مطالعه اثر ضد باکتریایی عصاره ریشه زرشک (*Berberis vulgaris*) و دانه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بصورت انفرادی و توام با نایسین و دی استات سدیم بر باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا*

مریم اختلاط[1*]، ریحانه محمدی دیدارگاهی[2]، فروغ نامجویان[1]، عبدالغنی عامری[3]

۱. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۲. دانش آموخته دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۳. گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *maryam_ekhtelat@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۶

چکیده

امروزه بدلیل سنتزی و شیمیایی بودن آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت بدن نسبت به آنها، استفاده از ترکیبات گیاهی برای درمان بیماری‌ها و عفونت‌ها بسیار موردتوجه قرار گرفته است. در این تحقیق، عصاره گیری از گیاهان با روش خیساندن در اتانول ۸۰ درصد انجام و عصاره ریشه زرشک با روش HPTLC و عصاره دانه رازیانه با استفاده از GC/MS مورد آنالیز قرار گرفت. برای اثر ضد میکروبی در ۳ تکرار از روش انتشار در آگار و میکرودایلوشن استفاده شد. در بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، بین اثر ضد باکتریایی عصاره ریشه زرشک و دانه رازیانه به‌صورت انفرادی و توام با نایسین و دی استات سدیم بر *یرسینیا انتروکولیتیکا* اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در بین عوامل مورد بررسی، نایسین بیشترین اثر آنتی باکتریال و پس از آن به ترتیب عصاره ریشه زرشک و دانه رازیانه اثر ضد باکتریایی خود را نشان دادند. اثر آنتی باکتریال دی استات سدیم بر *یرسینیا انتروکولیتیکا* کمتر بود. این نتایج با نتایج تست انتشار دیسک در آگار تا حد زیادی همخوانی داشت. نتایج نشان داد MIC دی استات سدیم و نایسین توام با عصاره های ریشه زرشک و دانه رازیانه کاهش قابل‌توجهی نسبت به حالت انفرادی هر یک به تنهایی داشت ($P<۰/۰۵$). در خصوص حداقل غلظت کشندگی (MBC) نیز نتایج مشابهی به دست آمد که نشان داد استفاده توأم دی استات سدیم با این عصاره‌ها می‌تواند سبب کاهش میزان مصرف دی استات سدیم به تنهایی و عوارض ناشی از آن گردد. همچنین استفاده توأم عصاره‌ها با نایسین در کاهش مصرف عصاره و تغییرات ارگانولپتیکی ناشی از آن‌ها مؤثر است.

کلید واژه ها: *یرسینیا انتروکولیتیکا* ، ریشه زرشک، دانه رازیانه، نایسین، دی استات سدیم.

مقدمه

طی سالیان متمادی داروهای طبیعی خصوصاً گیاهان دارویی و درعین‌حال مواد اولیه موجود در آن‌ها در صنعت داروسازی مورداستفاده قرار می‌گیرد (Mosaddegh and Naghibi, 2002). افزایش مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها و عدم‌کفایت داروهای شیمیایی معمول در درمان بیماری‌های عفونی و افزایش آگاهی و توجه هر چه بیشتر مصرف‌کنندگان و متولیان بهداشتی به اثرات مضر نگه‌دارنده‌های شیمیایی و سنتتیک، موجب انجام تحقیق‌های گسترده جهت دستیابی به ترکیب‌های طبیعی با دامنه وسیع فعالیت‌های بیولوژی شده است (Hasanvand et al., 2016; Heshmati et al., 2016). همین موضوع یکی از دلایل مقبولیت و استفاده رو به رشد از گیاهان به‌عنوان مواد طبیعی کم‌خطر، در دسترس و ارزان‌قیمت، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک، در درمان عفونت‌های باکتریال شده است (Mosaddegh and Naghibi, 2002; Weinstein, 2001). گیاهان دارویی حاوی ترکیبات ثانویه وسیع با فعالیت زیستی مهمی هستند که با فن‌آوری‌های عصاره گیری این ترکیبات فعال از منابع گیاهی استخراج و عصاره‌های گیاهی به‌طور وسیعی در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی مورداستفاده قرار می‌گیرند (Zhang et al., 2005). زرشک[1] به دلیل داشتن ترکیبات آلکالوئیدی (بربرین) اثرات درمانی زیادی مانند جلوگیری از رشد باکتری ها، کاهش انقباض عضلات صاف، کاهش

1. *Berberis vulgaris*

www.SID.ir

Archive of SID

التهاب، تحریک ترشح صفرا، کاهنده فشار خون، ضد دیابتی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی و غیره دارد (El-Wahab et al., 2013; Meliani et al., 2011; Fata et al., 2006). رازیانه[1] از خانواده چتریان، از قرن ها پیش در طب سنتی ایران به‌عنوان ضد نفخ، مدر، دفع‌کننده سنگ‌های کلیه و مجاری ادراری، ضد التهاب، ضداسپاسم و افزایش‌دهنده شیر مادران مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mosaddegh and Naghibi, 2002; Kaur and Arora, 2009; Oktay et al., 2003). نایسین یکی از نگهدارنده‌های طبیعی می‌باشد که توسط لاکتوکوکوس لاکتیس تولید می‌شود. نایسین به علت طبیعی و غیر سمی بودن، پایداری در pH های اسیدی، حلالیت بالا در محیط‌های آبی، قابلیت تجزیه توسط آنزیم‌های هضم کننده و عدم تاثیر بر فلور میکروبی روده، عدم سرطانزایی، تغییر ندادن بو یا طعم غذا و طیف وسیع فعالیت میکروبی به عنوان یک نگهدارنده مطلوب در مواد غذایی مطرح می‌باشد (Dykes et al., 2003; Dabagh et al., 2012). دی استات سدیم با نام تجاری آلویتا از نگهدارنده های طبیعی بوده که استفاده از آن به عنوان یک افزودنی ضد فساد مواد غذایی توسط سازمان غذا و دارو[2] و سازمان بهداشت جهانی[3] مجاز شناخته شده است (Jay, 2000). دی استات سدیم به عنوان نگهدارنده و بازدارنده کپک و مخمر و بعضی از باکتری‌ها، کمپلکس دهنده و تثبیت کننده استفاده می‌شود (Sallam, 2007; Neetoo, 2016). *یرسینیا انتروکولیتیکا* با گستردگی محیطی عامل بیماری‌های گوارشی متعددی به خصوص در کودکان و نوجوانان می‌باشد که در موارد حاد می‌تواند موجب آسیب‌های کلیوی، التهاب مزمن مفاصل و اختلال در سیستم اعصاب مرکزی شود (Trajković-Pavlović et al., 2007). تحقیقات در جهت شناسایی ترکیبات ضدمیکروبی جدید با منشاء طبیعی، روز به روز در حال افزایش است. گیاهان عالی دارای متابولیت‌های ثانویه فراوانی می‌باشند که می‌توانند به عنوان یکی از مهمترین منابع دارویی با اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی جدید شمرده شوند. از سویی استفاده از اثرات سینرژیسمی در استفاده توام انواع عوامل ضد میکروبی، می‌تواند دوز مصرف داروها و نگهدارنده‌ها را کاهش دهد (Oussalah et al., 2007). در نتیجه این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد میکروبی عصاره دانه رازیانه و ریشه زرشک به صورت مجزا و توام با نایسین و دی استات سدیم بر *یرسینیا انتروکولیتیکا* انجام گردید.

روش کار

عصاره‌گیری و آنالیز شیمیایی عصاره‌ها

ریشه گیاه زرشک و دانه رازیانه به ترتیب از بیرجند و قزوین جمع آوری و پس از آسیاب نمودن گیاه به مقدار کافی، عصاره‌های هیدروالکلی آنها به روش خیساندن در اتانول ۸۰ دصد (مرک آلمان) تهیه و به کمک دستگاه تقطیر با خلاء دوار یا روتاری[4] تغلیظ و توسط فریز درایر[5] خشک گردید. عصاره ریشه زرشک به روش کروماتوگرافی لایه‌نازک باکارآیی بالا[6] مورد آنالیز قرار گرفت (Maithani et al., 2014). برای این آنالیز رقت‌های مختلف از بربرین استاندارد و عصاره ریشه زرشک در حلال اتانول (۱mg/mL) تهیه و به دستگاه تزریق شد. در این بررسی فاز ثابت سیلیکاژل 60F254 و برای فاز متحرک از سیستم حلالی بوتانول: اسید استیک: آب (۸:۱:۱) استفاده گردید. آنالیز عصاره دانه رازیانه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی[7] (Agilent 7890S/5975C, UK) انجام گردید. برای این منظور عصاره دانه رازیانه (5 mg/mL) در اتانول حل و به آن مقداری سولفات سدیم به‌عنوان جاذب الرطوبت افزوده و پس از عبور از

1. *Foeniculum vulgare* mill.
2. Food and Drug Administration (FDA)
3. World Health Organization (WHO)
4. Rotary evaporator
5. Freeze drayer
6. High performance thin layer chromatography (HPTLC)
7. Gas Chromatography-Mass Spectrometry method (GC/MS) (GC Agilent 7890, UK)

www.SID.ir

فیلتر سرنگی به دستگاه تزریق گردید. دمای اولیه محفظه ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود که با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد می‌رسید و سه دقیقه حفظ می‌شد. فاز ساکن ستون Agilent 190915-433 (30m × 0.25mm × 0.25 µm) و فاز متحرک گاز هلیوم با جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه بود (Singh et al., 2006).

سویه باکتریایی و عوامل مورد بررسی

جهت این مطالعه، باکتری لیوفیلیزه *یرسینیا انتروکولیتیکا* (ATCC:۲۳۷۱۵) از انستیتو پاستور ایران، سدیم دی استات و نایسین (۲/۵٪ w/w) از شرکت سیگما آمریکا تهیه گردید. به منظور فعال‌سازی نایسین، به میزان mg/mL ۲۰ در اسیدکلریدریک ۰/۰۲ مولار حل می‌گردید در این حالت محلول آماده‌شده دارای µ ۵۰۰g/mL نایسین خالص بوده که رقت‌های متوالی از آن در محیط مولر هینتون براث[1] (Quelab Chemical Co, Canada) برای بررسی اثر ضدمیکروبی تهیه می‌شد.

سنجش میکروبی

به منظور بررسی اثر ضدمیکروبی، از روش انتشار دیسک و میکرودایلوشن استفاده شد. به منظور بررسی منحنی رشد باکتری و پی‌بردن به تعداد باکتری برای تهیه تلقیح اولیه از باکتری (۵×۱۰^{۶} CFU/mL)، دو کشت متوالی[2] در محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) در انکوبه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت در ۳ تکرار انجام گردید. سپس جمعیت باکتریایی با تهیه رقت‌های سریالی و کشت بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Quelab Chemical Co, Canada) شمارش گردید.

روش انتشار دیسک[3]

به‌منظور بررسی اثر ضد میکروبی، از روش انتشار در آگار در ۳ تکرار استفاده شد (Wayne, 2009a)، بطوریکه ۳۰ میکرولیتر از هر عصاره (۴۰۰ mg/mL)، نایسین (۱۰۰µg/mL، ۲۵۰ و ۵۰۰) و دی استات سدیم (۴۰٪ و ۸۰٪) بر روی دیسک‌های بلانک استریل استاندارد(Padtan Teb, Iran) با قطر ۶ میلی متر قرار و پس از خشک شدن با پنس استریل بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار[4] (MHA) آغشته با کدورت ۰/۵ مک فارلند باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* قرار می‌گرفت. به عنوان شاهد منفی از آب مقطر استریل و حلال عصاره (توین ۸۰)، و به عنوان شاهد مثبت از چند دیسک آنتی بیوتیک استاندارد (اریترومایسین، استرپتومایسین، سیپروفلوکسازین و جنتامایسین) استفاده شد، سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از ان میزان مناطق مهاری یا قطر هاله عدم رشد براساس میلی‌متر محاسبه گردید.

روش میکرودایلوشن[5]

برای دستیابی به حداقل غلظت مهار کنندگی[6](MIC) و حداقل غلظت کشندگی[7] (MBC) از روش میکرودایلوشن در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استریل استفاده شد (Wayne, 2009b; Rohani et al., 2011). در این روش رقت‌های متوالی از عصاره‌ها (۰/۲ mg/mL تا۳۶۰)، نایسین (۰/۱۲ µg/mL تا۴۰۰) و دی استات سدیم (۱ تا ۷۲٪) بطور مجزا در محیط MHB تهیه و سپس هر کدام از رقت‌ها با مقدار مشخصی از باکتری اولیه (۵×۱۰^{۶} CFU/mL) در ۳ تکرار تلقیح شد. به منظور حلالیت عصاره‌ها در محیط، MHB حاوی ۲٪ توین ۸۰ تهیه گردید. در کنار رقت-های مورد آزمایش، یک کشت کنترل مثبت (فاقد عصاره، سدیم دی استات و نایسین) و یک کشت کنترل منفی (محیط فاقد باکتری) نیز استفاده شد. به‌طور خلاصه ۱۶۰ میکرولیتر محیط کشت، ۲۰ میکرولیتر از

1. Muller Hinton Broth (MHB)
2. Two overnight culture
3. Disk diffusion method
4. Muller Hinton Agar (MHA)
5. Micro-Well Dilution Method
6. Mnimum Inhibitory Concentration (MIC)
7. Mnimum Bcteriocidal Cncentration (MBC)

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت‌های مختلف عصاره‌ها، سدیم دی استات و نایسین و ۲۰ میکرو لیتر از باکتری آماده تلقیح (۵×۱۰^{۶} CFU/mL) به هر چاهک در میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه می‌گردید تا تعداد نهایی باکتری‌ها در هر چاهک معادل ۱×۱۰^{۵} CFU/well برسد. ابتدا محتوای هر چاهک بر روی میکروپلیت شیکر به مدت ۲۰ ثانیه با سرعت ۳۰۰ rpm مخلوط و سپس به منظور تعیین MIC و MBC، در انکوباتور به مدت۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌گردید. حداقل غلظتی که مانع رشد باکتری شده بود یا عدم کدورت مشهود با گروه کنترل داشت، به‌عنوان MIC و حداقل غلظتی که سبب مرگ باکتری و عدم ظهور کلونی در محیط MHA می‌گردید به عنوان MBC تعیین شد. برای بررسی اثر توام عصاره‌ها با نایسین و دی استات سدیم، از رقت‌های معادل ۱/۲ مقادیر MIC هر عصاره در کنار رقت‌های متوالی نایسین (۰/۰۰۵ تا ۱۰۰ µg/mL) و دی استات سدیم (۰/۲۵ تا ۵۶٪) در کنار کنترل مثبت و منفی در ۳ تکرار استفاده شد. تمامی مراحل مشابه روش فوق بود با این تفاوت که ۱۴۰ میکرولیتر محیط MHB حاوی ۲٪ توین ۸۰ ، ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف سدیم دی استات و نایسین، ۲۰ میکرولیتر از رقت معادل ۱/۲ MIC هر عصاره و ۲۰ میکرولیتر از باکتری آماده شده به هر چاهک در میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه می‌گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS 16 استفاده گردید. بررسی تأثیر انواع عوامل بر باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* توسط آنالیز واریانس[1]و بررسی اختلاف شاخص‌ها هم توسط آزمون تعقیبی دانکن با سطح معنی داری P<۰/۰۵ انجام گردید.

نتایج

در آنالیز عصاره ریشه زرشک با روش HPTLC، غلظت بربرین[2]در این عصاره ۲۰/۸۷ درصد محاسبه گردید. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز GC/MS عصاره دانه رازیانه، ۲-اتیل هگزیل فتالات[3] و ترانس آنتول[4] بیشترین میزان را در این عصاره به خود اختصاص داده بود. نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ها، نایسین و دی استات سدیم بر *یرسینیا انتروکولیتیکا* در روش انتشار دیسک در آگار براساس قطر هاله عدم رشد در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشتر بودن میزان قطر هاله عدم رشد به معنی بیشتر بودن اثر ضد باکتریایی می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از روش میکرودایلوشن، بصورت میانگین و انحراف معیار حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها، نایسین و دی استات سدیم بر *یرسینیا انتروکولیتیکا* بصورت انفرادی و توام در جدول ۲ و ۳ آورده شده است. کوچکتر بودن میزان MIC و MBC نشان‌دهنده بیشتر بودن اثر آنتی باکتریال می باشد. با تجزیه و تحلیل داده ها توسط آنالیز واریانس در بین عوامل مورد بررسی، نایسین بیشترین اثر آنتی باکتریال و پس از آن به ترتیب عصاره ریشه زرشک و دانه رازیانه اثر ضد باکتریایی خود را بر *یرسینیا انتروکولیتیکا* نشان دادند. در این بین اثر آنتی باکتریال دی استات سدیم بر باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* از همه عوامل مورد بررسی کمتر بود. این نتایج تا حد زیادی با نتایج حاصل از تست انتشار دیسک در آگار همخوانی داشت (جدول ۱). در این مطالعه اثر توام دی استات سدیم و نایسین با عصاره-های ریشه زرشک و دانه رازیانه در مقایسه با اثر انفرادی آنها اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵)، در واقع استفاده توام سبب افزایش قابل توجهی در اثر بازدارندگی انفرادی آنها بر *یرسینیا انتروکولیتیکا* گردید. در مقایسه این عوامل، اثر آنتی

1. One Way ANOVA

2. Berberine
3. Bis (2-ethylhexyl) phthalate
4. Trans-anethole

www.SID.ir

باکتریال دی استات سدیم و نایسین توام با عصاره ریشه زرشک بطور معنی داری بیشتر بود (P<۰/۰۵). در خصوص MBC و مقایسه اثرات انفرادی عوامل مورد بررسی، نایسین و عصاره ریشه زرشک به ترتیب بیشترین اثر کشندگی را بر *یرسینیا انتروکولیتیکا* نشان دادند. اما عصاره دانه رازیانه و دی استات سدیم در غلظت‌های مورد بررسی نتوانستند سبب مرگ باکتری شوند. اگرچه دی استات سدیم توام با عصاره ریشه زرشک توانست اثر کشندگی در غلظت ۳۶٪ بر باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* داشته باشد در صورتیکه در خصوص دی استات سدیم بصورت انفرادی تا غلظت ۷۲ درصد و توام آن با عصاره دانه رازیانه تا غلظت ۵۶درصد، MBC بدست نیامد. همچنین در این بررسی اثر کشندگی نایسین بصورت توام با عصاره‌ها علیه باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* بطور معنی داری بیشتر از اثر انفرادی آن بود.

جدول ۱: قطر هاله عدم رشد باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* در حضور نایسین، دی استات سدیم و عصاره‌های ریشه زرشک و دانه رازیانه در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های استاندارد با روش انتشار دیسک (با قرارگیری ۳۰L µ از هر یک از عوامل مورد بررسی در هر دیسک)

روش انتشار دیسک (mm)	ریشه زرشک ۴۰۰ (mg/mL)	دانه رازیانه ۴۰۰ (mg/mL)	نایسین (µg/mL) ۵۰	۲۵۰	۱۰۰	دی استات سدیم(%) ۴۰	۸۰	اریترومایسین µ۱۵g	استرپتومایسین µ۱۰g	سیپروفلوکسازین µ۵g	جنتامایسین µ۱۰g	توبین ۸۰
یرسینیا انتروکولیتیکا	۲۲	۱۱	۲۸	۲۴	۲۱	R	R	۱۰	۱۷	۳۲	۲۸	R

R: مقاوم

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) نایسین، دی استات سدیم و عصاره‌های ریشه زرشک و دانه رازیانه بصورت انفرادی بر باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ۳ تکرار

تیمار / *یرسینیا انتروکولیتیکا*	نایسین(µg/mL) انحراف معیار± میانگین (Mean ± SD)	دی استات سدیم(%) انحراف معیار± میانگین (Mean ± SD)	عصاره ریشه (mg/mL) زرشک انحراف معیار± میانگین (Mean ± SD)	عصاره دانه رازیانه(mg/mL) انحراف معیار± میانگین (Mean ± SD)
MIC	**۰/۰ ± ۱/۲۵**	**۴/۶۱ ± ۴۵/۳۳**	**۱/۱۵ ± ۳/۳۳**	**۴۶/۱۸ ± ۱۷۳/۳۳**
MBC	**۰/۰ ± ۲۰/۰**	**N_1**	**۲/۳۰ ± ۱۷/۳۳**	**N_2**

N_1: منفی تا ۷۲٪ ، N_2: منفی تا ۳۶۰ mg/mL

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) نایسین و دی استات سدیم بصورت توام با عصاره‌های ریشه زرشک و دانه رازیانه بر باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* در ۳ تکرار

تیمار / *یرسینیا انتروکولیتیکا*	نایسین توام با ریشه زرشک(µg/mL) MIC ½ میانگین±انحراف معیار (Mean ± SD)	دی استات سدیم توام با ½ MIC ریشه زرشک(%) میانگین±انحراف معیار (Mean ± SD)	نایسین بصورت توام با MIC رازیانه (µg/mL) ½ میانگین±انحراف معیار (Mean ± SD)	دی استات سدیم توام با ½ MIC رازیانه(%) میانگین±انحراف معیار (Mean ± SD)
MIC	**۰/۰۴ ± ۰/۰۱**	**۲۴/۰ ± ۰/۰**	**۰/۶۶ ± ۰/۲۸**	**۱۸/۶۶ ± ۲/۳۰**
MBC	**۰/۲۰ ± ۰/۰۷**	**۳۶/۰ ± ۰/۰**	**۲/۵۰ ± ۰/۰**	**N**

N: منفی تا ۵۶٪

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

با توجه به مقاومت دارویی و عوارض جانبی داروهای آنتی باکتریال شیمیایی، رویکرد تحقیقات به منابع طبیعی در چند دهه اخیر بسیار فراوان می‌باشد از جمله در تحقیقات متعددی اثرات ضد میکروبی گیاهان مختلف به اثبات رسیده است (Semnani et al., 2006). اگرچه در دهه‌های گذشته حضور ترکیبات شیمیایی به عنوان دارو یا طعم‌دهنده و یا نگهدارنده باعث کم رنگ شدن نقش گیاهان گردیده است ولی بدلیل اثرات مضر به مراتب کمتر گیاهان و ترکیبات مشتق شده از آنها نسبت به ترکیبات شیمیایی رویکرد جدیدی به گیاهان و اثرات مختلف آنها درچند سال اخیر به چشم می خورد. در مطالعه حاضر طبق آنالیز عصاره ریشه زرشک، بربرین یکی از ترکیبات اصلی در این عصاره بوده است. اثرات ضد میکروبی مشاهده شده گیاه زرشک می‌تواند مربوط به بربرین باشد اگرچه ترکیبات دیگر گیاه هر چند اندک هم می‌توانند در این زمینه موثر باشند. طبق بررسی‌های انجام شده بر روی مکانیسم عمل بربرین، اثر ضد میکروبی آن می‌تواند مرتبط با اثر بربرین بر سنتز DNA، RNA و پروتئین، ایجاد اختلال در ساختمان غشا سلولی باکتری‌ها و مهار آنزیم‌های سلولی باشد (Jin et al., 2010; Peng et al., 2015). در آنالیز GC/MS که در این مطالعه بر روی عصاره رازیانه صورت گرفت مشخص شد ۲-اتیل هگزیل فتالات و ترانس آنتول از اجزای تشکیل دهنده اصلی آن هستند که در مطالعات زیادی خواص ضد میکروبی آنها دیده شده است (Senatore et al., 2013; Habib and Karim, 2009; Esfandyari-Manesh et al., 2013) در مطالعه‌ای که توسط کار و همکاران (۲۰۰۹) بر روی رازیانه و چند گیاه دیگر انجام شد مشخص شد دانه رازیانه دارای اثر ضدمیکروبی قابل توجهی است (Kaur and Arora, 2009). همچنین رابی و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره بابونه و رازیانه مشاهده نمودند عصاره رازیانه حداقل غلظت مهارکنندگی رشد را به ترتیب علیه *اسپرژیلوس فلاوس*، *کاندیدا آلبیکنس*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس ارئوس* دارد (Roby et al., 2013). با وجود مشاهده اثر ضد میکروبی عصاره دانه رازیانه علیه باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* در تحقیق حاضر، این اثر در مقایسه با عصاره ریشه زرشک و نایسین بطور معنی داری کمتر بود. در مطالعه مبصری و همکاران (۲۰۰۹)، تاثیر نایسین بر کاهش غلظت نگهدارنده‌های شیمیایی رایج بر علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* بررسی و نشان داده شد می‌توان از نایسین به عنوان یک نگهدارنده بی ضرر در فراورده‌های خوراکی استفاده و غلظت نگهدارنده‌های شیمیایی را کاهش داد (Mobasseri et al., 2009). با وجود اثر ضد میکروبی منابع طبیعی مانند عصاره‌های گیاهی، بکارگیری حجم زیاد از آنها در داروها و فراورده‌های خوراکی سبب تغییر طعم و بوی آنها گردیده که سبب محدودیت استفاده از آنها به عنوان نگهدارنده می‌گردد (Leistner and Gorris, 1995). در نتیجه برای حفظ امنیت خوراکی و حفظ طعم و بوی فراورده، استفاده همزمان از چند نگهدارنده به میزان کم بهتر از بکارگیری مقدار زیاد هر یک از آنها به تنهایی می‌باشد (Pol et al., 2002). بنابراین ارزیابی اثر ضد میکروبی عوامل طبیعی به تنهایی و توام با سایر عوامل ضد میکروبی حائز اهمیت می‌باشد. بطوریکه تحقیقات زیادی در استفاده توام انواع عوامل میکروبی به عنوان عامل درمانی و نگهدارنده برای دستیابی به اثر سینرژیستی آنها صورت گرفته است (Dabagh et al., 2012; Moosavy et al., 2013).

نتیجه گیری

بر اساس این مطالعه، استفاده از گیاهان دارویی زرشک و رازیانه می‌تواند علیه *یرسینیا انتروکولیتیکا* و خطرات ناشی از آن موثر باشد. هم چنین بین اثر ضد باکتریایی

www.SID.ir

نایسین و دی استات سدیم بصورت انفرادی و توام با عصاره‌ها بر *یرسینیا انتروکولیتیکا* اختلاف معنی داری مشاهده شد که نشان‌دهنده آن است که استفاده توام این عوامل ضد میکروبی سبب افزایش قدرت ضدمیکروبی آنها در مقایسه با اثر انفرادی هر یک به تنهایی می‌گردد. علاوه بر این، میزان مصرف هر یک بطور توام، نسبت به حالت انفرادی کاهش یافته که از اثرات جانبی آنها مانند سمیت و تغییرات ارگانولپتیکی جلوگیری می‌نماید.

تشکر و قدردانی

اعتبار مالی این مطالعه از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تامین و مستخرج از پایان نامه خانم ریحانه محمدی دیدارگاهی (B-۹۶۲۱) می‌باشد.

منابع

1. Dabagh, N., Hoseini, S., Shabani, S., Alimi M. 2012. Evaluation of the possibility of using nisin and sodium diacetate as natural preservatives in french salad dressing. J Food Sci Technol Nutr. 9: 39-46.

2. Dykes, G.A., Amarowicz R., Pegg, R.B. 2003. Enhancement of nisin antibacterial activity by a bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaf extract. Food Microbiol. 20: 211-216.

3. El-Wahab, A.E.A., Ghareeb, D.A., Sarhan, E.E., Abu-Serie, M.M., El Demellawy, M.A. 2013. In vitro biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. BMC Complement Altern Med. 13: 218.

4. Esfandyari-Manesh, M., Ghaedi, Z., Asemi, M., Khanavi, M., Manayi, A., Jamalifar, H., Atyabi, F., Dinarvand, R. 2013. Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles. J Pharm Res. 7: 290-295.

5. Fata, A., Rakhshandeh, H., Berenji, F., Jalilianfard, A. 2006. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in murine model by Alcoholic Extract of *Berberis vulgaris*. Iran J Parasitol. 1: 39-42.

6. Habib, M.R., Karim, M.R. 2009. Antimicrobial and cytotoxic activity of di-(2-ethylhexyl) phthalate and anhydrosophoradiol-3-acetate isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) flower. Mycobiol. 37: 31-36.

7. Hasanvand, H., Moshtaghi, H., Heshmati, A., Boniadian, M., Abbasvali, M. 2016. Inhibitory Effect of Echinophora platyloba Essential Oil on *Aspergillus flavus* in Culture Media and Cheese. J Food Qual Hazards Control. 3: 122-127.

8. Heshmati, A., Azizi, M., Ghadimi, S. 2016. Influence of Ethanol and Methanol Extracts of Walnut Leaf and Green Hull on *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus Licheniformis* and *Aspergillus niger* in Date Syrup. Iran J Nutr Sci Food Technol. 11: 81-88.

9. Jay, J.M. 2000. Modern food microbiology. 7th edition, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. pp. 251-268.

10. Jin, J., Hua, G., Meng, Z., Gao, P. 2010. Antibacterial mechanisms of berberine and reasons for little resistance of bacteria. Chin Herb Med. 3: 27-35.

11. Kaur, G.J. Arora, D.S. 2009. Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. BMC Complement Altern Med. 9:30.

12. Leistner, L, Gorris, L.G. 1995. Food preservation by hurdle technology. Trends Food Sci Technol. 6: 41-46.

13. Maithani, A., Parcha, V., Kumar, D. 2014. Quantitative estimation of berberine content of *Berberis asiatica* from different altitude of Garhwal Himalaya. Asian J Pharm Clin Res. **7**: 165-167.

14. Meliani, N., Dib, M.E.A., Allali, H., Tabti, B. 2011. Hypoglycaemic effect of *Berberis vulgaris* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Asian Pac J Trop Biomed. 1: 468-471.

15. Mobasseri, S., Malekzadeh, F., Pourbabai, A.A, Jandaghi, P. 2009. Effect of

www.SID.ir

Archive of SID

and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Ind Crops Prod. 44: 437-445.
24. Rohani, S.M.R., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S., Griffiths, M.W. 2011. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. LWT-Food Sci Technol. 44: 2260-2265.
25. Sallam, K.I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control. 18: 566–575.
26. Semnani, M.K., Saeedi, M., Mahdavi, M.R., Rahimi, F. 2006. Antimicrobial studies on extracts of three species of phlomis. Pharm Biol. 44: 426-429.
27. Senatore, F., Oliviero, F., Scandolera, E., Taglialatela-Scafati, O., Roscigno, G., Zaccardelli, M., De Falco, E. 2013. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare* Mill. ssp. vulgare var. azoricum (Mill.) Thell]. Fitoterapia. 90: 214-219.
28. Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M.P., Catalan, C. 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. Food Control. 17: 745-752.
29. Trajković-Pavlović, L.B., Popović, M.B., Novaković, B.D., Gusman-Pasterko, V.P., Jevtić, M.R., Mirilov, J.M. 2007. Occurrence of Campylobacter, Salmonella, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in some retail food products in Novi Sad. Cent Eur J Public Health. 15: 167-171.
30. Wayne, P. 2009a. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) performance standards for antimicrobial disk diffusion susceptibility tests 19th ed. approved standard. CLSI document M100-S19. USA.

nisin on decreasing concentration of chemical preservatives. Med Sci J. 19: 197-200.
16. Moosavy, M., Mahmoudi, R., Davudi, S., Shavisi, N. 2013. Antimicrobial Eefficacy of *Mentha spicata* essential oil and nisin in combination on *Listeria monocytogenes*. J Med Plants. 4: 104-116.
17. Mosaddegh, M., Naghibi, F. 2002. Iranian traditional medicine, past and present in traditional medicine and materia medica. Traditional Medicine and Materia Medica Research Center (TMRC), Tehran, pp. 2-20.
18. Neetoo, H. 2016. Synergistic Antimicrobial Effect of Chitosan with Nisin and Sodium Lactate, Sodium Diacetate, or Potassium Sorbate as Edible Coatings against *Listeria monocytogenes* and Bacterial Flora of Cooked Tuna Loins. Asian J Agric Food Sci. 4: 303-311.
19. Oktay, M., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. LWT-Food Sci Technol. 36: 263-271.
20. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 18:414-420.
21. Peng, L., Kang, S., Yin, Z., Jia, R., Song, X., Li, L., He, C., Ye, G., Yin, L., Shi, F., Lv, C., Jing, B. 2015. Antibacterial activity and mechanism of berberine against *Streptococcus agalactiae*. Int J Clin Exp Pathol. 8:5217-5223.
22. Pol, I.E., Krommer, J., Smid, E.J. 2002. Bioenergetic consequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*. Innov Food Sci Emerg Technol. 3:55-61.
23. Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.H., Khalel, K.I. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.)

www.SID.ir

31. Wayne, P. 2009b. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard-8th ed, CLSI document M07-A8. USA.
32. Weinstein, R.A. 2001. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: infection control and use of antibiotics. Emerg Infect Diseases. 7: 188.
33. Zhang, F., Chen, B., Xiao, S., Yao, S.Z. 2005. Optimization and comparison of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of Macleaya cordata (Willd) R. Br. Sep Purif Technol. 42: 283-290.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of antibacterial effects of barberry root (*Berberis vulgaris*) and fennel seed (*Foeniculum vulgare*) extracts individually and combined with nisin and sodium diacetate on *Yersinia enterocolitica*

Ekhtelat M[1*], Mohammadi Didargahi R[2], Namjoyan F[3], Ameri A[4]

1. Medicinal Plant Research Center, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2. Graduated of Pharm D, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

3. Medicinal Plant Research Center, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

4. Department of Drug and Food Control, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

***Corresponding author:** *maryam_ekhtelat@yahoo.com*

Received: 28 October 2018 Accepted: 26 January 2019

Abstract

Due to the synthetic and chemical nature of antibiotics and the phenomenon of body resistance against them, using herbal compounds to cure infections and diseases are being noticed a lot, today. In this study, extracting the herbs was done by soaking in 80% ethanol. *Berberis Vulgaris* (Barberry root) by HPTLC and *Foeniculum vulgare* (*F. vulgare*). Mill (Fennel seed) by GC/MS methods were analyzed. Disk diffusion and micro dilution methods were used to detection of the antibacterial effect in triplicate. Minimal of inhibitory concentration (MIC) between the antibacterial effects of *Berberis vulgaris* (*B. vulgaris*) and *F. vulgare* Mill extracts individually and combined with nisin and sodium diacetate showed a significant difference against *Yersinia enterocolitica*. Among the studied factors, nisin had the most antibacterial effect and followed by the extract of *B. vulgaris* and *F. vulgare* Mill respectively. The antibacterial effect of sodium diacetate against *Y. enterocolitica* was the lowest. These results were almost consistent with those achieved by disk diffusion method. Our results indicated that MIC of sodium diacetate and nisin combined with the extracts of *B. vulgaris* and *F. vulgare* mill had a remarkable decrease compared to each one's effect individually ($P<0.05$). Results were similar about minimal bactericidal concentration (MBC), which showed simultaneous usage of sodium diacetate with these extracts can decrease the use of sodium diacetate a lonely and its complications. Moreover, combined consumption of extracts with nisin decreases the use of the extracts and the resultant organoleptic changes.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, Barberry root, Fennel seed, Nisin, Sodium diacetate.

www.SID.ir