در گیاهان بسیار قدیمی و هم در گیاهان عالی تر از جمله نهانانگان و بازدانگان یافت شده اند. بربریداسه از جمله خانواده های نهانانگان است که نسبتا آلکالوئید بیشتری دارد (2 و 8).

⁴ - Anti rheumatic

⁵ - Bisbenzylisoquinoline

⁶ - Quaternary protoberberine

¹ - Phytopharmaceutical

² - Berberis Vulgaris

³ - Berberidaceae

نامیده

می‌شود. چون بدون استفاده از انواع حلال‌های آلی و شیمیایی قادر به استخراج ترکیباتی متنوع از منابع گوناگون می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- جمع آوری و آماده سازی ریشه گیاه زرشک

ریشه زرشک در پایان فصل برداشت، از باغات زرشک بی دانه در اطراف شهرستان بیرجند جمع آوری شد. حدود دو الی سه روز در اطاق تاریک و دارای تهویه مناسب پهن گردید تا رطوبت سطحی آن به حداقل برسد و پس از انتقال به آزمایشگاه، در آن 30 درجه سانتیگراد به مدت 15 تا 18 ساعت قرار گرفت تا کاملا خشک شد. در مرحله بعد ریشه‌ها در آسیاب چکشی خورده و سپس در آسیاب آزمایشگاهی کاملا پودر گردید و برای گروه بندی دقیق نمونه پودری نمونه‌های آسیاب شده توسط سه نوع الک (الک با شماره مش 24، الک با شماره مش 35 و الک با شماره مش 45) به سه گروه تقسیم شدند:

گروه اول: ذراتی که بین دو الک با شماره مش‌های 24 و 35 باقی ماندند (از مش 24 کوچکترند اما از مش 35 عبور نکردند).
گروه دوم: ذراتی که بین دو الک با شماره مش‌های 35 و 45 باقی ماندند (از مش 35 (با اندازه ذره 0/5 میلیمتر) کوچکترند اما از مش 45 (با اندازه ذره 0/354 میلیمتر) عبور نکردند).
گروه سوم: ذراتی که از الک با شماره مش‌های 45 عبور می‌کنند یعنی اندازه ذرات آنها کمتر از 0/354 میلیمتر است.

2-2- عصاره گیری توسط تکنیک آب مادون بحرانی و تهیه

پودر از عصاره

این روش استخراج در راکتوری از جنس استیل ضدزنگ 316 انجام شد، این مخزن استخراج در آزمایشگاه فناوری های نوین پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد ساخته شده است. شرایط استخراج، توسط بهینه سازی با تکنیک سطح پاسخ² تعیین شد. (شکل 1) طبق این بهینه سازی بیشترین غلظت بربرین (میکروگرم / گرم نمونه اولیه) در دمای حدود 170 درجه سانتی گراد (آب مادون بحرانی)، زمان 30 تا 35 دقیقه و نسبت (ماده اولیه به حلال) 0/01 حاصل می‌گردد. بعد از تنظیم نسبت مناسب از نمونه (پودر ریشه زرشک) به آب مقطر آزمایشگاهی، درب راکتور کاملا

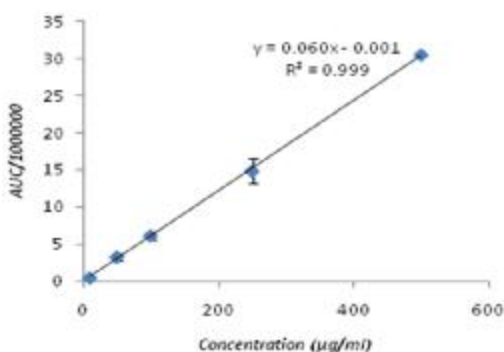
نتایج پژوهش‌های متعدد نشان داده است که آلکالوئید بربرین از گیاهان خانواده آنوناسه، بربریداسه، لوراسه، منیزپرمه آسه، پاپاوراسه و روتاسه جدا شده است. آلکالوئیدهای تیره بربریداسه دارای هسته ایزوکیولین هستند و به سه گروه آپورفین، پروتوبربرین و بیس بنزید ایزوکیولین تقسیم می‌شوند. بربرین نوعی آلکالوئید چهاروجهی از انواع ایزوکیولین‌هاست که از تعداد زیادی از گونه‌های متعلق به خانواده بربریداسه مانند *Coptis chinensis* و *Berberis aristate* جدا شده است (8).

بررسی‌هایی که در سالهای 1987 و 1997 در مورد فعالیت آنتی باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی آلکالوئیدهای گیاهی انجام شد، مبین توانایی ضد میکروبی عصاره آلکالوئیدی گیاهان می‌باشند. همچنین مطالعات تائید کردند بربرین در کاهش کلسترول خون نیز (مخصوصا نوع مضر LDL) موثر است (7، 13-15). البته نتایج مشابهی در مورد فعالیت ضد میکروبی تعداد زیادی از گونه‌های مرتبط با جنس ماهونیا (خانواده بربریداسه) در سال‌های 2004 (Livia و همکاران) و 2007 (توسط Li و همکاران) ثبت شده است (6، 10، 11، 12). این خاصیت بربرین باعث توانایی آن در تداخل با ساختار DNA می‌باشد که متعاقبا منجر به ایجاد تداخل در بیوسنتز پروتئین‌های ضروری در سلول زنده می‌گردد. همچنین مطالعات نشان می‌دهند که بربرین می‌تواند از سنتز DNA و سنتز آنزیم Reverse transcriptase در سلول زنده ممانعت کند (7). علاوه بر این مطالعات پیشین نشان داده است که بربرین می‌تواند فعالیت ضد قارچی قابل ملاحظه‌ای داشته باشد (4، 5).

هدف ما در این پژوهش بررسی خاصیت ضد میکروبی پودر حاصل از عصاره ریشه زرشک (استخراج شده توسط آب مادون بحرانی) می‌باشد. این شرایط استخراج بر مبنای استفاده از آب (حلال) در شرایط فشار بالا و دمایی بین نقطه جوش و دمای بحرانی آب می‌باشد (100-374 °C). در این شرایط میزان حلالیت و انتشار آب بدرون بافت ماده افزایش می‌یابد. علاوه بر این با افزایش دمای آب در این شرایط تدریجا قطبیت ملکول‌های آب کاهش می‌یابد. این عوامل در مجموع منجر به افزایش توانایی آب در غلبه بر پیوندهای بین ملکولی ماده - ماتریکس و انحلال ترکیباتی با قطبیت کمتر نیز می‌گردد. تکنولوژی استخراج توسط آب مادون بحرانی¹، تکنولوژی سبز،

¹ - Response Surface Methodology

¹ - Subcritical Water Extraction



شکل 2- منحنی استاندارد بربرین بمنظور تعیین میزان بربرین توسط HPLC در پودر حاصل از عصاره

4-2- بررسی فعالیت ضد میکروبی

4-2-1- آماده سازی غلظت های مختلف عصاره

بعد از تهیه پودر و تعیین محتوی بربرین آن بمنظور تهیه محلول های با غلظت های گوناگون بربرین از اتانول (مرک) بعنوان حلال استفاده شد. با توجه به میزان محدود انحلال کامل این پودر در اتانول، بالاترین غلظت تهیه شده از این پودر 80 میلی گرم در هر میلی لیتر می باشد. بعد از تهیه محلول استوک این محلول در محیطی استریل، توسط فیلتر سرنگی 0/45 میکرومتر، کاملاً استریل شد و بعد از انتقال به لوله استریل شیشه ای و مات، تا زمان آزمون در یخچال نگهداری گردید. همین روش استریل کردن برای اتانول نیز استفاده شد.

4-2-2- میکروب ها و محیط کشت های مورد استفاده در آزمون

میکروب های مورد استفاده برای بررسی خاصیت ضد میکروبی پودر حاصل از عصاره، شامل باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس PTTC:1764)، باکتری گرم منفی (اشرشیاکلی PTTC:1330) و مخمر کاندیدا آلبیکنس (PTTC:5025) تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتریهای ایران بود.

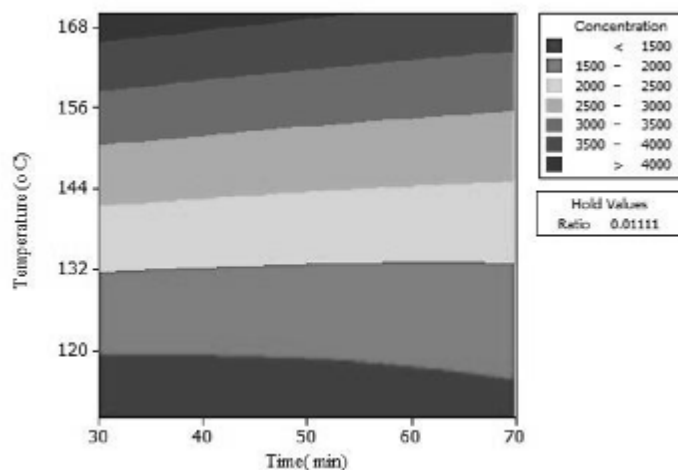
محیط کشت مورد استفاده برای مرحله فعال سازی باکتری ها و محیط کشت لازم برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی پودر عصاره، Müller-Hinton Broth و محیط مورد استفاده برای مرحله

بسته و این مخزن در حمام گلیسرول قرار گرفت. حمام گلیسرول توسط المنت الکتریکی (که با جریان 220 ولت الکتریکی تغذیه می شد) گرم می گردد و روی همزنی مجهز به هیتر قرار داشت که در کنترل دمای سیستم خیلی موثر بود. در این راکتور درجه حرارت توسط ترمومتر دیجیتالی کنترل و ثبت شده و میزان فشار درون راکتور توسط بارومتر (با دقت دو بار) مشخص می گردید. بعد از اتمام زمان استخراج، جریان برق کاملاً قطع شده و بعد از رسیدن فشار راکتور به فشار محیط، درب راکتور باز و عصاره درون آن توسط کاغذ صافی، صاف گردید. اکنون این عصاره صاف شده در روتاری اوپراتور به یک سوم حجم اولیه رسید و عصاره تغلیظ شده برای تولید پودر توسط فریز درایر (خشک کن انجمادی تحت خلاء) آماده شد و تقریباً بعد از 48 ساعت پودر حاصل از عصاره جمع آوری گردید.

در این مطالعه ابتدا شرایط بهینه استخراج از ریشه زرشک توسط تکنیک آب مادون بحرانی بررسی و تعیین شد (بر مبنای حد اکثر غلظت بربرین در عصاره) سپس عصاره حاصل در دستگاه خشک کن تحت خلاء به پودر تبدیل شده و بعد از تعیین مقدار میزان بربرین توسط HPLC، محلول استوک 80 میلی گرم / میلی لیتر، توسط حلال اتانول تهیه و برای آزمون میکروبی استفاده گردید.

3-2- آزمون HPLC

بعد از تهیه پودر بمنظور تعیین مقدار بربرین، از روش کروماتوگرافی مایع استفاده گردید. دستگاه HPLC مورد استفاده از مدل Kanuer و شامل اجزائی مانند پمپ HPLC مدل k-1001، ستون کروماتوگرافی C₁₈، حلال مورد استفاده مخلوط متانول / آب و دتکتور ماوراء بنفش k-2600 است که اندازه گیری ها در طول موج 330 نانومتر انجام می شدند. حجم هر تزریق به دستگاه 20 میکرولیتر بود. منحنی استاندارد رسم شده توسط محلول حاصل از غلظت های مختلف از بربرین استاندارد در شکل 2 ارائه شده است.



شکل 1- منحنی کانتور حاصل از بهینه سازی غلظت بربرین استخراج شده توسط SCW

شده و بمدت 48 ساعت در دمای 25 درجه سانتیگراد، گرمخانه گذاری انجام شد. لازم به ذکر است که برای اطمینان از خلوص کشت انجام شده، در مرحله انتقال سوسپانسیون پودر از کپسول به محیط مایع، قطرات آخر این سوسپانسیون را به پلیت حاوی محیط کشت Yeast Mold Agar منتقل کرده و کشت خطی انجام شد. این پلیت نیز بمدت 48 ساعت در دمای 25 درجه سانتیگراد، گرمخانه گذاری شد. بعد از اتمام زمان گرمخانه گذاری روی محیط جامد کلنی های گرد و کرمی رنگ صاف و براقی بود که بعد از رنگ آمیزی نمونه برداشته شده از این کلنی ها، توسط بلودومتیلن، حضور این مخمر در کشت خالص تأیید گردید.

اکنون مشابه روش تنظیم غلظت سوسپانسیون باکتریائی، مطابق با محلول مک فارلند 0/5%، کدورت در سوسپانسیون این مخمر در طول موج 630 نانومتر تنظیم شد.

4-4-2- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی² و حداقل غلظت کشندگی³

در این پژوهش، برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی پودر عصاره درمقابل میکروب های مورد آزمون، از روش Microdilution استفاده شد (9، 13، 19). میکروپلیت های 96 چاهکی و محیط کشت استریل مایع (مولر هینتون براث برای باکتری ها و Yeast Mold برای مخمر) از قبل آماده و توسط اتوکلاو (دمای 121/1 درجه سانتیگراد و زمان 20 دقیقه) استریل شده بود. بعد از آماده سازی و کشت میکروپلیت ها و تلقیح آن

فعالسازی مخمر و برای بررسی فعالیت ضد مخمری، محیط Yeast Mold Broth می باشد.

2-4-3- آماده سازی میکروب

دو باکتری استافیلوکوکوس کوکوس اورئوس و اشرشیاکلی مورد استفاده برای تستهای ضد میکروبی از کشت استوک، خالص آزمایشگاهی تهیه شدند. ابتدا از کشت خالص آزمایشگاهی، برای مرحله فعال سازی (بمدت 18 تا 24 ساعت)¹، توسط سمپلر حدود 20 میکرولیتر به محیط مایع و استریل مولر هینتون منتقل شد و حدود 24 ساعت در 37 °C گرمخانه گذاری شد. سپس با توجه به کدورت محلول استاندارد مک فارلند 0/5% (معادل است با غلظت میکروبی $1/5 \times 10^8$ Cfu/ml)، کدورت این سوسپانسیون میکروبی در طول موج 630 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (معادل محلول مک فارلند 0/5%) و با رقیق کردن توسط نرمال سالین، تنظیم شد. برای آماده سازی مخمر کاندیدا آلبیکنس مورد استفاده، از پودر خالص لیوفیلیزه کاندیدا آلبیکنس استفاده شد. پس از تهیه این کپسول کیکروبی و طبق دستورالعمل موجود در وبگاه این مرکز، ابتدا در محیط کاملاً استریل کپسول حاوی پودر مخمر باز شد و حدود 0/3 تا 0/4 میلی لیتر از محیط بیست مولد براث استریل به ماده خشک درون آمپول اضافه گردید و کاملاً با آن مخلوط شد تا به شکل سوسپانسیون یکنواختی درآمد. سپس کل سوسپانسیون تهیه شده به لوله حاوی 20 سی سی محیط مایع بیست مولد استریل منتقل

² Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

³ Minimum Bacteriostatic Concentration (MBC)

¹ Over night

بیشتری بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) در مقایسه با باکتری اشرشیاکلی (گرم منفی) دارد.

نتایج حاصل از پژوهشی در سال 2003 نشان داد که عصاره آبی حاصل از برگ، ریشه و ساقه *Berberis heterophylla* حتی در غلظت 1000 میکروگرم/ میلی لیتر بر میکروب‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، سودومناس آئروجینوزا و کاندیدا آلبیکنس تا اثر ممانعت‌کنندگی ندارد در حلیکه بربرین خالص در سه غلظت 50، 100 و 200 میکروگرم/ میلی لیتر مخصوصاً بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس (همراه با افزایش غلظت)، بمیزان قابل توجهی تاثیر ضد میکروبی داشت (10).

کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین عامل اتیولوژیک ناشی از مخمرهای جنس کاندیدا می‌باشد. با توجه به اینکه مقاومت قارچ‌ها نسبت به تعدادی از داروهای ضد قارچی افزایش یافته است و بسیاری از این داروها گران می‌باشد، بررسی فرآورده‌های طبیعی گیاهی موثر بر قارچ‌ها ضروریست (3). به منظور تعیین MIC پودر بر علیه مخمر کاندیدا آلبیکنس مانند روش ذکر شده برای باکتری از روش Microdilution استفاده شد. جذب (انواع میکروپلیت تلقیح شده با سوسپانسیون حاوی کاندیدا آلبیکنس) در الیزاریدر قبل از گرمخانه‌گذاری و بترتیب 24 و 48 ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری ثبت گردید. کمترین غلظتی که بر رشد کاندیدا آلبیکنس تاثیر ممانعت‌کنندگی داشت حدود 40 میلیگرم/ میلی لیتر و میزان MBC بیش از 70 میلیگرم/ میلی لیتر بود. این نتیجه تا حد زیادی با نتیجه (2001) تحقیقی که بیان می‌کرد فعالیت ضد میکروبی بربرین ایزوله شده از *Mahoni aquifolium* بر علیه گونه‌های کلینیکی *Candida tropicalis* و *Candida glabrata* در مقایسه با فعالیت بر علیه گونه‌های *Candida albicans* موثرترست، مشابهت دارد (6).

توسط سوسپانسیون باکتریائی (تنظیم با محلول 0/5% مک فارلند) میزان کدورت اولیه را در الیزاریدر در طول موج 630 نانومتر ثبت کرده و سپس میکروپلیت حاوی سوسپانسیون باکتری گرم مثبت و گرم منفی را در 37 درجه سانتیگراد و میکروپلیت حاوی سوسپانسیون مخمری را در 25 درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری و بعد از گذشت 24 ساعت دوباره جذب در 630 نانومتر ویزان کدورت خوانده شد. البته در مورد مخمر کاندیدا توصیه می‌شود جذب در 48 و 72 ساعت بعد از شروع گرمخانه‌گذاری نیز خوانده شد.

بعد از گذشت 24 ساعت از زمان گرمخانه‌گذاری و برای تعیین حداقل غلظت لازم برای کشندگی میکروب (MBC) و با توجه به میزان MIC، محیط کشت حاوی باکتری گرم مثبت و گرم منفی را در 37 درجه سانتیگراد و پلیت حاوی سوسپانسیون مخمری، در 25 درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری گردید. با گذشت 24 ساعت از زمان گرمخانه‌گذاری می‌توان حداقل غلظتی از محلول (ساخته شده از پودر) که در این غلظت هیچ کلنی (ویا رشد میکروبی) ملاحظه نشد، بعنوان حداقل غلظت کشندگی میکروب (MBC) گزارش نمود.

3- نتایج و بحث

3-1-3- خاصیت ضد باکتریائی پودر حاصل از عصاره ریشه زرشک

در این پژوهش برای تعیین MIC پودر برای باکتری از روش Microdilution استفاده شد. جذب (انواع میکروپلیت تلقیح شده با استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی) در الیزاریدر قبل از گرمخانه‌گذاری و بترتیب 18، 24 ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری ثبت گردید. نتایج حاصل مبین این بود غلیظ‌ترین محلولهای حاصل عصاره می‌تواند از رشد استافیلوکوکوس اورئوس تا حد قابل توجهی ممانعت کند. اما غلظت‌های کمتر از 35 میلیگرم/ میلی لیتر تاثیری بر رشد این میکروب نشان نداد. نتایج حاصل از آزمون تعیین MBC نشان داد که غلظت 70 میلیگرم/ میلی لیتر عصاره بیشترین تاثیر ممانعت‌کنندگی را بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس داشت اما در مورد باکتری اشرشیاکلی مقدار MBC بیش از 70 میلیگرم/ میلی لیتر بود که این نتیجه نشان می‌دهد پودر حاصل از این عصاره تاثیر ضد میکروبی

جدول 1- نتایج فعالیت ضد میکروبی محلول حاوی غلظت‌های مختلف پودر عصاره ریشه زرشک

میکروب ها	اتانول استریل (کنترل منفی)	قطر هاله بازدارندگی (mm)			کنترل مثبت					
		80	70	40	AM0	GM	STR	Pen	MIC mgr/ml	MBC mgr/ml
<i>S.aureus</i> PTTC:1764	ندارد	5	4	1/5	18	23	-	ندارد	40	70
<i>E.coli</i> PTTC:1330	ندارد	ندارد	ندارد	ندارد	15	26	20	ندارد	>80	>80
<i>C.albicans</i> PTTC:5025	ندارد	6/5	5/5	ندارد	-	-	-	ندارد	40	>80

راهنمای جدول : قطر هاله بازدارندگی ارائه شده برای هر غلظت میانگین حاصل از سه اندازه گیری است.

آنتی بیوتیک‌ها AMO : آموکسی سیلین، GM : جنتامایسین، STR : استرپتومایسین، Pen : پنی سیلین بعنوان کنترل مثبت در آزمون‌ها می‌باشند. علامت منفی (-) در جدول مبین عدم استفاده از آنتی بیوتیک می‌باشد. میزان عصاره و اتانول استریل در هر دیسک بلانک 20 میکرولیتر است.

جدول 2- نتایج فعالیت ضد میکروبی محلول حاوی غلظت‌های مختلف از بربرین استاندارد

میکروب ها	اتانول استریل (کنترل منفی)	قطر هاله بازدارندگی (mm)			کنترل مثبت					
		80	70	40	AM0	GM	STR	Pen	MIC mgr/ml	MBC mgr/ml
<i>S.aureus</i> PTTC:1764	ندارد	5	3	2	18	25	-	ندارد	40	70
<i>E.coli</i> PTTC:1330	ندارد	ندارد	ندارد	ندارد	15	22	20	ندارد	80	>80
<i>C.albicans</i> PTTC:5025	ندارد	6	2	ندارد	-	-	-	ندارد	40	>80

راهنمای جدول : قطر هاله بازدارندگی ارائه شده برای هر غلظت میانگین حاصل از سه اندازه گیری است.

آنتی بیوتیک‌ها AMO : آموکسی سیلین، GM : جنتامایسین، STR : استرپتومایسین، Pen : پنی سیلین بعنوان کنترل مثبت در آزمون‌ها می‌باشند. علامت منفی (-) در جدول مبین عدم استفاده از آنتی بیوتیک می‌باشد. میزان عصاره و اتانول استریل در هر دیسک بلانک 20 میکرولیتر است.

1000 میکروگرم/میلی لیتر، عصاره‌های آبی استخراج شده بر علیه باکتری‌های اشرشیا کلی، استفیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، سودومناس آئروجینوزا و مخمر کاندیدا آلیکنس، تاثیر ضد میکروبی ندارد (10).

در سال 2002 نیز محققین اعلام کردند که به حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) بربرین بر علیه رشد گونه‌هایی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و انواعی از قارچ‌ها دست یافته‌اند. در این تحقیق بعنوان کنترل مثبت از آنتی بیوتیک آموکسی سیلین بر علیه گونه‌های باکتریایی و بعنوان کنترل مثبت بر علیه انواع قارچ و مخمر از بیفینازول استفاده شد.

در سال 1997 Schmeller و همکارانش اعلام کردند که بربرین می‌تواند از سنتز DNA و آنزیم Reverse Transcriptase ممانعت کند همچنین گزارش شده که بربرین از فعالیت آنزیم توپوایزومراز 1 و 2 جلوگیری می‌کند.

در سال 2003، تاثیر ضد میکروبی بربرین خالص در غلظت‌های 50، 100 و 200 میکروگرم/میلی لیتر در برابر مخمر کاندیدا آلیکنس نیز به اثبات رسید البته در همین پژوهش بمنظور مقایسه با فعالیت ضد میکروبی بربرین خالص، از عصاره آبی ریشه، ساقه و برگ گیاه *Berberis heterophylla* بمنظور بررسی فعالیت ضد میکروبی استفاده و مشخص گردید که در غلظت‌های 500 و

2- صفائی خرم، م. جعفرنیا، س. و خسرو شاهی، س. 1387. مهمترین گیاهان دارویی جهان. انتشارات آموزشگاه کشاورزی سبز ایران، چاپ دوم. صفحات 236-239.

3- ضیاء، م. ع. بیات، منصور و خلخالی، حسین. 1390. تاثیر اسانس آویشن بر کاندیدا آلیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس دهانی در شرایط آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دوره 13، شماره 3، 44-52.

4- Abeytunga, B.T.U. Pathirante, B.N. and Ratnayaka, W.M.S.R. 2000. Characterisation and assessment of antifungal activity of chemically modified Berberine. J.Nath.Sci Foundation Sri Lanka, 28(3):215-225.

5- Anis, K.V., Kuttan, G., Kuttan, R. 1999. Role of berberine as an adjuvant response modifier during tumor therapy in mice. Pharm. Pharmacol. Commun. 5, 697-700

6-Cernakova, M and Kostalova, D. 2002. Antimicrobial activity of Berberine –a constituent of Mahonia aquifolium . Folia microbial, 47(4), 375-378

7- Choi, B.H. Ahn, I.S. Kim, Y.H. Park, J.W. Lee, S.Y. Hyun, C.K. and Do, M.S. 2006. berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3-L1 adipocyte. Experimental and Molecular Medicine. 38(6):599-60.

8 - Fatehi ,M. Saleh, Tarek M. Fatehi-Hassanabad, Z. Farrokhfal, KH. Jafarzadeh, M. Davodi, S . 2005. A pharmacological study on Berberis vulgaris fruit extract . Journal of Ethnopharmacology 102 : 46–52

9-Fernandez, L. Daruliza, K. Sudhakaran, S. and Jegathambigai, R. 2012. Antimicrobial activity of Piper sarmentosum against methicilin- resistant Staphylococcus aureus(MRSA), Escherchia coli, Vibrio Cholerea and Streptococcus pneumoniae. Europaeen Review for Medicinal and Pharmacological Sciences. 16(3):105-111.

10-Freila, M.L.Giannini, F. Pucci, G.Sturniolo, A. Rodero, L.Pucci, O. Balzaret, V. and Enriz, R. D. 2003. Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from Berberis Heterophylla. Fitoterapia , 74:702-705.

11- Li, A. Zhu, Y. Li, X. Tian ,X. 2007. Antimicrobial activity of four species of Berberidaceae. Fitoterapia, 78: 379–381

12- Livia, S. Daniela, K. Darina, L. Daniela, K. and Victor, K. 2004. Antimicrobial activity of Mahonia aquifolium crude extract and its major isolated alkaloids. Phythoth.Res, 18:674-676

13- Pfoze ,N.L. Kumar, Y. Myrbon, B. Bhagobaty ,R. K. and Joshi, S.R. 2011. In Vitro antibacterial activity of alkaloid extract from stem bark of

نتایج حاصل از این پژوهش مبین این بود که فعالیت ضد میکروبی بربرین ایزوله شده از *Mahonia aquifolium* بر علیه انواع باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از انواع گرم منفی می‌باشد. همچنین فعالیت ضد قارچی این ماده (با توجه به MIC) مبین این موضوع بود که کاندیدا آلیکنس در مقایسه با آسپرژیلوس نیچر نسبت به این ماده مقاومت بیشتری دارد. البته مقاومت ساکارومایسس سرویزیه نسبت به هردو قارچ ذکر شده فوق بیشتر بود (6).

اینگونه تاثیرهای متفاوت بربرین خالص و عصاره آلکالوئیدی، در مقابل گروه‌های میکروبی مختلف را می‌توان ناشی از حضور موثر ترکیبات مختلف (علاوه بر بربرین) در عصاره های استخراج شده دانست که علاوه بر تاثیر بر فعالیت ضد میکروبی بربرین، غلظت موثر این ماده را کاهش می‌دهد. با توجه بهر نتیجه این پژوهش، پودر حاصله از عصاره ریشه زرشک تا حد قابل ملاحظه ای می‌تواند باعث ممانعت از رشد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و مخمر کاندیدا آلیکنس در محیط گردد و با توجه به شرایط مورد استفاده در تولید این پودر (کاملاً سالم و عاری از هر نوع ماده سمی و تاحد زیادی محلول در آب)، می‌توان امیدوار بود که بتوان از این ماده بعنوان ترکیبی ضد میکروب و سالم و بعنوان افزودنی طبیعی در گروهی از مواد غذایی از جمله نوشیدنی‌ها بهره جست. قطعاً استفاده توأم از این ماده با ترکیبات ضد قارچ، علاوه بر کاهش غلظت مورد نیاز از افزودنی‌های سنتزی، تاثیر ضد میکروب این ترکیب را افزایش می‌دهد.

4- سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله از همکاران آزمایشگاه فناوری های نوین غذایی و میکروبیولوژی عمومی واقع در پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد و آزمایشگاه فارماکونگوزی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد کمال سپاس‌گزاری را دارند .

5- منابع

1- پویان، م. 1385. راهنمای گیاهان دارویی، وزارت جهاد کشاورزی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، معاونت آموزش و تجهیز نیروی انسانی.

principles from herbs . Ultrasound Sonochemistry, 8:303-313.

18-Yoga Latha , L. darah, I.Jain, K. Sasidharan, S. 2011.Effect of avernonia cinerea Less methanol extract on growth and morphogenesis of Candida albicans.European review For Medical and Pharmacological Sciences, 15:543-549.

19-Zhang, D. Li, A. Xie, J. and Ji, C. 2010.In vitro antibacterial effect of berberine hydrochloride and enrofloxacin to fish pathogenic bacteria. Agriculture Research. 41, 1095-1100

20- Zhank, R.X., Dougherty, D.V. and Rosenblum, M.L. 1990. Laboratory studies of berberine used alone and in combination with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea to treat malignant brain tumors.Brit.Med .J.103, 658-665.

Mahonia manipurensis Takeda. Journal of medicinal Plant Research. 5(5), 859-861.

14- Schiff, Pl.1987.Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives (Pelletier SW ed) ,5, Willy, New York.

15- Schmeller, T.Latz-Bruning, B.and Wink, M. 1997. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores.Phytochemistry 44,257-266.

16-Supeetha, S. Sharadadevi, M. Sequeira, P. S. Jithesh , J.Shreyas Tikare,T. and Amit, M. 2012 . Antifungal activity of Ginger Extract on Candidia Albicans: An In-Vitro Study. Journal of Dental Sciences and Research,2 (2): 1-5

17-Vinatoru, M. 2001 An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive