Archive of SID

اثر ضدباکتریایی اسانس زردچوبه با و بدون آنتی‌بیوتیک‌های درمانی بر تعدادی سویه‌ی استاندارد بیماری‌زا: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی

بهاره مجدی[۱]، محمدامین مهرنیا[۲]*، حسن برزگر[۳]، بهروز علیزاده بهبهانی[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۲- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

***نشانی برای مکاتبه: : Mehrnia@asnrukh.ac.ir**

دریافت مقاله: : اسفند نود و هشت پذیرش برای چاپ: اردیبهشت نود و نه

چکیده

سابقه و هدف: *در حال حاضر استفاده از ترکیب‌های ضدمیکروبی با منشأ طبیعی از گیاهان رو به فزونی است. زردچوبه گیاهی دارویی با نام علمی Curcuma longa و متعلق به خانواده زنجبیلیان می‌باشد. هدف از این پژوهش تعیین فعالیت ضدمیکروبی اسانس زردچوبه به تنهایی و توام با آنتی‌بیوتیک‌های درمانی با روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر تعدادی از سویه‌های استاندارد بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی بود.*

روش کار: *در این پژوهش تجربی، پودر زردچوبه با روش تقطیر با آب در دستگاه کلونجر به مدت ۳ h اسانس‌گیری شد. میزان راندمان استخراج اسانس زردچوبه براساس w/w محاسبه گردید. قطر هاله عدم رشد اسانس زردچوبه بر باکتری‌های بیماری‌زا با روش‌های انتشار دیسک در آگار و چاهک آگار تعیین شد. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب با روش میکرودایلوشن براث و پورپلیت تعیین گردید. برهمکنش اسانس زردچوبه در حالت ترکیبی با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل با استفاده از غلظت تحت مهاری (sub-MIC) انجام شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن تجزیه و تحلیل شدند.*

یافته‌ها: *میزان راندمان استخراج اسانس زردچوبه ۱ ٪ بود. نتایج نشان داد که بیشترین اثر ضدمیکروبی اسانس زردچوبه مربوط به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله عدم رشد ۱۳/۱۰mm بود. در حالت ترکیبی اسانس زردچوبه با آنتی‌بیوتیک-های کلرامفنیکل و جنتامایسین برای باکتری‌های سودوموناس ائروژینوزا، سالمونلا تیفی‌موریوم، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا حالت سینرژیستی مشاهده گردید اما برای باکتری اشرشیا کلی حالت آنتاگونیسمی مشاهده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس زردچوبه برای باکتری‌های سودوموناس ائروژینوزا، سالمونلا تیفی‌موریوم، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا به ترتیب ۵۰ mg/ml، ۵۰، ۲۰۰، ۲۵ و ۲۰۰ بود.*

نتیجه‌گیری: *نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اسانس زردچوبه به تنهایی و توام با آنتی‌بیوتیک‌های درمانی دارای اثر مهارکنندگی بر سویه‌های بیماری‌زا بود. در حالت ترکیبی فعالیت ضدباکتریایی اسانس زردچوبه به صورت چشمگیری افزایش یافت.*

واژگان کلیدی: زردچوبه، کلرامفنیکل، جنتامایسین، اثر سینرژیستی.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زردچوبه گیاهی دارویی با نام علمی *Curcuma longa* و متعلق به خانواده زنجبیلیان(Zingiberaceae)می‌باشد. از نظر گیاه‌شناسی زردچوبه گیاهی علفی و پایا با ارتفاع تقریبا ۱ تا ۱/۵ متر است. برگ‌های گیاه زردچوبه بلند و نوک تیز است. رنگ گل‌های آن به سبز یا زرد بوده و به صورت ساقه‌ای گل-دار از میان برگ‌ها خارج می‌شود. زردچوبه گیاه بومی نواحی گرم آسیا، نظیر کشورهای هندوستان، پاکستان، اندونزی، جنوب چین و بومی آفریقا و آمریکای جنوبی است(۱). در زبان هندی به پودر ریزوم متورم خشک شده زردچوبه Haldi گفته می‌شود. گیاه زردچوبه از دو منظر دارویی و غذایی دارای اهمیت فراوانی است. زردچوبه دارای فعالیت ضدقارچی، ضد-انگلی، ضدویروسی، ضدالتهابی، ضدباکتریایی و ضدسرطان است(۱-۳).

در حال حاضر به دلیل مضررات نگهدارنده‌های شیمیایی و افزودنی‌های خوراکی سنتزی برای سلامتی بدن انسان، استفاده از ترکیب‌های ضدمیکروبی با منشأ طبیعی از گیاهان رو به فزونی است. از فواید این ترکیب‌ها می‌توان به تأخیر انداختن فساد مواد غذایی، جلوگیری از رشد میکروارارگانیسم-های عامل عفونت و مسمومیت و کاهش مقاومت میکروبی اشاره نمود(۴ و ۵).

مهم ترین عامل در ایجاد عفونت و مسمومیت، باکتری می-باشد. *اشریشیاکلی* از شایع‌ترین عامل‌های میکروبی و یکی از باکتری‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب بیمارستانی می‌باشد. افزایش سرعت مقاومت این باکتری به دلیل کسب پلاسمیدهای کدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، در کشورهای در حال توسعه و توسعه‌یافته نگرانی‌های زیادی ایجاد کرده است. *سودوموناس ائروژینوزا* نیز یک پاتوژن فرصت‌طلب بیمارستانی می‌باشد که به آنتی بیوتیک‌های مختلفی مقاوم می‌باشد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری سبب ایجاد عفونت و در نهایت منجر به مرگ می‌شود. این باکتری گرم منفی، اکسیداز مثبت، متحرک و دارای یک تا سه فلاژل قطبی می‌باشد. عفونت‌هایی مانند سپتی‌سمی ، اندوکاردیت و اوتیت توسط این باکتری ایجاد می‌شود. جنس *استافیلوکوکوس*اورئوس یک باکتری گرم مثبت است که در نواحی پوست رشد می‌کند. اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی و سندرم شوک سمی از بیماری هایی می‌باشد که توسط این باکتری ایجاد می‌شود. *سالمونلا تیفی موریوم* توسط آب و غذای آلوده وارد دستگاه گوارش می‌شود و به واکوئل درون سلول‌ها راه پیدا می‌کند سپس در این محل تکثیر می‌شود و از آنجا وارد سیستم گردش خون می‌شود و سیستم لنفاوی را نیز آلوده می‌کند. حصبه از جمله بیماریی‌هایی می‌باشد که از طریق *سالمونلا* ایجاد می‌شود. باکتری جنس *لیستریا* گرم مثبت، و بی‌هوازی اختیاری است. از جمله بیماری‌هایی که توسط این باکتری ایجاد می‌شود شامل مننژیت اولیه، انسفالیت یا سپتی‌سمی می‌باشد(۶-۹).

هدف از این پژوهش، تعیین فعالیت ضدمیکروبی و برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی با روش‌های کیفی و کمی شامل دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر تعدادی از باکتری-های بیماری‌زا بود.

روش کار

این پژوهش آزمایشگاهی از مهرماه ۱۳۹۸ تا دی‌ماه ۱۳۹۸ در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام پذیرفت.

ریشه خشک شده زردچوبه از شهرستان اهواز (استان خوزستان) از عطاری محلی خریداری شد. ریشه خشک شده زردچوبه توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر گردید. جهت انجام عل اسانس‌گیری ۲/۳ حجم بالن دستگاه کلونجر از آب پر شد و ۱۰۰g از پودر زردچوبه به آن اضافه گردید. عمل استخراج اسانس زردچوبه با روش تقطیر آبی به مدت ۳ ساعت انجام شد. در نهایت اسانس استحصالی بعد از زدودن آب در ظروف تیره رنگ در دمای یخچال تا زمان انجام آزمون‌ها نگهداری شد(۱۰).

ابتدا برای فعال کردن باکتری‌های بیماری‌زای مورد بررسی ابتدا ویال‌های حاوی میکروارگانیسم‌های لیوفیلیزه نگهداری شده در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، در زیر هود و در شرایط استریل با اضافه کردن ۵ mL آب مقطر به باکتری احیا شد. اسامی و کد شناسه هر یک از باکتری‌های بیماری-زای استاندارد در جدول ۱، آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

هر باکتری به طور جداگانه در پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و پلیت‌های کشت شده در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ h گرمخانه‌گذاری شد. از کلنی‌های ایجاد شده بر سطح محیط کشت دوباره کشت خطی صورت گرفت. برای ایجاد سوسپانسیون میکروبی استاندارد از کلنی تک و خالص ایجاده شده به وسیله لوپ استریل مقداری برداشته و در محلول سرم فیزیولوژی استریل حل گردید. در نهایت با استفاده از محلول استاندارد نیم مک فارلند و دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب سوسپانسیون میکروبی معادل با محلول نیم مک‌فارلند تنظیم شد (۱۱).

جدول ۱- سویه‌های میکروبی استاندارد عامل عفونت و مسمومیت

ردیف	جنس	گونه	سویه (ATCC)	آزمون گرم
۱	*استافیلوکوکوس*	*اورئوس*	۲۵۹۲۳	+
۲	*لیستریا*	*اینوکوا*	۳۳۰۹۰	+
۳	*اشرشیا*	*کلی*	۲۵۹۲۲	-
٤	*سالمونلا*	*تیفی موریوم*	۱۴۰۲۸	-
٥	*سودوموناس*	*ائروژینوزا*	۲۷۸۵۳	-

برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی اسانس زردچوبه به روش کربی-بوئر ۱۰۰ µl سوسپانسیون میکروبی استاندارد از هر یک از سویه‌های بیماری‌زا در ۳ نقطه از پتری دیش حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار به دقت ریخته و توسط میله ال شکل استریل در کل پتری دیش پخش گردید. در ادامه دیسک‌های بلانک (پادتن طب) توسط پنس استریل در فواصل معین از یکدیگر و از لبه پتری دیش (تقریبا ۲۵ mm) در حضور شعله بر سطح محیط کشت جای گذاری شد. ۲۰ µl از اسانس زردچوبه استریل شده با دقت و به آرامی توسط سمپلر به دیسک‌های بلانک اضافه شد. پلیت‌های کشت شده در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ h گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت پس از عمل گرمخانه‌گذاری توسط خط‌کش قطر هاله‌های عدم رشد هر یک از سویه‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی اطراف دیسک‌ها به صورت mm گزارش شد (۱۲ و ۱۳).

برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی اسانس زردچوبه به انتشار چاهک در آگار۲۰ µl از اسانس زردچوبه استریل شده به درون هر حفره یا چاهک (قطر ۶ mm) ایجاد شده بر سطح پتری دیش حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته شد. ۱۰۰ µl سوسپانسیون میکروبی استاندارد نیز به صورت چمنی کشت گردید. در این روش از انتهای پیپت پاستور استریل برای ایجاد چاهک با قطر ۶ میلی‌متر در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. ته چاهک‌ها با استفاده از محیط کشت مذاب آگار مسدود شد. چاهک‌ها با ۲۰ میکرولیتر از اسانس زردچوبه پر شد. پلیت‌های کشت شده در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ h گرمخانه‌گذاری شد. قطر هاله-های عدم رشد میکروبی اطراف هر یک از چاهک‌ها توسط خط‌کش بر حسب mm اندازه‌گیری و ثبت شد(۱۴ و ۱۵).

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) اسانس زردچوبه از روش طباطبایی یزدی و همکاران (۱۳۹۸)، با کمی تغییر جهت انجام این آزمون استفاده شد. مطابق با معادله ۱، (معادله ۱: ۱۰۰µl محیط کشت + ۲۰µl غلظت‌های مختلف اسانس زردچوبه + ۲۰ µl سوسپانسیون میکروبی =محتویات هر چاهک) به درون هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای مخلوطی از سوسپانسیون میکروبی استاندارد، محیط کشت مولر هینتون براث و اسانس زردچوبه استریل شده با غلظت‌های متفاوت (۳/۱۲۵mg/mL - ۴۰۰) اضافه گردید. میکروپلیت‌های کشت

www.SID.ir

Archive of SID

شده در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ h گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت ۲۴ h به هر یک از چاهک‌ها ۲۰ µl از معرف رنگی تری فنیل تترازولیوم کلراید به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰ min مجددا گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت زمان مذکور مشاهده رنگ قرمز یا ارغوانی درون هر یک از چاهک‌هایی ۹۶ خانه‌ای بیانگر رشد میکروبی است. اولین چاهکی که در آن تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی دیده نشد، غلظت آن چاهک به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد گزارش شد(۱۶).

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس زردچوبهمطابق با مطالعه یگانگی و همکاران (۲۰۱۸)، از چاهک‌های که در آزمون تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی مشاهده نشد به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات هر یک از خانه‌ها برداشته و روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت پورپلیت انجام شد. پلیت‌های کشت شده در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ h گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت ۲۴ h پلیت‌های کشت شده مورد بررسی چشمی قرار گرفت. اولین پلیتی که در آن هیچ کلنی باکتریایی مشاهده نشد غلظت آن به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (۱۷).

تعیین برهمکنش اسانس زردچوبه در ترکیب با آنتی‌بیوتیک-های جنتامایسین و کلرامفنیکل با آزمون منطبق با مطالعه برزگر و همکاران (۱۳۹۸)، انجام گردید. به طور خلاصه از غلظت تحت مهاری (sub-MIC) برای انجام این آزمون استفاده شد. سوسپانسیون میکروبی استاندارد برای هر یک از سویه‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه شد و در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی غلظت‌های تحت مهاری اسانس زردچوبه به صورت چمنی کشت داده شد. دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و کلرامفنیکل با پنس استریل به آرامی برسطح محیط کشت قرار داده شد (نمونه شاهد حاوی محیط کشت میکروبی بدون اسانس بود). پلیت‌های کشت شده در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ h گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت ۲۴ h قطر هاله عدم رشد میکروبی بر حسب mm توسط خط کش اندازه‌گیری و گزارش شد (۱۸). داده‌های به دست از آزمون‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شد. جهت مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۸) استفاده شد. حداقل تکرار برای هر یک از آزمون‌ها ۳ مرتبه بود.

یافته‌ها

بیشترین اثر ضدمیکروبی اسانس زردچوبه مربوط به باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد ۱۳/۱۰ mm بود. بیشترین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک-های کلرامفنیکل و جنتامایسن با قطر ۳۰/۴۰ mm و ۲۹/۸۰ مربوط به باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. در حالت ترکیبی اسانس زردچوبه و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل برای باکتری‌های *سودوموناس ائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* حالت سینرژیستی مشاهده گردید اما برای باکتری *اشرشیا کلی* حالت آنتاگونیسمی مشاهده شد. در حالت ترکیبی اسانس زردچوبه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین برای تمامی باکتری‌ها به جز باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* حالت سینرژیستی مشاهده شد. در حالت ترکیب اسانس زردچوبه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین برای باکتری *اشرشیا کلی* قطر هاله عدم رشد از ۱۱/۲۰ میلی‌متر (به تنهایی) به ۱۱ میلی‌متر (ترکیب اسانس و جنتامایسن) کاهش یافت. مقایسه دوتایی میان اثر ضدمیکروبی اسانس زردچوبه با آنتی بیووتیک کلرامفنیکل در سطح معنی‌داری ۵ درصد برای تمامی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارای اختلاف معنی‌داری بود. نتایج آماری نشان داد که مقایسه اثر ضدباکتریایی اسانس زردچوبه با آنتی-بیوتیک جنتامایسین برای کل باکتری‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی نیز در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری داشت. مقایسه دوتایی میان اثر ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل برای باکتری‌های *سودوموناس ائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری نداشت، در حالی که برای باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *لیستریا اینوکوا* اختلاف معنی داری مشاهده شد. مقایسه دوتایی میان اثر ضدباکتریایی اسانس زردچوبه به تنهایی و در حالت توام با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل نتایج آماری نشان داد که برای تمامی باکتری‌ها به جز باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده گردید. نتایج نشان داد که مقایسه دوتایی میان اسانس زردچوبه خاص و حالت ترکیبی اسانس زردچوبه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسن در سطح ۵ درصد به جز برای باکتری *اشرشیا کلی* در سایر باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. مقایسه دوتایی میان حالت ترکیبی اسانس زردچوبه با

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل نشان داد که در حالت ترکیبی برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده نگردید، در حالی که برای سایر باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد(جدول ۲ و شکل ۱).

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد (mm) و برهمکنش اسانس زردچوبه، کلرامفنیکل و جنتامایسین بر سویه‌های استاندارد بیماری‌زا (کربی-بوئر)

ماده ضد میکروبی/باکتری	سودوموناس ائروژینوزا	سالمونلا تیفی موریوم	اشرشیا کلی	استافیلوکوکوس اورئوس	لیستریا اینوکوا
اسانس زردچوبه	۹/۴۰±۰/۲۶^{a}	۱۰/۵۰± ۰/۳۵^{a}	۱۱/۲۰± ۰/۲۰^{a}	۱۳/۱۰±۰/۳۲^{a}	۸/۱۰± ۰/۶۳^{a}
کلرامفنیکل	۲۲/۶۰±۰/۳۸^{b}	۱۶/۸۰± ۰/۱۰^{b}	۱۶/۱۰± ۰/۱۵^{b}	۳۰/۴۰±۰/۸۰^{b}	۱۵/۷۰± ۰/۵۲^{b}
جنتامایسین	۲۳/۴۰±۰/۵۳^{b}	۱۶/۲۰± ۰/۴۱^{b}	۲۶/۵۰± ۰/۲۷^{c}	۲۹/۸۰±۰/۷۰^{b}	۲۲/۰۰± ۰/۴۲^{c}
اسانس زردچوبه + کلرامفنیکل	۲۶/۶۰±۰/۴۸^{c}	۱۸/۳۰± ۰/۳۸^{c}	۱۰/۱۰± ۰/۴۹^{a}	۳۸/۹۰±۰/۶۰^{c}	۱۶/۳۰± ۰/۲۸^{b}
اسانس زردچوبه + جنتامایسین	۳۲/۱۰±۰/۶۵^{d}	۲۶/۱۰± ۰/۲۹^{d}	۱۱/۰۰± ۰/۱۹^{a}	۴۰/۱۰±۰/۴۸^{c}	۲۶/۹۰± ۰/۴۶^{d}

- **حروف غیر مشابه در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد است.**

شکل ۱- نمایی از قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و جنتامایسین.

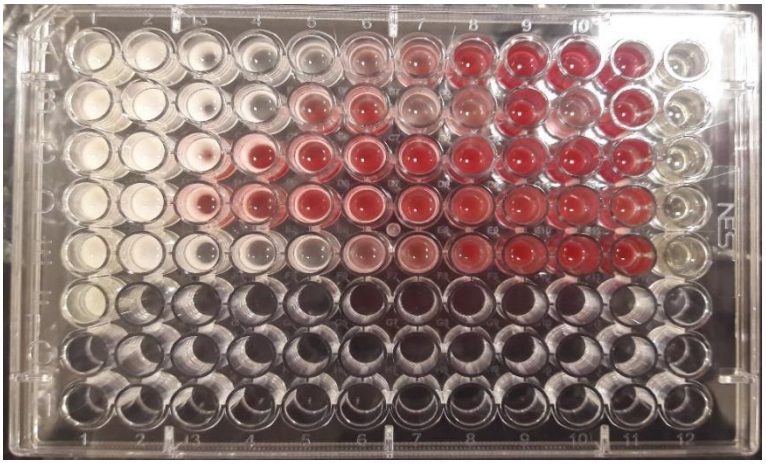
نتایج آزمون چاهک آگار نشان داد که بیشترین و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد مشاهده شده به ترتیب برای باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و اشرشیا کلی مشاهده شد. مقایسه دوتایی اثر ضدباکتریایی اسانس زردچوبه به روش چاهک آگار برای تمامی باکتری‌ها به جز باکتری‌های لیستریا اینوکوا و استافیلوکوکوس اورئوس در سطح آماری ۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس زردچوبه به روش میکرودایلوشن براث و معرف تری فنیل تترازویلیوم کلرید برای باکتری‌های سودوموناس ائروژینوزا، سالمونلا تیفی‌موریوم، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا به ترتیب ۵۰، ۵۰، ۲۰۰، ۲۵ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود(جدول ۳). در شکل ۲، نمایی از آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس زردچوبه بر باکتری-های عامل عفونت و مسمومیت نشان داده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت کشندگی اسانس زردچوبه برای تمامی باکتری‌های مورد بررسی بزرگتر از ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی اسانس زردچوبه به روش‌های چاهک آگار (mm)، حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و حداقل غلظت کشندگی (mg/mL) بر سویه‌های استاندارد بیماری‌زا

روش آزمون/باکتری	سودوموناس ائروژینوزا	سالمونلا تیفی موریوم	اشرشیا کلی	استافیلوکوکوس اورئوس	لیستریا اینوکوا
چاهک آگار	۱۳/۰۰±۰/۳۳^{b}	۱۶/۰۰± ۰/۲۶^{d}	۹/۵۰± ۰/۷۱^{a}	۱۴/۵۰±۰/۱۹^{c}	۱۴/۲۰± ۰/۱۸^{c}
حداقل غلظت مهارکنندگی	۵۰	۵۰	۲۰۰	۲۵	۲۰۰
حداقل غلظت کشندگی	بزرگتر از ۴۰۰	بزرگتر از ۴۰۰	بزرگتر از ۴۰۰	بزرگتر از ۴۰۰	بزرگتر از ۴۰۰



شکل ۲- نمایی از حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس زردچوبه به روش میکرودایلوشن براث بر باکتری‌های بیماری‌زا.

بحث

شیوع بیماری‌های عفونی در سرتاسر جهان و از سویی مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، پژوهشگران را ترغیب به شناسایی و تولید منابع جدید درمانی با کم‌ترین اثر جانبی نموده است (۱۹). در این پژوهش آزمایشگاهی، از اسانس زردچوبه برای جلوگیری از رشد و مهار تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای عامل عفونت و مسمومیت غذایی استفاده شد. همچنین برهمکنش اسانس زردچوبه با دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و کلرامفنیکل نیز بررسی گردید. نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس زردچوبه توانست از رشد باکتری‌های بیماری‌زای مورد مطالعه در سطح محیط کشت (شرایط برون‌تنی) جلوگیری کند. در حالت ترکیبی اسانس و آنتی‌بیوتیک‌ها نتایج فعالیت ضدمیکروبی برای تمامی باکتری‌ها به جز *اشرشیا کلی* به صورت معنی‌داری افزایش یافت. تاکنون مطالعات اندکی در مورد برهمکنش اسانس زردچوبه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی انجام شده است. برهمکنش اسانس زردچوبه با اسانس ریحان توسط سمیعی و همکاران (۱۳۹۷)، به روش غلظت بازدارنده افتراقی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *لیستریا اینوکوا*، *سالمونلا تیفی*، *انتروباکتر ائروژنز* بررسی شد. نتایج این پژوهشگران نشان داد که در حالت ترکیبی دو اسانس برای باکتری‌های *لیستریا اینوکوا* و *انتروباکتر ائروژنز* حالت هم‌افزایی مشاهده شد. همچنین ترکیب اسانس‌ها تاثیری بر باکتری‌های *سالمونلا تیفی* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نشان نداد (۲۰). همانگونه که در جدول ۲، مشخص است اسانس زردچوبه بیشترین اثر بازدارندگی را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که در اکثر این پژوهش‌ها اثر اسانس زردچوبه بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. استانوجویک و همکاران (۲۰۱۵)، فعالیت ضد میکروبی اسانس زردچوبه را به روش دیسک دیفیوژن بر ۸ سویه بیماری‌زا بررسی کردند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که اسانس زردچوبه بر باکتری‌های *باسیلوس سوبتلیس* و *باسیلوس سرئوس* موثر بود و فعالیت ضدباکتریایی بر باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *لیستریا مونوسایتوژنز* مشاهده نشد (۲۱). سینگ و همکاران (۲۰۰۲)، اثر ضدباکتریایی اسانس زردچوبه را در غلظت‌های مختلف µg/ml ۲۰-۲۰۰ بر سویه‌های استاندارد و بالینی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تایید کردند (۲۲). نوراجیت و همکاران (۲۰۰۷)، گزارش کردند روغن ریزوم تازه زردچوبه دارای فعالیت ضدمیکروبی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. در مطالعه آن‌ها فعالیت ضدباکتریایی بر باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* مشاهده نشد. در پژوهش ما نیز اثر ضدباکتری بر سویه گرم منفی *اشرشیا کلی* کم‌تر از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود (۲۳). لاواوینیت و همکاران (۲۰۱۰)، اثر مهاری عصاره‌های اتانول و هگزان زردچوبه را بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای جدا شده از میگو و مرغ را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره-های اتانول و هگزان زردچوبه به ترتیب بین ppt ۳/۹۱-۱۲۵ و ppt ۱۲۵-۱۰۰۰ بود. همچنین نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره اتانولی زردچوبه فعالیت ضدباکتریایی قویتری نسبت به عصاره هگزانی داشت (۲۴). نجی و همکاران (۱۹۹۹)، فعالیت ضد باکتریایی روغن زردچوبه استخراج شده از اولئورسین زردچوبه را که با استفاده از کروماتوگرافی ستونی به سه بخش جدا شده بود را، مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققین اثر ضد باکتریایی روغن زردچوبه را بر باکتری-های *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس کوآگولانس*، *باسیلوس سوبتلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس ائروژینوزا* تایید کرد (۲۵). سینگ و همکاران (۲۰۱۱)، اسانس حاصل از ریزوم گونه رومیایی زردچوبه را با روش‌های اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل زمان کشندگی در برابر میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *کاندیدا آلبیکنس* و *آسپرژیلوس نایجر* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس نسبت به هر چهار سویه میکروبی مورد استفاده در غلظت ۱۰ میکرولیتر به جز *سودوموناس ائروژینوزا* فعالیت بسیار خوبی از خود نشان داد (۲۶). مقایسه نتایج این پژوهشگران تقریبا با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت. کریمی و همکاران (۲۰۱۸)، فعالیت ضدمیکروبی عصاره زردچوبه را در شرایط برون‌تنی تایید کردند (۲۷). مون و همکاران (۲۰۱۳)، گزارش کردند میانگین حداقل غلظت مهارکنندگی کورکومین زردچوبه برای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ترتیب mg/l ۱۲۶/۹ و ۱۱۷/۴ بود (۲۸). در پژوهش ما نیز دامنه حداقل غلظت مهارکنندگی برای سویه-های مورد بررسی mg/mL ۲۵-۲۰۰ به دست آمد. گونس و همکاران (۲۰۱۶)، حداقل غلظت مهارکنندگی زردچوبه را بر باکتری‌های *سودوموناس ائروژینوزا*، *اسینتوباکتر* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب mg/mL ۹۵/۱۳، ۵۵/۱۴ و ۷/۳ گزارش کردند (۲۹). مقایسه نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که در مطالعه ما در غلظت-های پایین‌تری رشد باکتری‌های *سودوموناس ائروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مهار شد. شاید بتوان دلیل این امر را به عواملی همانند شرایط آب و هوایی، نوع خاک، زمان برداشت گیاه، نحوه استخراج، نحوه خشک شدن و ... نسبت داد (۳۰ و ۳۱). پالاکشا و همکاران (۲۰۱۳)، فعالیت ضدباکتریایی چندین گونه گیاهی از جمله زردچوبه را با استفاده از روش چاهک آگار در جنوب هندوستان مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به زردچوبه حساس بودند و قطر هاله عدم رشد میکروبی برای سویه‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب mm ۱۴ و ۸ بود (۳۲). پوندیر و جین (۲۰۱۰)، گزارش کردند که قطر هاله عدم رشد میکروبی به روش چاهک آگار برای عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی زرد چوبه برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب mm ۲۶، ۲۴ و ۲۲ بود. این پژوهشگران همچنین گزارش کردند که عصاره زردچوبه می توانند جایگزینی مناسب برای نگهدارنده‌های شیمیایی باشد و می‌توان از آن به عنوان یک نگهدارنده ضدمیکروبی طبیعی در صنعت غذا بهره برد (۳۳). در مطالعه شارما و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت ضدقارچی زردچوبه با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث بررسی شد. نتایج این پژوهشگران نشان داد قطر هاله عدم رشد میکروبی برای روغن زردچوبه بزرگتر از قطر مشاهده شده توسط آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و جنتامایسین بود (۳۴). امروزه با توجه به سازگاری داروهایی با منشأ گیاهی و طبیعی با فیزولوژی بدن انسان که در مقایسه با داروهای شیمیایی دارای عوارض جانبی کمتری هستند،

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از این داروهای گیاهی رو به افزایش است. اثر اسانس زردچوبه بر باکتری‌های مورد مطالعه در جداول ۲ و ۳ آورده شده است. نتایج به دست آمده اثر اسانس زردچوبه بر باکتری-های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد میزان اثربخشی این اسانس بر باکتری‌های مختلف، متفاوت است. در مطالعه سمیعی و همکاران (۱۳۹۷)، در روش دیسک دیفیوژن و چاهک در آگار باکتری گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساس‌تر بودند. این پژوهشگران گزارش کردند که قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار بیشتر از دیسک دیفیوژن آگار بود. بر اساس مقایسه این دو روش این محققین بیان کردند در روش چاهک آگار به دلیل تماس مستقیم اسانس با میکروارگانیسم‌ها اثر ضدمیکروبی بیشتر بود (۳۵). نتایج این محققین با یافته‌های پژوهش ما مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اسانس زردچوبه به تنهایی و توام با آنتی‌بیوتیک‌های درمانی دارای اثر مهارکنندگی بر سویه‌های بیماری‌زا بود. در حالت ترکیبی فعالیت ضدباکتریایی اسانس زردچوبه به صورت چشمگیری افزایش یافت. به طوری که در حالت ترکیبی اسانس زردچوبه با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و جنتامایسین برای باکتری‌های *سودوموناس ائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* حالت سینرژیستی مشاهده گردید و قطر هاله عدم رشد افزایش یافت. با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان از پتانسیل بالقوه اسانس زردچوبه در صنایع داروسازی و غذایی بهره‌مند شد، هرچند لازم است آزمایش‌های تکمیلی انجام گیرد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

REFERENCES

1. Fallah Huseini H, Zahmatkash M, Haghighi M. A Review on Pharmacological Effects of *Curcuma longa* L. (Turmeric). Journal of Medicinal Plants. 2010;1(33):1-15. [Full Text in Persian].
2. Attarpouryazdi M, Kamalinejad M, Falvaei kouchak NS. Comparison of Antimicrobial Effects of *Cucuma Longa* extract and selective antibiotics against bacteria Isolated from infected burn wounds. Daneshvar Medicine. 2009;17(5):1-10. [Full Text in Persian].
3. Sakai K, Miyazaki Y, Yamane T, Saitoh Y, Ikawa C, Nishihata T. Effect of extracts of Zingiberaceae herbs on gastric secretion in rabbits. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1989;37(1):215-7.

Sureshjani MH, Yazdi FT, Mortazavi SA, Behbahani BA, Shahidi F. Antimicrobial effects of *Kelussia odoratissima* extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. Journal of Paramedical Sciences. 2014;5(2):115-20.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Tabatabaei YazdiF, Behbahani BA. Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "*in vitro*". 2013;4(4):55-61.
5. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food microbiology: fundamentals and frontiers: ASM Press Washington, DC. 2001; 10-100.
6. Pochop J, Kacaniova M, Hleba L, Lopasovsky LU, Bobkova A, Zelenakova L, et al. Detection of Listeria monocytogenes in ready-to-eat food by step one real-time polymerase chain reaction. Journal of Environmental Science and Health, Part B. 2012; 47(3):212-6.
7. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic Avicennia marina extracts on *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*" *in vitro*". Iranian South Medical Journal. 2014;17(5):879-88. [Full Text in Persian].
8. Alizadeh Behbahani B, Alghooneh A, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. Optimization of mangrove leaf extraction by mixture design and investigation of its antimicrobial effect on *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium* and *Escherichia coli*. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 2014;12(2): 201-213. [Full Text in Persian].
9. Behbahani BA, Fooladi AAI. Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities *Allium* essential oil against the growth of some microbial pathogens. Microbial Pathogenesis. 2018; 114:299-303.
10. Tabatabaei Yazdi F, Behbahani BA, Heidari Sureshjani M. The comparison of antimicrobial effects of Chevil (*Ferulago angulata*) extract with a variety of common therapeutic antibiotics *in vitro*. Arak Medical University Journal (AMUJ). 2014; 17(84): 35-46. [Full Text in Persian].
11. Omeidi Myrzai M, Hojjati M, Alizadeh Behbahani B, & Noshad M. Determination of chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of coriander seed essential oil on a number of pathogenic microorganisms. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 2020;16(2): 221-33. [Full Text in Persian].
12. Tanavar H, Barzegar H, Alizadeh Behbahani B, Mehrnia MA. Evaluation of the antimicrobial activity of *Mentha pulegium* essential oil on some foodborne pathogens and its interaction with gentamicin and chloramphenicol in vitro. Food Science and Technology. 2020;16(97):77-87. [Full Text in Persian].
13. Behbahani BA, Noshad M, Falah F. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. Microbial Pathogenesis. 2019; 136:1-6.
14. Alizadeh behbahani B, Noshad M, Falah F. Investigation of antimicrobial activity of *Fennel* essential oil on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning and its interaction with kanamycin antibiotic. Food Science and Technology. 2019;16(91):233-41. [Full Text in Persian].

www.SID.ir

Archive of SID

15. Tabatabai Yazdi F, Falah F, Alizadeh Behbahani B, Vasiee A, Mortazavi SA. Identification of chemical compounds, antioxidant potential, phenolic content and evaluation of inhibitory and bactericidal/fungicidal effects of ginger essential oil on some pathogenic microorganisms in vitro. Qom University of Medical Sciences Journal. 2019;13(3):50-62. [Full Text in Persian].

16. Yeganegi M, Yazdi FT, Mortazavi SA, Asili J, Behbahani BA, Beigbabaei A. *Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. Microbial Pathogenesis. 2018;116:62-7.

17. Barzegar H, Alizadeh behbahani B, Mehrnia MA. Identification of the chemical compounds and antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and the effects of its interaction with tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. Food Science and Technology. 2019;16(90):113-25. [Full Text in Persian].

18. Noshad M, Alizadeh Behbahani B. Identification of chemical compounds, antioxidant activity, and antimicrobial effect of *Elettaria cardamomum* essential oil on a number of pathogenic microorganisms *in vitro*. Qom University of Medical Sciences Journal. 2019;13(2):57-69. [Full Text in Persian].

19. Samiei A, Tabatabaei-Yazdi F, Mazaheri Tehrani M. An investigation into the antioxidant activity, phenolic compounds, antimicrobial effect and interaction of the essential oils of *Curcuma longa* and *Ocimum basilicum* on some pathogenic bacteria. Food Science and Technology. 2018;15(74):99-107. [Full Text in Persian].

20. Stanojević JS, Stanojević LP, Cvetković DJ, Danilović BR. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the turmeric essential oil (*Curcuma longa* L.). Advanced technologies. 2015;4(2):19-25.

21. Singh R, Chandra R, Bose M, Luthra PM. Antibacterial activity of Curcuma longa rhizome extract on pathogenic bacteria. Current Science. 2002:737-40.

22. Norajit K, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O. Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. Molecules. 2007;12(8):2047-60.

23. Lawhavinit O-a, Kongkathip N, Kongkathip B. Antimicrobial activity of curcuminoids from Curcuma longa L. on pathogenic bacteria of shrimp and chicken. Kasetsart Journal Natural Science. 2010; 44:364-71.

24. Negi P, Jayaprakasha G, Jagan Mohan Rao L, Sakariah K. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999;47(10):4297-300.

25. Singh S, Sankar B, Rajesh S, Sahoo K, Subudhi E, Nayak S. Chemical composition of turmeric oil (Curcuma longa L. cv. Roma) and its antimicrobial activity against eye infecting pathogens. Journal of Essential Oil Research. 2011;23(6):11-8.

26. Karimi N, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Mehramuz B, Kafil HS. Antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of turmeric extract-loaded nanostructured lipid carrier (NLC). Colloid and Interface Science Communications. 2018; 22:18-24.

www.SID.ir

Archive of SID

27. Mun S-H, Joung D-K, Kim Y-S, Kang O-H, Kim S-B, Seo Y-S, et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Phytomedicine. 2013;20(8-9):714-8.

28. Gunes H, Gulen D, Mutlu R, Gumus A, Tas T, Topkaya AE. Antibacterial effects of curcumin: an in vitro minimum inhibitory concentration study. Toxicology and industrial health. 2016;32(2):246-50.

29. Noshad M, Alizadeh Behbahani B. Investigation of phytochemical compounds, antioxidant potential and the antimicrobial effect of Bergamot essential oil on some pathogenic strains causing infection in vitro. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2019; 26(6):122-32. [Full Text in Persian].

30. Heydari S, Jooyandeh H, Alizadeh behbahani B, Noshad M. Invitro Determination of Chemical Compounds and Antibacterial Activity of *Lavandula* Essential oil against some Pathogenic Microorganisms. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2019;27(4):77-89. [Full Text in Persian].

31. Palaksha M, Banji D, Rao A. In vitro evaluation of antibacterial activity of alcoholic extracts of ten South Indian spices against multi resistant gram positive and gram negative bacteria by agar well diffusion method. World Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013; 2:3840-7.

32. Pundir RK, Jain P. Comparative studies on the antimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum*) and turmeric (*Curcuma longa*) extracts. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 2010;1(2):492-500.

33. Sharma R, Sharma G, Sharma M. Comparative antifungal study of essential oil with allopathic drugs against Malassezia furfur. International Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archive. 2012;3(1):89-93.

34. .Samiei A, Tabatabaei-Yazdi F, Mazaheri Tehrani M. Identification of *Curcuma longa* essential oil compounds and evaluation of its antibacterial effect on some food-poisoning bacteria "*in vitro*". Food Science and Technology. 2018;15(74):321-29. [Full Text in Persian]

www.SID.ir