

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.irپژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی

مقاله تحقیقاتی

بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره مایی جوشیده و نجوشیده زردچوبه، فلفل قرمز و فلفل سیاه در شرایط مختلف

حوریه سادات میرمالک ثانی^۱، نسرين صمدی^{۲*}^۱ دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران^۲ گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی و پژوهشکده علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

گل واژگان:

اثر ضد میکروبی

ادویه

زردچوبه

فلفل سیاه

فلفل قرمز

مقدمه: ادویه ها علاوه بر ایجاد عطر و طعم مطلوب، با مهار کردن رشد انواع میکروارگانیسم ها نقش مهمی در افزایش طول عمر مفید مواد غذایی دارند. بنابراین به نظر می رسد می توان از آنها برای نگهداری مواد غذایی استفاده کرد. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره مایی فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه به تنهایی یا ترکیب با هم در دو حالت نجوشیده و جوشیده و در شرایط مختلف اسیدی و نمکی در مقابل چهار باکتری بیماری زای مواد غذایی می باشد. **روش بررسی:** اثر ضد میکروبی عصاره مایی ادویه ها در دو حالت نجوشیده و جوشیده و همچنین در pH برابر با ۴ تا ۵/۵ و در حضور ۴ گرم در لیتر کلرید سدیم و به صورت ترکیبی در مقابل دو باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز) و دو باکتری گرم منفی (اشریشیاکلی و سالمونلا انتریکا) به روش رقیق سازی در محیط آگار بررسی شد. **نتایج:** عصاره مایی فلفل قرمز بیشترین اثر ضد میکروبی را بخصوص در حالت نجوشیده داشت. باکتری های گرم مثبت به طور کلی حساسیت بیشتری را نسبت به ادویه های مورد آزمون نشان دادند. اثرات ضد میکروبی ادویه ها در حالت نجوشیده بیشتر از حالت جوشیده بود. شرایط اسیدی و حضور نمک باعث کاهش اثر ضد میکروبی ادویه ها شد. در بررسی اثر ترکیبی عصاره مایی ادویه ها یک اثر هم افزایی میان فلفل قرمز و فلفل سیاه مشاهده شد. **نتیجه گیری:** با استفاده از ترکیب ادویه ها می توان سیستم های محافظت ضد میکروبی مناسبی برای فرآورده های غذایی طراحی نمود.

۱. مقدمه

ضدمیکروب طبیعی در میان مصرف کنندگان بیشتر مورد توجه

امروزه به علت افزایش نگرانی ها در خصوص استفاده از قرار گرفته اند. جوامع علمی نیز امروزه توجه زیادی به فعالیت مواد ضدمیکروب و نگهدارنده های شیمیایی، ترکیبات ضدمیکروبی فرآورده های طبیعی دارند [۱، ۲]. از اینرو برای

مخفف ها: MIC، حداقل غلظت مهارکننده رشد؛ OD، جذب نوری؛ CFU، واحد تشکیل دهنده کلنی

* نویسنده مسؤول: samadin@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۳۰ آذر ۱۳۹۷؛ تاریخ دریافت اصلاحات: ۱۹ اسفند ۱۳۹۷؛ تاریخ پذیرش: ۲۷ اسفند ۱۳۹۷

doi: 10.29252/jmp.19.74.145

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

غذایی وجود دارد، بنابراین لازم است که تأثیر شرایط فرآوری و ذخیره‌سازی، هنگام کاربرد ضد میکروب‌های طبیعی در تهیه فرآورده‌های غذایی مورد مطالعه قرار گیرد [۱]. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت ضد میکروبی فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه، در شرایط مختلف دمایی، اسیدی و نمک طراحی و اجرا شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱.۲. ادویه‌های مورد مطالعه

ادویه‌های مورد مطالعه شامل فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه از پژوهشگاه گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی خریداری شدند.

۲.۲. تهیه عصاره مایی ادویه‌ها

در این مطالعه عصاره مایی ادویه‌ها با توجه به روش معمول مصرف ادویه‌ها در تهیه فرآورده‌های غذایی به روش زیر تهیه شد.

۲.۲.۲. ۱.۲.۲. تهیه عصاره مایی نجوشیده

برای این منظور از هر ادویه مقدار ۸۰ گرم توزین و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل پراکنده شد. رقت‌های بعدی آن شامل ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲، ۰/۶، ۰/۳، ۰/۱۵، ۰/۰۷۵ گرم در صد میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شدند. سپس همه نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند.

۲.۲.۲. ۲.۲.۲. تهیه عصاره مایی جوشیده

برای این منظور مثل روش بالا عمل شد. پس از تهیه رقت‌ها هر کدام بر روی هیتراستیرر با دمای حدود ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و به مدت ۶۰ دقیقه حرارت داده شدند. سپس ۳ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند تا خنک شوند.

تهیه نگهدارنده‌های ضد میکروبی سالم و ایمن‌تر تلاش‌های زیادی شده است [۳]. به دلیل عوارض جانبی ترکیبات شیمیایی و مقاومت میکروارگانیسم‌ها، امروزه توجه زیادی به عصاره‌ها و ترکیبات فعال زیستی جدا شده از گونه‌های گیاهی شده است [۴]. از جمله مواد طبیعی گیاهی، ادویه‌جات هستند که دارای اثرات فارماکولوژیکی مختلفی بویژه اثر ضد میکروبی می‌باشند. ترکیبات فعال موجود در ادویه‌جات، در کلاس نگهدارنده‌های غذایی طبیعی طبقه‌بندی می‌شوند [۵].

از میان ادویه‌جات پرکاربرد و پرمصرف می‌توان به فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه، اشاره کرد. فلفل‌ها در سراسر دنیا در تهیه غذا به علت طعم و رایحه مطلوب و تأخیر در فساد مواد غذایی استفاده می‌شوند [۶]. جنس فلفل قرمز یا کاپسیکوم به طور تقریبی دارای ۲۲ گونه وحشی و ۵ گونه اهلی است که در اکثر نقاط گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان کشت می‌شود [۷، ۸]. تمامی انواع فلفل قرمز بومی نیمکره غربی‌اند [۸]. آنالیزهای شیمیایی نشان می‌دهد که فلفل قرمز حاوی پروتئین، ویتامین، کومارین، فلاونوئید، اسانس، ساپونین‌های استروئیدی (Caspisidine)، رنگدانه‌های کارتنوئیدی و کاپسایسین (ماده فنی) می‌باشد [۷]. فلفل سیاه، نام فارسی آن و فلفل اسود، نام عربی گیاه مذکور است. انواع دارویی مهم آنها متعلق به جنس *piper* است. میوه این گیاه به صورت خشک به عنوان ادویه استفاده می‌شود [۹]. روغن فرار فلفل، فعالیت ضد میکروبی از خود نشان داده است [۱۰].

زردچوبه (*Curcuma longa*) نیز یک ادویه پرمصرف گیاهی بوده که قسمت مورد استفاده این گیاه ریزوم آن است [۹]. گزارش شده است که عصاره زردچوبه و روغن فرار آن از رشد انواع باکتری‌ها، انگل‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند [۱۱]. از آنجاکه اطلاعات اندکی درخصوص نقش ضد میکروبی ادویه‌جات در نگهداری مواد

۳.۲. کشت و تهیه سوسپانسیون باکتریایی

در این مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره‌های مایی جوشیده و نجوشیده ادویه‌ها در مقابل باکتری‌های زیر بررسی شد:

Staphylococcus aureus (ATCC 6538)

Escherichia coli (ATCC 8739)

Salmonella enterica paratyphi A (ATCC 5702)

Listeria monocytogenes (ATCC 19117)

ابتدا باکتری‌های فوق در محیط کشت کازوآگار کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس از هر یک از کشت‌های تازه تهیه شده سوسپانسیون میکروبی با استفاده از محلول سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. به این ترتیب که تعدادی از باکتری در لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی سوسپانسیون شد و جذب نوری (OD) آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر در مقابل بلانک سرم فیزیولوژی با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد به طوری که غلظتی معادل استاندارد لوله نیم مک فارلند برابر با 10^8 cfu/ml $\times 1/5$ ایجاد شود. سوسپانسیون‌های میکروبی پس از تهیه در یخچال قرار داده شدند.

۴.۲. بررسی اثر ضد میکروبی عصاره مایی ادویه‌ها

حداقل غلظت مهارکننده رشد عصاره‌های مایی در مقابل باکتری‌های مورد آزمون به روش رقیق سازی در محیط آگار (agar dilution) [۱۲] انجام شد. برای تهیه پلیت‌های حاوی عصاره از هر رقت از هر عصاره مایی نجوشیده یا جوشیده حجم یک میلی لیتر داخل پلیت استریل با قطر خارجی ۱۰ سانتی‌متر ریخته شد و به آن ۹ میلی لیتر محیط مولر هیتون آگار استریل مذاب با دمای حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد اضافه و کاملاً مخلوط شد. به این ترتیب غلظت عصاره‌های مورد آزمون پس از مخلوط شدن با محیط کشت در داخل پلیت‌ها، یک دهم غلظت تهیه شده اولیه می‌شود.

سپس پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند تا کاملاً بسته شوند. سپس سوسپانسیون‌های باکتریایی از یخچال خارج

شدند و در ابتدا یک میلی لیتر از هر سوسپانسیون به ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد تا غلظت حدود 10^7 cfu/ml به دست می‌آید. سپس از سوسپانسیون هر باکتری دو لکه مجزا با حجم ۵ میکرولیتر روی سطح پلیت‌های حاوی غلظت‌های مختلف سوسپانسیون‌های مایی قرار داده شد. روی سطح هر پلیت با همه سوسپانسیون‌های میکروبی لکه‌گذاری شد. سپس پلیت‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و نتیجه آنها از نظر رشد یا عدم رشد باکتری‌ها روی پلیت در مقایسه با پلیت شاهد فاقد عصاره بررسی شد. کمترین غلظتی از هر عصاره مایی که مانع از رشد باکتری‌ها بر سطح پلیت شد به عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) در نظر گرفته شد.

۵.۲. بررسی اثر ضد میکروبی عصاره مایی ادویه‌ها در شرایط اسیدی
برای این آزمون ابتدا عصاره‌های مایی نجوشیده هر سه ادویه مطابق روش گفته شده در بخش قبل تهیه شدند و غلظت‌های بالای MIC هر ادویه در مقابل هر میکروب انتخاب شد. سپس pH هر عصاره مایی نجوشیده با استفاده از محلول اسید کلریدریک یک نرمال استریل به حدود ۴-۴/۵ رسانده شد. برای عصاره‌های مایی که پس از تهیه حرارت داده می‌شوند ابتدا pH آنها حدود ۴-۴/۵ تنظیم شد و سپس طبق روش قبلی حرارت داده شدند. سپس اثر ضد میکروبی آنها به روش رقیق‌سازی در آگار طبق آن چه در بخش قبل گفته شد، بررسی شد. پلیت شاهد حاوی یک میلی لیتر محلول آبی با pH حدود ۴-۴/۵ (فاقد عصاره) نیز تهیه و مشابه روش اصلی با باکتری‌های مورد آزمون لکه‌گذاری شد و رشد باکتری‌ها روی آن بررسی شد.

۶.۲. بررسی اثر ضد میکروبی عصاره مایی ادویه‌ها در حضور نمک کلرید سدیم

برای بررسی اثر کلرید سدیم (با مقادیر مشابه آن چه در تهیه فرآورده‌های غذایی استفاده می‌شود)، ابتدا محلول آبی حاوی ۴ گرم در لیتر کلرید سدیم تهیه شد و با استفاده از اتوکلاو استریل

شد. سپس عصاره مایی ادویه‌ها با غلظت بالاتر از MIC، مطابق روش ذکر شده در بخش قبل و با استفاده از محلول آب نمک استریل به دو صورت نجوشیده و جوشیده تهیه شدند و اثر ضد میکروبی عصاره ادویه‌ها به روش رقیق‌سازی در آگار بررسی شد.

۷.۲. بررسی اثر ضد میکروبی مخلوط عصاره مایی ادویه‌ها

برای بررسی تداخل ناشی از مخلوط شدن ادویه‌ها و احتمال بروز سینرژیسم در مقابل باکتری‌های مورد آزمون، غلظت‌های تحت MIC هر عصاره مایی نجوشیده یا جوشیده، با توجه به مقدار مصرف در شرایط واقعی انتخاب شد. حجم‌های یک میلی‌لیتر از هر عصاره به صورت ترکیب دوتایی یا سه تایی عصاره‌های مایی داخل پلیت‌های استریل مخلوط شدند. سپس برای مخلوط‌های دوتایی، ۸ میلی‌لیتر و برای مخلوط سه تایی ۷ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتون آگار استریل و مذاب اضافه شد. با توجه به اینکه محیط‌های کشت تهیه شده طبق دستورالعمل سازنده، حداکثر می‌توانند ۱۰ درصد حجمی با یک محلول دیگر رقیق شوند و با توجه به افزایش حجم نمونه در مطالعه ترکیبی، از میزان آب لازم برای تهیه محیط کشت با توجه به مقدار سوسپانسیون مایی اضافه شده کم شد. پلیت‌ها به روش ذکر شده در بخش‌های قبل با میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه لکه گذاری شدند و پس از گرمخانه گذاری نتایج آنها قرائت شد.

۳. نتایج

۱.۳. نتایج مربوط به اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف عصاره مایی فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه در دو حالت نجوشیده و جوشیده

نتایج مربوط به بررسی اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه در حالت نجوشیده و جوشیده در مقابل باکتری‌های مورد آزمون به روش رقیق سازی در آگار، در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود کمترین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) مربوط به حالت نجوشیده و در مقابل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوزنز با مقدار ۰/۶ گرم در صد میلی‌لیتر می‌باشد. مقادیر MIC عصاره مایی فلفل قرمز در مقابل اشیریشیاکلی و سالمونلا انتریکا در حالت نجوشیده برای دو باکتری ۱/۲ گرم در صد میلی‌لیتر و در حالت جوشیده برای اشیریشیاکلی ۵ و برای سالمونلا ۲/۵ گرم در صد میلی‌لیتر می‌باشد. سوسپانسیون مایی فلفل قرمز در دو حالت نجوشیده و جوشیده اثر مهارکنندگی قابل توجهی بر باکتری‌های گرم منفی داشته است اما بیشترین اثر مهاری در مقابل باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون یعنی استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوزنز مشاهده شد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود کمترین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) مربوط به حالت نجوشیده و در مقابل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوزنز با مقدار ۲/۵ گرم در صد میلی‌لیتر می‌باشد.

مقادیر MIC عصاره مایی فلفل سیاه روی اشیریشیاکلی و سالمونلا انتریکا در حالت نجوشیده برای دو باکتری ۲۰ گرم در صد میلی‌لیتر و در حالت جوشیده برای اشیریشیاکلی و سالمونلا انتریکا بیش از ۸۰ گرم در صد میلی‌لیتر می‌باشد.

جدول ۱. حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) عصاره مایی فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه در شرایط نجوشیده و جوشیده در مقابل باکتری‌های مورد آزمون به روش رقیق‌سازی در آگار

باکتری	MIC (g/100 ml)					
	فلفل قرمز		فلفل سیاه		زردچوبه	
	نجوشیده	جوشیده	نجوشیده	جوشیده	نجوشیده	جوشیده
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۶	۲/۵	۲/۵	۵	۸۰	>۸۰
لیستریا مونوسیتوژنز	۰/۶	۲/۵	۲/۵	۵	۱۰	۲۰
سالمونلا انتریکا	۱/۲	۲/۵	۲۰	>۸۰	>۸۰	>۸۰
اشریشیاکلی	۱/۲	۵	۲۰	>۸۰	>۸۰	>۸۰

عصاره مایی فلفل سیاه اثر مهارکنندگی قوی‌تری بر روی باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون یعنی استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز داشته است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود کمترین غلظت مهارکننده رشد (MIC) مربوط به حالت نجوشیده و در مقابل باکتری لیستریا مونوسیتوژنز با مقدار ۱۰ گرم در صد میلی‌لیتر می‌باشد.

عصاره مایی زردچوبه در حالت جوشیده نیز اثر قابل توجهی بر لیستریا مونوسیتوژنز با غلظت ۱۰ گرم در صد میلی‌لیتر دارد. اثر مهارتی این عصاره در حالت جوشیده بر روی سایر باکتری‌ها در غلظت‌های بیش از ۸۰ گرم در صد میلی‌لیتر می‌باشد.

۲.۳. نتایج اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف عصاره مایی فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه در حالت‌های نجوشیده و جوشیده در شرایط اسیدی

برای انجام این آزمون غلظت‌هایی از ادویه‌ها که در آزمایش قبل اثر ضد میکروبی نشان دادند و در عین حال از نظر مقدار نیز تا حدودی به شرایط مصرف شبیه باشد برای این مرحله انتخاب شدند. همچنین اسیدی نیز با توجه به شرایط تهیه فرآورده‌های غذایی انتخاب شده است.

نتایج مربوط به اثر ضد میکروبی عصاره مایی فلفل قرمز در شرایط اسیدی ($\text{pH} = 4-4.5$)، در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در غلظت ۵ گرم در صد میلی‌لیتر و ۱۰ گرم در صد میلی‌لیتر عصاره مایی فلفل

قرمز نجوشیده فقط رشد لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس مهار شده است. اما در غلظت ۱۰ میلی گرم در صد میلی‌لیتر در حالت جوشیده رشد سالمونلا انتریکا را نیز علاوه بر این دو باکتری، مهار نموده است.

در غلظت ۱۰ گرم در صد میلی‌لیتر عصاره مایی فلفل سیاه نجوشیده رشد لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس مهار شده است اما در همین غلظت در حالت جوشیده فقط رشد لیستریا مونوسیتوژنز را مهار نموده است. نتایج مربوط به اثر ضد میکروبی سوسپانسیون مایی زردچوبه در شرایط اسیدی نیز نشان می‌دهد که غلظت ۲۰ گرم در صد میلی‌لیتر عصاره مایی زردچوبه نجوشیده و جوشیده فاقد هر گونه اثر مهارتی بر رشد میکروارگانیسم‌ها بوده است.

۳.۳. نتایج اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف عصاره مایی فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه در حالت‌های نجوشیده و جوشیده در شرایط نمکی

برای انجام این آزمون غلظت‌هایی از ادویه‌ها که در آزمایش قبل اثر ضد میکروبی نشان دادند و در عین حال از نظر مقدار نیز تا حدودی به شرایط مصرف شبیه باشد برای این مرحله انتخاب شدند. همچنین شرایط نمکی (۴ گرم در لیتر) نیز با توجه به شرایط تهیه فرآورده‌های غذایی انتخاب شده است. نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۲. نتایج مربوط به اثر ضد میکروبی عصاره مایی فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه در شرایط اسیدی (pH=۴ - ۴/۵)

غلظت	باکتری	استافیلوکوکوس اورئوس	لیستریا مونوسیتوژنز	سالمونلا پاراتیفی موریوم	اشریشیا کلی
۵ گرم در صد میلی	نجوشیده	-	-	+	+
لیتر فلفل قرمز	جوشیده	-	-	+	+
۱۰ گرم در صد میلی	نجوشیده	-	-	-	+
لیتر فلفل قرمز	جوشیده	-	-	+	+
۱۰ گرم در صد میلی	نجوشیده	-	-	+	+
لیتر فلفل سیاه	جوشیده	+	-	+	+
۲۰ گرم در صد میلی	نجوشیده	+	+	+	+
لیتر زردچوبه	جوشیده	+	+	+	+

+ : رشد، - : عدم رشد

جدول ۳. نتایج مربوط به اثر ضد میکروبی عصاره مایی فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه در شرایط نمکی (۴ گرم در لیتر)

غلظت	باکتری	استافیلوکوکوس اورئوس	لیستریا مونوسیتوژنز	سالمونلا پاراتیفی موریوم	اشریشیا کلی
۵ گرم در صد میلی لیتر	نجوشیده	+	-	+	+
فلفل قرمز	جوشیده	+	-	+	+
۱۰ گرم در صد میلی لیتر	نجوشیده	-	-	+	+
فلفل قرمز	جوشیده	+	-	+	+
۱۰ گرم در صد میلی لیتر	نجوشیده	-	-	+	+
فلفل سیاه	جوشیده	+	+	+	+
۲۰ گرم در صد میلی لیتر	نجوشیده	+	+	+	+
زردچوبه	جوشیده	+	+	+	+

همان طور که مشاهده می شود در غلظت ۵ گرم در صد میلی لیتر عصاره مایی فلفل قرمز نجوشیده و جوشیده فقط رشد لیستریا مونوسیتوژنز مهار شده است اما در غلظت ۱۰ گرم در صد میلی لیتر در حالت نجوشیده رشد استافیلوکوکوس اورئوس نیز مهار شده است. در مورد فلفل سیاه، همان طور که مشاهده می شود در غلظت ۱۰ گرم در صد میلی لیتر در حالت نجوشیده رشد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز مهار شده است. اما در غلظت ۱۰ گرم در صد میلی لیتر در حالت جوشیده فقط رشد لیستریا مونوسیتوژنز مهار شده است.

در غلظت ۲۰ گرم در صد میلی‌لیتر عصاره مایه زردچوبه نجوشیده و جوشیده، رشد هیچ یک از باکتری‌ها مهار نشده است.

انتریک اثر هم افزایی مشاهده نشد. اما در مورد باکتری لیستریا مونوسیتوزنز مهار رشد در غلظت های ترکیبی عصاره های مایه فلفل قرمز و فلفل سیاه به ترتیب با غلظت ۰/۳۷۵ و ۰/۰۷۵ گرم در صد میلی لیتر و همچنین در غلظت های ترکیبی عصاره های مایه فلفل قرمز و فلفل سیاه و زردچوبه به ترتیب ۰/۳۷۵، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵ گرم در صد میلی لیتر مشاهده شد.

۴.۳. نتایج اثر ضد میکروبی مخلوط عصاره مایه ادویه‌ها (فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه) در حالت‌های نجوشیده و جوشیده

نتایج اثر ترکیبی عصاره مایه ادویه‌های مورد مطالعه در حالت نجوشیده در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. با توجه به اینکه در این آزمون برای مطالعه اثر ترکیبی ادویه‌ها از غلظت‌های کمتر از MIC هر ادویه استفاده شده است، در صورتی اثر هم‌افزایی خواهیم داشت که رشد میکروارگانیسم مهار شده باشد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در مورد باکتری‌های استفیلوکوکوس، اورئوس، اشریشیاکلی و سالمونلا

درخصوص اثر ترکیبی عصاره‌های مایه‌ی ادویه‌های مورد مطالعه در حالت جوشیده (جدول ۴) نیز در مورد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اش‌ریشیاکلی و سالمونلا انتریکا اثر هم‌افزایی مشاهده نشد. اما در مورد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز مهار رشد در غلظت‌های ترکیبی سه ادویه فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه به ترتیب در ۰/۳۷۵، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵ گرم در صد میلی‌لیتر مشاهده شد.

جدول ۴. نتایج مربوط به اثر ضد میکروبی عصاره‌های مایبی ادویه‌های مورد آزمون به صورت مخلوط در حالت نجوشیده و جوشیده

غلظت (g/100 ml)					باکتری
فلفل سیاه ۰/۰۷۵ فلفل قرمز ۰/۰۳۷۵ فلفل قرمز ۰/۰۳۷۵	فلفل سیاه ۰/۰۷۵ فلفل قرمز ۰/۰۳۷۵ فلفل قرمز ۰/۰۳۷۵	زردچوبه ۰/۱۵ زردچوبه ۰/۱۵ زردچوبه ۰/۱۵	فلفل سیاه ۰/۰۷۵ فلفل قرمز ۰/۰۳۷۵ فلفل قرمز ۰/۰۳۷۵	فلفل سیاه ۰/۰۷۵ فلفل قرمز ۰/۰۳۷۵ فلفل قرمز ۰/۰۳۷۵	
+	+	+	+	نچوشیده	استافیلوکوکوس اورئوس
+	+	+	+	جوشیده	
-	-	+	+	نچوشیده	لیستریا مونوسیتوژنز
-	+	+	+	جوشیده	
+	+	+	+	نچوشیده	سالمونلا انتریکا
+	+	+	+	جوشیده	
+	+	+	+	نچوشیده	اشریشیاکلی
+	+	+	+	جوشیده	

$+$: رشد، $-$: عدم رشد

٤. بحث

در مطالعه حاضر اثرات ضد میکروبی عصاره مایه چند ادویه پرمصرف در تهیه فرآورده‌های غذایی در مقابل دو باکتری بیماری‌زای غذایی گرم مثبت (استافیلوکوکوس

اورئوس و لیستریا مونو سیتوزنز) و گرم منفی (اشریشیاکلی و سالمونلا انتریکا) ارزیابی شده است. ادویه‌های مورد مطالعه شامل فلفل قرمز، فلفل سیاه و زردچوبه می‌باشند که در حالت

نجوشیده و جوشیده، به منظور بررسی اثر آنها در طی فرآیند تهیه فرآورده‌های غذایی، بررسی شده‌اند.

نتایج این مطالعه نشان داد که اثر ضد میکروبی عصاره‌های مایی همه ادویه‌ها در حالت نجوشیده بیشتر از حالت جوشیده است. همچنین رشد باکتری‌های گرم مثبت به طور کلی در غلظت‌های کمتر از ادویه‌ها مهار شده است. در میان ادویه‌ها عصاره مایی فلفل قرمز در هر دو حالت نجوشیده و جوشیده، اثر ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به سایر ادویه‌ها نشان داد. در رتبه دوم از نظر اثر ضد میکروبی عصاره مایی فلفل سیاه می‌باشد و کمترین اثر ضد میکروبی مربوط به زردچوبه بوده است. کمترین MIC به دست آمده در این مطالعه مربوط به اثر عصاره مایی فلفل قرمز در حالت نجوشیده روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیترنز با غلظت ۰/۶ گرم در صد میلی‌لیتر می‌باشد. باکتری‌های گرم منفی با غلظت دو برابر آن (۱/۲ گرم در صد میلی‌لیتر) مهار شدند.

زرین‌قلم و همکاران در سال ۲۰۱۳ عصاره‌ها و اسانس‌های فلفل سیاه و فلفل قرمز را از نظر فعالیت ضد باکتریایی علیه اشیریشیا کلی O157: H7 و استافیلوکوکوس اورئوس مورد آزمون قرار دادند. نتایج نشان داد که همه عصاره‌ها و اسانس‌ها اثرات ضدباکتریایی داشتند و اسانس‌ها فعال‌تر بودند [۱۳]. به طور مشابه در مطالعه کوهساری و همکاران در سال ۱۳۸۷، اثر ضدباکتریایی فلفل سیاه علیه ۹ گونه باکتری بیماری‌زای مواد غذایی انجام شد. در این مطالعه عصاره‌های اتانولی نسبت به عصاره‌های آبی اثر بیشتری از خود نشان دادند [۱۴]. همچنین Jain & Pundir در سال ۲۰۱۰ فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های فلفل سیاه و زردچوبه را مقایسه کردند. نتایج نشان داد که همه عصاره‌ها دارای اثرات ضد میکروبی در برابر تمام سویه‌های باکتریایی مورد آزمون بودند [۱۵]. در همین راستا، مطالعه Sooad Al-Daihan و همکاران در سال ۲۰۱۳ فعالیت ضدباکتری

عصاره‌های آبی و متانولی زردچوبه را مورد بررسی و تأیید قرار دادند. میکروارگانیسم‌های به کار گرفته شده استرپتوکوکوس پایورنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا بودند [۱۶]. همچنین در مطالعه Noor Farzeen در سال ۲۰۱۲ اثرات ضد میکروبی عصاره زردچوبه را در برابر باکتری‌های انتخاب شده عامل مسمومیت غذایی بررسی کردند. نتایج نشان داد که هر دو عصاره متانولی و کلروفرمی دارای اثر بالقوه ضدباکتریایی علیه هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت بودند [۱۷]. وجه تشابه مطالعات ذکر شده با مطالعه حاضر این است که در آنها اثرات ضد میکروبی ادویه‌ها بررسی شده است ولی به جزئیاتی مثل تأثیر دما و اسید و نمک و اثر مخلوط آنها پرداخته نشده است، نکته‌ای که در مطالعه حاضر مورد توجه و تأکید دقیق قرار گرفته است.

نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان داد که ضدباکتریایی فلفل قرمز در pH اسیدی حدود ۴-۴/۵ در مقابل باکتری‌های گرم مثبت حفظ شده است، اما در مقابل باکتری‌های گرم منفی اثر ضد میکروبی به شدت کاهش یافته است. در مورد عصاره مایی فلفل سیاه شرایط اسیدی باز هم منجر به کاهش اثر ضدباکتریایی در مقابل باکتری‌های گرم منفی و تا حدی گرم مثبت‌ها شده است. درخصوص اثر ضد میکروبی عصاره مایی زردچوبه در شرایط اسیدی نیز مشابه سایر ادویه‌ها اثر ضد میکروبی آن کاهش یافته است. با توجه به کاهش اثر ضد میکروبی عصاره مایی ادویه‌ها خصوصاً بر روی باکتری‌های گرم منفی در شرایط نسبتاً اسیدی به نظر می‌رسد که افزودن اسید به محیط مایی باعث پروتونه شدن و ایجاد بار مثبت بر روی ترکیبات مؤثر ادویه‌ها شده است. از آنجایی که غشاء باکتری‌ها بخصوص باکتری‌های گرم منفی حاوی فسفولیپید بوده عبور مولکول‌های باردار از این غشاء هیدروفوب مشکل شده و در نتیجه اثر ضد میکروبی ترکیبات کم می‌شود.

میکروبی قابل توجهی در مقابل میکروارگانیزم‌های بیماری‌زای غذایی دارند، اگرچه حرارت، حضور اسید و نمک باعث کاهش اثرات ضد میکروبی آنها می‌شود. با توجه به احتمال وجود اثرات هم‌افزایی در هنگام استفاده از مخلوط آنها، کاربرد این ادویه‌ها در افزایش کیفیت میکروبی فرآورده‌های غذایی در حین دوره نگهداری قابل توجه می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

حوریه سادات میرمالک‌ثانی در انجام آزمایش‌ها، گردآوری نتایج و تهیه پیش‌نویس مقاله و نسرين صمدی در طراحی مطالعه، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج و اصلاح و تایید نسخه نهایی مقاله مشارکت داشته‌اند.

تضاد منافع

هیچ گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از همکاری صمیمانه کارکنان آزمایشگاه کنترل دارو و غذای دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر و قدردانی می‌نمایند.

در خصوص بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های مایه ادویه‌های مورد آزمون در حضور نمک کلرید سدیم نیز شاهد کاهش اثرات ضد میکروبی بودیم. در حضور نمک، اثر عصاره مایه فلفل قرمز بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا انتریکا و اشریشیاکلی از بین رفت و فقط رشد لیستریا مهار شد. عصاره مایه فلفل سیاه نیز بویژه در حالت جوشیده در مقابل همه باکتری‌های مورد آزمون بی‌اثر شد. عصاره مایه زردچوبه نیز در شرایط نمکی در هر دو حالت جوشیده و نجوشیده فاقد اثر ضد میکروبی در مقابل باکتری‌های مورد آزمون بود.

در حالت ترکیب ادویه‌ها با غلظت‌های تقریباً مشابه با آن چه در تهیه مواد غذایی استفاده می‌شوند مشاهده شد که ترکیب فلفل قرمز و فلفل سیاه در غلظت‌های کمتر از MIC باعث مهار رشد لیستریا مونوسیتوزنز شدند که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی (سینرژیسیم) در این محدوده می‌باشد. بنابراین نتیجه گرفته می‌شود که اثر ترکیبی ادویه‌ها به نسبت غلظت آنها و نوع میکروارگانیزم مورد آزمون بستگی دارد. از اینرو پیشنهاد می‌شود که علاوه بر بررسی اثرات زیستی ادویه‌ها به تنهایی، اثرات ترکیبی آنها در شرایط مختلف نیز بررسی شود.

۵. نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره مایه ادویه‌ها به خصوص فلفل قرمز و در درجه بعدی فلفل سیاه اثرات ضد

منابع

1. Hayek S, Gyawali R and Ibrahim S. Antimicrobial Natural Products. *Formatex*. 2013; 910-21.
2. Chen W, Tang H, Jiang N., Zhong Q, Hu Y, Chen H and Chen W. Antibacterial effect of black pepper petroleum ether extract against listeria monocytogenes and salmonella typhimorium. *Journal of Food Quality* 2019; 1-10.
3. Mostafa AA, Al-Askar AA, Almaary KhS, Dawood TM, Sholkamy EN and Bakri MM. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi J. Biological Sciences* 2018; 25; 361 - 6.
4. Gupta A, Mahajan S and Sharma R. Evaluation of Antimicrobial activity of Curcuma longa rhizome extract against

Staphylococcus aureus. *Biotechnology Reports* 2015; 6: 51-5.

5. Souza ELd, Stamford TLM, Lima EdO, Trajano VN and Barbosa Filho JM. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2005; 48: 549-58.

6. Omolo MA, Wong Z-Z, Mergen K, Hastings JC, Le NC, Reil HA and et al. Antimicrobial properties of chili peppers. *J. Infect. Dis. Ther.* 2014; 2: 1-8.

7. Bahmaei Nejad M, Vaezi GH and Abbaspour H. Inhalation effect of pepper spray (*Oleorsin Capsicum*) on pseudo-anxiety-like behavior of adult male rat. *AB J.* 2012; 5: 11-20.

8. Ravindran P, Nirmal Babu K and Sivaraman K. *Turmeric: The Genus Curcuma*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2007.

9. Zargari A. *Medicinal plants*. IRI: Tehran university press; 2011.

10. Karsha PV and Lakshmi OB. Antibacterial activity of black pepper (*Piper nigrum* Linn) with special reference to its mode of action on bacteria. *IJNPR*. 2010; 1: 213-5.

11. Akram M, Shahab-Uddin AA, Usmanghani K, Hannan A, Mohiuddin E and Asif M. *Curcuma longa* and curcumin: a review article. *Rom. J. Biol. Plant Biol.* 2010; 55: 65-70.

12. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microb. Infect. Eucast Definitive Document E. Def 3.1*, 2000; 6: 509 – 15.

13. Zarringhalam M, Zarringhalam J, Shadnoush M, Safaeyan F and Tekieh E. Inhibitory Effect of Black and Red Pepper and Thyme Extracts and Essential Oils on

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and DNase Activity of *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical Plant Quarterly J.* 2007; 4: 17 - 21.

14. Kouhsari H, Ghaemi E, Sadegh shesh poli M, Fadavi A, Dadgar t, Kiyaee E and et al. Study of antibacterial effect of black pepper and cinnamon against nine bacterial food pathogens, Eighteenth National Congress of Food Science and Technology. holly Mashhad: Research Institute of Food Science and Technology. 2008 October 24 - 5.

15. Pundir RK and Jain P. Comparative studies on the antimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum*) and turmeric (*Curcuma longa*) extracts. *IJABPT*. 2010; 1: 491 - 501.

16. Al-Daihan S, Al-Faham M, Al-shawi N, Almayman R, Brnawi A and Shafi Bhat R. Antibacterial activity and phytochemical screening of some medicinal plants commonly used in Saudi Arabia against selected pathogenic microorganisms. *J. King Saud University-Science* 2013; 25: 115-20.

17. Noor Fazreen D. Determination of antibacterial activity of *Curcuma longa* against selected food poisoning causing bacteria. Conference: Malaysian Science Technology Congress 2012 (MSTC 2012), At Sime Darby Convention Centre, Bukit Kiara. 2012.

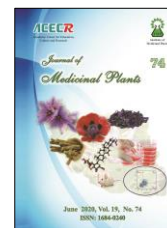
How to cite this article: Mirmalek-Sani HS, Samadi N. Antimicrobial activity of *Curcuma longa* L., *Capsicum annum* L. and *Piper nigrum* at different conditions. *Journal of Medicinal Plants* 2020; 19(74): 145-154. doi: 10.29252/jmp.19.74.145



Institute of
Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

Antimicrobial activity of *Curcuma longa* L., *Capsicum annuum* L. and *Piper nigrum* at different conditions

Hoorieh Sadat Mairmalek-Sani¹, Nasrin Samadi^{2,*}

¹ Faculty of Advanced Sciences and Technology, Islamic Azad University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy and The Institutes of Pharmaceutical Sciences (TIPS), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Keywords:

Capsicum annuum
Piper nigrum
Antibacterial activity
Spice

ABSTRACT

Background: In addition to creating the desired flavor, spices play an important role in increasing the shelf life of food by inhibiting the growth of a variety of microorganisms. **Objective:** The purpose of this study was to investigate the antibacterial effect of boiled and non-boiled water extract of *Curcuma longa* L., *Capsicum annuum* L. and *Piper nigrum* alone or in combination. **Methods:** The antibacterial effect of the spices was investigated against four major food-borne pathogens by agar dilution method in different acidic or salty conditions. **Results:** The results of this study showed that non-boiled water extract of *C. annuum* had the highest antibacterial activity. Gram-positive bacteria were generally more susceptible to the tested spices. The antibacterial activity of the spices was reduced by addition of sodium chloride and in acidic pH. A synergistic effect was observed between *C. annuum* and *P. nigrum* water extracts against *Listeria monocytogenes*. **Conclusion:** It seems that by using mixture of spices, suitable antimicrobial preservative systems could be designed for different food products.

Abbreviations: MIC, Minimum Inhibitory Concentration; OD, Optical density; CFU, Colony forming unit.

* Corresponding author: samadin@tums.ac.ir

doi: [10.29252/jmp.19.74.145](https://doi.org/10.29252/jmp.19.74.145)

Received 21 December 2018; Received in revised form 10 March 2019; Accepted: 18 March 2019

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)