

اثر ضد لیستریایی عصاره اتانولی و آبی گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba* DC.) در محیط کشت و شیر

مجتبی بنیادیان^{۱*}، تارا روزخوش^۲ و حمداله مشتاقی^۳

۱- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

پست الکترونیک: boniadian@vet.sku.ac.ir

۲- کارشناس ارشد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۷

تاریخ اصلاح نهایی: فروردین ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶

چکیده

لیستریا مونوسیژنر به عنوان یکی از باکتری‌های منتقله از مواد غذایی به ویژه محصولات لبنی شناخته می‌شود. تقاضا برای جایگزینی نگهدارنده‌های شیمیایی با ترکیب‌های طبیعی افزایش یافته است. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر عصاره اتانولی و آبی گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba* DC.) روی باکتری لیستریا مونوسیژنر به روش تهیه رقت لوله‌ای در محیط کشت مایع و شیر، طراحی و اجرا شد. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) از روش استاندارد میکرودايلوش (Microdilution) استفاده شد و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) با استفاده از کشت روی محیط جامد تعیین شد. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی به ترتیب ۵۰ و ۷۰ mg/ml و حداقل غلظت باکتری‌کشی برای این عصاره‌ها به ترتیب ۷۰ و ۱۰۰ mg/ml بدست آمد. براساس نتایج بدست آمده، هر دو عصاره آبی و اتانولی اثر ضد لیستریایی قابل قبولی در شیر از خود نشان دادند، به نحوی که جمعیت باکتریایی در گروه کنترل نسبت به تیمارهای حاوی این عصاره‌ها، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ۷۲ ساعت، اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P < 0/05$). همین نتایج در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نیز بدست آمد که پس از گذشت ۲۴ ساعت، بین گروه کنترل و تیمارهای حاوی عصاره (اتانولی و آبی) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره آبی گیاه خوشاریزه، اثر ضد لیستریایی قوی‌تری نسبت به عصاره اتانولی داشت. همچنین مشخص گردید که تأثیر ضد لیستریایی عصاره آبی این گیاه در دمای ۴ درجه نسبت به دمای ۲۵ درجه بیشتر بود.

واژه‌های کلیدی: لیستریا مونوسیژنر، عصاره، خوشاریزه (*Echinophora platyloba* DC.)، شیر.

مقدمه

بالایی را برای رشد در دامنه وسیعی از شرایط مانند دمای یخچال، pH پایین و غلظت بالای نمک داراست که آن را قادر می‌سازد تا در غذاهای فرآوری شده زنده بماند و رشد کند و خطر آلودگی مصرف‌کنندگان را افزایش دهد (Uyttendaele et al., 1999).

لیستریا مونوسیژنر باسیل کوتاه، گرم مثبت، بدون اسپور، هوازی اختیاری، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و سرماگرا می‌باشد (Mehdizadeh et al., 2010). لیستریا مونوسیژنر، در محیط به طور وسیع پراکنده است و توانایی

عفونت جنین و در نهایت سقط، به دنیا آمدن نوزاد مرده و یا منجر به تولد زود هنگام شود (Orndorff *et al.*, 2006). استفاده از نگهدارنده‌هایی که قادر باشند رشد باکتری لیستریا مونوسی‌توزن را در مواد غذایی کنترل نمایند، بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Asgari Nematian & Mohammadi, 2016). استفاده از مواد شیمیایی در غذا باعث نگرانی مردم شده است، زیرا مردم بر این باورند که نگهدارنده‌های شیمیایی ضد میکروبی ممکن است سلامتی آنها را تهدید نماید. به همین دلیل جایگزینی برای این مواد از اهمیت خاصی برخوردار است. البته استفاده از عصاره و اسانس گیاهان دارویی می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی باشد. عصاره‌های گیاهی دارای موادی هستند که می‌توانند بر علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها بکار روند (Rabiei *et al.*, 2013).

گیاه دارویی خوش‌اریزه با نام علمی *Echinophora platyloba* از خانواده Apiaceae می‌باشد. در فارسی، خوش‌اریزه، تیغ‌توراغ، خوش‌اروزه و کشندر نامیده می‌شود (Mirghazanfari *et al.*, 2012). این گونه به‌طور وسیعی در نواحی غرب و مرکز ایران به‌عنوان یک طعم‌دهنده غذا مصرف می‌شود (Aqababa *et al.*, 2016). در پزشکی سنتی به‌منظور بهبود زخم و درمان زخم معده به دلیل ویژگی ضدقارچی، ضدنفخ و به‌عنوان محرک معده استفاده شده و نیز فعالیت ضد میکروبی و ضدسرطانی آن اخیراً نشان داده شده است (Hashemi *et al.*, 2011; Glamoclija *et al.*, 2011). این گیاه همچنین دارای اثر محافظتی از کبد در برابر سمیت حاصل از استامینوفن است (Heidarian *et al.*, 2014). ترکیب‌های گیاه خوش‌اریزه براساس نتایج بدست آمده از مطالعات Sharafati-chaleshtori و همکاران (۲۰۱۲) شامل ترکیب‌های فنولیک (۱۳۸mg/g)، فلاونوئید (۱۲۷mg/g) و فلاونول (۱۳۲mg/g) می‌باشد. با توجه به موارد ذکر شده، این مطالعه به‌منظور بررسی تأثیر عصاره اتانولی و آبی گیاه خوش‌اریزه بر باکتری لیستریا مونوسی‌توزن در محیط کشت و شیر، طراحی و اجرا شد.

لیستریا مونوسی‌توزن قادر به رقابت با باکتری‌های دیگر نیست، از این رو در محیط‌هایی که رقیب کم باشد مانند دمای یخچال بهتر رشد می‌کند (Marth & Steele, 2001)؛ گسترده در خاک، آب، گیاهان، مواد خوراکی، مدفوع، سیلوها، سبزیجات و علوفه کهنه کپک زده وجود دارد و یکی از مهمترین منابع عفونت در حیوانات اهلی و وحشی به‌شمار می‌رود (Cother *et al.*, 1998; Tajbakhsh, 2001).

لیستریا مونوسی‌توزن در تعداد زیادی از غذاهای فرآوری شده و خام، محصولات گوشتی مانند سوسیس، گوشت گاو و محصولات تازه مثل ترپچه و همچنین در محصولات ماهی، غذاهای دریایی، تخم‌مرغ، میوه، فرآورده‌های لبنی و سبزیجات دیده شده است (Sanchooli *et al.*, 2012). اخیراً ارتباط قوی‌تری بین لیستریوز و مصرف فرآورده‌های لبنی در مقایسه با سایر فرآورده‌های غذایی گزارش شده است و شیر پاستوریزه، شیر غیر پاستوریزه و پنیر به‌عنوان منبع همه‌گیری لیستریوز شناخته شده‌اند. نتایج اغلب پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که لیستریا مونوسی‌توزن شیوع گسترده‌ای را در بیشتر نقاط دنیا به‌ویژه در مواد غذایی لبنی دارد (Kargar & Ghasemi, 2007).

در اغلب موارد بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی که ضعف ناشی از بدخیمی، شیمی درمانی، پیوند اعضا، بیماری کبدی، نارسایی کلیه، دیابت و در برخی موارد همراه با AIDS (سندرم نقص ایمنی اکتسابی) بوده‌اند (Shayanfar & Jalilvand, 2004) تمایل لیستریا مونوسی‌توزن به سیستم عصبی مرکزی منجر به بیماری حاد می‌شود که معمولاً میزان کشندگی آن بالاست (۲۵ تا ۵۰٪) و در بین افرادی که از بیماری بهبود یافته‌اند، علائم نورولوژیک باقی می‌ماند. بارداری خطر ابتلا به لیستریوزیس را افزایش می‌دهد (Orndorff *et al.*, 2006).

لیستریا مونوسی‌توزن در زنان باردار معمولاً باعث بیماری باکتری (Bacteremia) مشابه آنفلوانزا می‌شود که اگر درمان نشود، می‌تواند به التهاب جفت و یا پرده آمنیوتیکو

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

گیاه خوشاریزه، در فصل بهار، از مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری گردید. ابتدا برای حذف گرد و غبار آبکشی شد و پس از شست‌وشوی اولیه، قسمت‌های قابل استفاده این گیاه جداسازی و به‌طور کامل در سایه خشک شد و پس از خشک شدن، توسط آسیاب برقی بودر گردید.

استخراج عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه خوشاریزه

برای تهیه عصاره‌های آبی و اتانولی، ۵۰ گرم از بودر خوشاریزه به همراه ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر برای تولید عصاره آبی و همین میزان بودر (۵۰ گرم) به همراه ۴۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درجه برای تولید عصاره اتانولی مخلوط شدند و برای مدت ۲۴ ساعت توسط دستگاه شیکر (Shaker) روند مخلوط شدن برای استخراج کامل عصاره ادامه پیدا کرد. سپس مخلوط سانتریفیوژ گردید و محلول باقی‌مانده به ظروف مقاوم به حرارت منتقل شد و تا زمان خشک شدن در گرمخانه با درجه حرارت حدود ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از اتمام فرایند خشک شدن، تمامی عصاره باقی‌مانده در ظرف جداسازی گردید و تا زمان استفاده، در ظروف مناسب، در یخچال با دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد (برای حفظ شرایط مناسب از جمله محیط خشک و خنک) نگهداری شد.

آماده‌سازی باکتری لیستریا مونوسی‌توزنز برای تلقیح

سویه استاندارد باکتری لیستریا مونوسی‌توزنز، ATCC1297 موجود در آزمایشگاه مورد استفاده قرار گرفت. ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، باکتری مورد نظر در مجاورت شعله به محیط کشت مایع (TSB Tryptic Soy Broth) (مرک آلمان) انتقال یافت و پس از تلقیح، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری

شد. سری رقت تا ۶-۱۰ از سوسپانسیون باکتری بعد از گرمخانه‌گذاری تهیه گردید. رقت‌های ۴، ۵ و ۶ در پلیت کشت سطحی داده شد و برای مدت زمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. تعداد کلنی‌های پلیت مناسب (پلیت حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی) شمارش گردید و تعداد لیستریا مونوسی‌توزنز در هر میلی‌لیتر تعیین شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) عصاره‌های آبی

و اتانولی

برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره‌ها، از پلیت‌های ۹۶ چاهکی ته‌گرد با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده شد. ابتدا درون چاهک‌ها محیط کشت TSB حاوی عصاره‌های آبی و اتانولی به‌طور جداگانه با غلظت‌های ۳٪، ۵٪، ۷٪، ۱۰٪، ۱۲٪، ۱۵٪، ۱۷٪ و ۲۰٪ وارد شد. سپس از کشت ۲۴ ساعته باکتری لیستریا مونوسی‌توزنز به تعداد 10^5 cfu/ml به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. ستون یازدهم به‌عنوان کنترل محیط کشت (محیط کشت بدون عصاره و باکتری) و ستون دوازدهم به‌عنوان کنترل منفی (محیط کشت بدون عصاره و دارای باکتری) در نظر گرفته شدند. به‌منظور مخلوط شدن محتویات درون چاهک‌ها پلیت‌ها به‌مدت یک دقیقه روی شیکر قرار داده شد. سپس پلیت‌ها برای مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه شیکردار گرمخانه‌گذاری شدند و بعد کدورت و عدم کدورت چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفت و اولین چاهک شفاف و فاقد هر گونه کدورت به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد (Varnam, 1996).

تعیین حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره‌های آبی و

اتانولی

برای تعیین حداقل غلظت کشنده، در مجاورت شعله و با رعایت شرایط استریل، از چاهک تشخیص داده شده

آماري قرار گرفت و اختلاف بين گروه‌ها در سطح آماري $P < 0/05$ ارزيابي شد.

نتايج

نتايج مطالعه بيانگر اين بود كه عصاره‌هاي آبي و اتانولي خوشايزه، باعث كنترل رشد باكتري ليستريا مونوسيتوژنز هم در محيط كشت و هم در محيط شير مي‌شوند. براساس نتايج بدست آمده، حداقل غلظت ممانعت‌كننده از رشد (MIC) براي عصاره آبي و الكللي به ترتيب ۵۰ و ۷۰ ميلي گرم در ميلي ليتر و حداقل ميزان كشندي (MBC) به ترتيب ۷۰ و ۱۰۰ ميلي گرم در ميلي ليتر محاسبه شد.

ميانگين تعداد كلني‌هاي باكتري ليستريا مونوسيتوژنز (cfu/ml) در غلظت‌هاي مختلف عصاره‌هاي آبي و اتانولي، در محيط شير استريليته، در دو دماي متفاوت در جدول‌هاي ۱ و ۲ نشان داده شده‌است. براساس نتايج بدست آمده، جمعيت باكتريايي در گروه كنترل نسبت به تيمارهاي حاوي عصاره آبي و اتانولي، در دماي ۴ درجه سانتي‌گراد پس از گذشت ۷۲ ساعت، اختلاف معني‌داري نشان دادند ($P < 0/05$).

همين نتايج براي دماي ۲۵ درجه سانتي‌گراد نيز پس از گذشت ۲۴ ساعت، بين گروه كنترل و تيمارهاي حاوي عصاره (اتانولي و آبي) مشاهده شد ($P < 0/05$). با توجه به داده‌هاي جدول ۱، در دماي ۴ درجه سانتي‌گراد، پس از ۷۲ ساعت بين عصاره‌هاي آبي با غلظت ۵٪ و ۸٪ و همچنين غلظت‌هاي ۶٪ و ۸٪ اختلاف معني‌داري مشاهده شد ($P < 0/05$). اما بين غلظت‌هاي ۷٪ و ۸٪ اختلاف معني‌داري مشاهده نشد ($P > 0/05$). در دماي ۲۵ درجه سانتي‌گراد، بين عصاره‌هاي آبي با غلظت‌هاي ۵٪ و ۶٪ اختلاف معني‌داري مشاهده نشد ($P > 0/05$) ولي بين ساير غلظت‌ها با يكديگر اختلاف معني‌داري بود ($P < 0/05$).

به‌عنوان MIC و غلظت‌هاي بعد از آن، ۲۰ ميكروليتر به پليت‌هاي حاوي محيط كشت PCA (مرك، آلمان) منتقل گرديد و كشت سطحی انجام شد. تمامي پليت‌هاي كشت داده شده در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاري شدند و بعد، از نظر رشد باكتري مورد بررسي قرار گرفتند. پليت فاقد كلني به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد.

بررسي اثر ضد ليستريايي عصاره‌هاي آبي و اتانولي در شير از عصاره‌هاي آبي و اتانولي، غلظت برابر MIC و سه غلظت بالاتر از آن به لوله‌ها منتقل شد و توسط شير استريليته به حجم ۲/۵ ميلي ليتر رسانده شد. در هر يك از لوله‌ها، از كشت ۲۴ ساعته باكتري تلقيح شد، به‌نحوي كه در هر ميلي ليتر محيط 10^5 باكتري موجود باشد. براي هر غلظت از عصاره‌هاي آبي و اتانولي سه تكرار قرار داده شد. يك لوله حاوي شير بدون عصاره و حاوي باكتري به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. لوله‌ها در شرايط ۴ درجه سانتي‌گراد نگهداري شدند و در زمانهاي ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از آنها نمونه‌برداري و پس از تهيه رقت و كشت بر روي محيط TSA (مرك، آلمان) و گرمخانه‌گذاري در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت تعداد كلني‌ها شمارش شد. تمام اين مراحل براي شرايط دمائي ۲۵ درجه سانتي‌گراد نيز تكرار شد ولي نمونه‌برداري و شمارش باكتري در زمان‌هاي ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت انجام گرديد.

تجزيه و تحليل آماري

داده‌هاي بدست آمده از شمارش پرگنه‌ها، توسط نرم‌افزار آماري Sigma Stat 4 با آزمون آناليز واريانس يك‌طرفه (ANOVA) و آزمون تكميلي Tukey مورد تجزيه و تحليل

جدول ۱- میانگین تعداد کلنی‌های باکتری لیستریا مونوسیوتوزنز (cfu/ml) در غلظت‌های مختلف عصاره آبی خوشاریزه در محیط شیر استریلیزه

گروه	دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مدت ۷۲ ساعت	دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۲۴ ساعت
شاهد	$4/8 \times 10^6 \pm 7 \times 10^5 a$	$1/66 \times 10^8 \pm 5 \times 10^6 a$
%۵	$1/06 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2 b$	$1/53 \times 10^5 \pm 5 \times 10^2 b$
%۶	$7/46 \times 10^2 \pm 9 \times 10^2 b$	$1/13 \times 10^5 \pm 5 \times 10^2 b$
%۷	$1/26 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2 bc$	$2/03 \times 10^4 \pm 1 \times 10^2 c$
%۸	$1/63 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2 c$	$1/01 \times 10^2 \pm 1 \times 10^2 d$

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ می‌باشد.

($P > 0/05$) و بین غلظت‌های ۸٪ و ۹٪ نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$).

براساس نتایج بدست آمده در جدول ۲، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، پس از ۷۲ ساعت، عصاره‌های اتانولی با غلظت ۷٪ و ۸٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند

جدول ۲- میانگین تعداد کلنی‌های باکتری لیستریا مونوسیوتوزنز (cfu/ml) در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی خوشاریزه در محیط شیر استریلیزه

گروه	دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مدت ۷۲ ساعت	دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۲۴ ساعت
شاهد	$4/8 \times 10^6 \pm 7 \times 10^5 a$	$1/66 \times 10^8 \pm 5 \times 10^6 a$
%۷	$7/33 \times 10^2 \pm 5 \times 10^2 b$	$1/13 \times 10^4 \pm 1 \times 10^2 b$
%۸	$2/6 \times 10^2 \pm 5 \times 10^2 bc$	$7/7 \times 10^2 \pm 8 \times 10^2 c$
%۹	$1/56 \times 10^2 \pm 4 \times 10^2 c$	$3/65 \times 10^2 \pm 4 \times 10^2 c$
%۱۰	$8 \times 10^2 \pm 10^2 d$	$1/6 \times 10^2 \pm 4 \times 10^2 d$

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ می‌باشد.

با همین غلظت، در کنترل رشد باکتری لیستریا مونوسیوتوزنز قوی‌تر عمل می‌کند. همچنین عصاره آبی با غلظت ۸٪ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، نسبت به عصاره اتانولی با همین غلظت، قوی‌تر عمل کرد. ولی میانگین تعداد باکتری در غلظت‌های برابر (۷٪ و ۸٪) از دو نوع عصاره (آبی و اتانولی) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$)، (جدول ۳).

میانگین تعداد کلنی‌های باکتری لیستریا مونوسیوتوزنز (cfu/ml) در غلظت‌های ۷٪ و ۸٪ عصاره‌های آبی و اتانولی، در محیط شیر استریلیزه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در جدول ۳ نشان داده شده‌است. البته بین غلظت‌های برابر (۷٪ و ۸٪) از دو نوع عصاره (آبی و اتانولی) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). عصاره آبی با غلظت ۷٪ در ۴ درجه سانتی‌گراد از عصاره اتانولی

جدول ۳- میانگین تعداد کلنی‌های باکتری لیستریا مونوسیوتوزنز (cfu/ml) در غلظت‌های ۷٪ و ۸٪ عصاره آبی و اتانولی خوشاریزه در دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط شیر استریلیزه

عصاره	دمای ۴ درجه سانتی‌گراد		دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد	
	۷٪	۸٪	۷٪	۸٪
آبی	$1/26 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2 a$	$1/63 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2 a$	$2/03 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4 a$	$1/01 \times 10^2 \pm 1 \times 10^2 a$
اتانولی	$7/33 \times 10^2 \pm 5 \times 10^2 b$	$2/6 \times 10^2 \pm 5 \times 10^2 b$	$1/13 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4 a$	$7/7 \times 10^2 \pm 8 \times 10^2 a$

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ می‌باشد.

عصاره آبی در شرایط دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۷۲ ساعت، نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۲۴ ساعت، تأثیر قوی‌تری در کاهش رشد باکتری لیستریا مونوسیوتوزنز از خود نشان می‌دهد (جدول‌های ۴ و ۵).

براساس نتایج بدست آمده و با توجه به جدول‌های ۴ و ۵، در تمام غلظت‌های عصاره آبی، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، میانگین تعداد باکتری در مقایسه با همین غلظت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند ($P < 0/05$). نتایج نشان‌دهنده این بود که

جدول ۴- میانگین تعداد کلنی‌های باکتری لیستریا مونوسیوتوزنز (cfu/ml) در غلظت‌های مختلف عصاره آبی خوشاریزه در محیط

شیر استریلیزه

گروه	دمای ۴ درجه سانتی‌گراد	دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد
شاهد	$4/8 \times 10^6 \pm 7 \times 10^5 a$	$1/66 \times 10^8 \pm 5 \times 10^6 b$
۵٪	$1/06 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2 a$	$1/53 \times 10^5 \pm 5 \times 10^2 b$
۶٪	$7/46 \times 10^2 \pm 9 \times 10^2 a$	$1/13 \times 10^5 \pm 5 \times 10^2 b$
۷٪	$1/26 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2 a$	$2/03 \times 10^4 \pm 1 \times 10^2 b$
۸٪	$1/63 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2 a$	$1/01 \times 10^3 \pm 1 \times 10^2 b$

حروف غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ می‌باشد.

جدول ۵- میانگین تعداد کلنی‌های باکتری لیستریا مونوسیوتوزنز (cfu/ml) در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی خوشاریزه در محیط

شیر استریلیزه

گروه	دمای ۴ درجه سانتی‌گراد	دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد
شاهد	$4/8 \times 10^6 \pm 7 \times 10^5 a$	$1/66 \times 10^8 \pm 5 \times 10^6 b$
۷٪	$7/33 \times 10^2 \pm 5 \times 10^2 a$	$1/13 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4 a$
۸٪	$2/6 \times 10^2 \pm 5 \times 10^2 a$	$7/7 \times 10^2 \pm 8 \times 10^2 a$
۹٪	$1/56 \times 10^2 \pm 4 \times 10^2 a$	$3/65 \times 10^2 \pm 4 \times 10^2 a$
۱۰٪	$8 \times 10^2 \pm 10^2 a$	$1/6 \times 10^2 \pm 4 \times 10^2 a$

حروف غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ می‌باشد.

بحث

Karimi Poor fard و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهش خود

در بررسی اثر ضدلیستریایی عصاره‌های چند گونه گیاهی از جمله جفت، سرشاخه آویشن دنایی و پوسته سبز پسته وحشی به نتایج مثبتی دست پیدا کردند. در این مطالعه بیشترین خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز مربوط به عصاره هیدروالکلی جفت بود که حداقل غلظت بازدارندگی این عصاره برابر با ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آن برابر با ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. در تعیین اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی مغز گردو که توسط Sharafati-Chaleshtori و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد، حداقل غلظت بازدارندگی این عصاره برای لیستریا مونوسیتوژنز، ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش گردید. Soltani nejad و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی کاکوتی کوهی را علیه برخی از باکتری‌های پاتوژن مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت بازدارنده عصاره متانولی کاکوتی کوهی نشان داد که این عصاره بر همه باکتری‌های مورد آزمایش بجز سودوموناس آئروژینوزا دارای اثر مهارکنندگی و میکروب‌کشی بود. حداقل غلظت مهارکنندگی و میکروب‌کشی این عصاره برای لیستریا مونوسیتوژنز ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد. نتایج این مطالعه نشان داد که از میان باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش لیستریا مونوسیتوژنز بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره کاکوتی دارد.

بر اساس نتایج مطالعات Noudoost و همکاران (۲۰۱۶)، عصاره چای سبز آزاد بر روی همه باکتری‌های مورد آزمایش نقش بازدارندگی از خود نشان داد. بیشترین قوی‌ترین فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز نانولیپوزومی برای لیستریا مونوسیتوژنز با منطقه مهار رشد ۱۶/۲ میلی‌متر بود. در این مطالعه، عصاره آبی گیاه خوشاریزه اثر ضد لیستریایی قوی‌تری نسبت به عصاره اتانولی از خود نشان داد. با در نظر گرفتن ترکیب‌های تشکیل‌دهنده این گیاه که Sharafati-Chaleshtori و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه خود به آن اشاره کردند و

بر اساس نتایج این مطالعه، هر دو عصاره آبی و اتانولی گیاه خوشاریزه، اثر ضد لیستریایی قابل قبولی از خود نشان دادند. بر اساس نتایج، حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی خوشاریزه ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و عصاره اتانولی ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. بررسی‌های بسیار زیادی در مورد تأثیر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان بر روی باکتری‌ها انجام شده است. در مطالعه‌ای که توسط Shamloo و Yavarmanesh (۲۰۱۵) تحت عنوان ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی آلوئه‌ورا روی باکتری‌های شاخص بیماری‌زا در سال ۱۳۹۴ انجام شد، نتایج این تحقیق مشخص کرد که عصاره اتانولی آلوئه‌ورا اثر ضدباکتریایی قابل توجهی روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز از خود نشان می‌دهد. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی آلوئه‌ورا به روش میکروداپلوشن، برای لیستریا مونوسیتوژنز ۰/۲۶۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد (Shamloo & Yavarmanesh, 2015).

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه تأثیر عصاره‌های خوشاریزه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مراتب قوی‌تر از دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که این نتایج همسو با مطالعه Pajohi-Alamoti و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی تأثیر عصاره آبی میوه سماق بر باکتری‌های پاتوژن است. آنان مشاهده کردند که دما نیز بر خاصیت ضد میکروبی عصاره آبی سماق تأثیر فزاینده‌ای داشت، به گونه‌ای که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد خاصیت ضد میکروبی عصاره آبی سماق در مقایسه با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر شد. Zeinali و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی گیاه اسپند در شرایط آزمایشگاهی بر روی تعدادی از باکتری‌های مهم بیماری‌زای منتقله از مواد غذایی، دریافتند که عصاره متانولی اسپند می‌تواند در غلظت ۰/۷۸ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز را مهار نماید.

- Karimi Poor fard, M., Mirzaei, A., Kargar, M., Khosravani, SAM. and Mohamadi, R., 2011. Antibacterial activities of *Thymus denaensis*, jaft and hydro-alcoholic extract of green hull *Pistacia atlantica* on *Listeria monocytogenes*. *Yasuj University of Medical Sciences Journal*, 17(1): 68-77.
- Marth, E.H. and Steele, J.L., 2001. *Applied Dairy Microbiology*. New York, Marcel Dekker Inc, 774p.
- Mehdizadeh, M., Rastegar, H., Sanaie, A. and Farshim Rad, F., 2010. Foodborne Listeriosis. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 17(2): 181-190.
- Mirghazanfari, S.M., Hosseinzadeh, L., Shokoohinia, Y., Aslany, M. and Kamali Nejad, M., 2012. Acute and subchronic toxicological evaluation of *Echinophora platyloba* DC. (Apiaceae) total extract in Wistar rats. *Clinics*, 67(5): 497-502.
- Montville, T.J. and Matthews, K.R., 2005. *Food Microbiology, An Introduction*. Washington DC, American Society for Microbiology, 159p.
- Noudoost, B., Noori, N., Gandom, H. and Akhondzadeh Basti, A., 2016. Nanoencapsulation of green tea extract by thin film layer method and its properties. *Journal of Food Safety and Hygiene*, 2(22): 1-11.
- Orndorff, P.E., Hamrick, T.S., Smoak, I.W. and Havell E.A., 2006. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Veterinary Microbiology Journal*, 114(1-2): 1-15.
- Pajohi-Alamoti, M., Yadollahi-Baghloyi, M. and Bazargani-Gillani, B., 2016. The effect of water extract of *Rhus coriaria* L. on the pathogenic bacteria at different temperatures. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 18(2): 41-47.
- Rabiei, S., Hosseini, H., Rezaei, M. and Mousavi, T., 2013. Inhibitory effects of ajowan essential oil on growth of *Listeria monocytogenes* in *Rutilus frissi* kutum broth medium and fillet. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 2: 71-80.
- Sanchooli, N., Ghaffari, M. and Gharaei, A., 2012. In vitro antibacterial effect of *Cuminum cyminum*, *Eugenia caryophyllata*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha spicata* and *Rhus coriaria* essential oil on *Vibrio alginolyticus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* bacteria. *Journal of Comparative Pathobiology Iran*, 9(3): 749-754.
- Shamloo, M. and Yavarmanesh, M., 2015. Evaluation of the antibacterial effects of aqueous and ethanolic extracts of *Aloe vera* on pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*). *Journal of Food Science and Technology*, 13(55): 149-159.
- همچنین درصد بالاتر ترکیب‌های فنولیک موجود در عصاره آبی خوشاریزه، نتایج بدست آمده قابل قبول به نظر می‌رسد. گیاه خوشاریزه علاوه بر ایجاد طعم در فرآورده‌های لبنی مانند پنیر، ماست و دوغ، قادر است رشد باکتری‌های لیستریا مونوسی‌توژنز را نیز مهار نماید. از این رو می‌توان پیشنهاد کرد که از این گیاه و ترکیب‌های آن به‌عنوان یک نگهدارنده و طعم‌دهنده طبیعی استفاده شود. مطالعات قبلی نشان داده که این گیاه اثر ضدقارچی قوی دارد و از رشد قارچ‌ها نیز جلوگیری می‌کند.

منابع مورد استفاده

- Aqababa, H., Golkary, H., Zarei, A. and Changizi-Ashtiyani, S., 2016. Effect of aerial parts extract of *Echinophora platyloba* on liver and kidney function tests in obese hypercholesterolaemia rats. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 23(10): 943-956.
- Asgari Nematian, M. and Mohammadi, S., 2016. The analgesic effect of *Echinophora platyloba* hydroalcoholic extract in male rats. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 5: 31-37.
- Cother, P.D., O'Reilly, K. and Hill, C., 2001. Role of the glutamatedecarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods. *Journal of Food Protection*, 64(9): 1362-1368.
- Glamoclija, J.M., Sokovic, M.D., Siljegovic, J.D., Ristic, M.S., Ciric, A.D. and Grubisic, D.V., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Echinophora spinosa* L. (Apiaceae) essential oil. *Records of Natural Products*, 5(4): 319-323.
- Hashemi, P., Abolghasemi, M.M., Ghiasvand, A.R., Ahmadi, S.H., Hassanvand, H. and Yarahmadi, A., 2009. A comparative study of hydrodistillation and hydro-distillation-solvent microextraction methods for identification of volatile components of *Echinophora cinerea*. *Chromatographia*, 69(1-2): 179-182.
- Heidarian, E., Saffari, J. and Jafari-Dehkordi, E., 2014. Hepatoprotective action of *Echinophora platyloba* DC leaves against acute toxicity of acetaminophen. *Journal of Dietary Supplements*, 11(1): 53-63.
- Kargar, M. and Ghasemi, A., 2007. A survey on prevalence rate & antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese of Marvdasht. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 3(31): 72-77.

- Ziziphora cliniopodiodes* on some pathogenic bacteria. Journal of Microbial Biotechnology, 2: 1-6.
- Tajbakhsh, H., 1998. General Bacteriology. Tehran University Press, 686p.
 - Uyttendaele, M., DeTroy, P. and Debevere, J., 1999. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. International Journal of Food Microbiology, 53(1): 75-80.
 - Varnam, A.H., 1996. Foodborne Pathogens. Wolfe Publishing Ltd, London, 558p.
 - Zeinali, T., Mohsenzadeh, M., Rezaeian Doloei, R. and Nabipoor, R., 2016. In vitro assessment of antimicrobial effect of methanolic extract of *Peganum harmala* against some important foodborne pathogens. Journal of Food Hygiene, 4: 27-36.
 - Sharafati-chaleshtori, R., Rafieian-kopaei, M., Mortezaei, S., Sharafati-chaleshtori, A. and Amini, E., 2012. Antioxidant and antibacterial activity of the extracts of *Echinophora platyloba* D.C. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 6(37): 2692-2695.
 - Sharafati-chaleshtori, R., Sharafati-chaleshtori, F., Rafieian-kopaei, M. and Ashrafi, K., 2011. Ethanolic walnut kernel phenolic compounds and its antimicrobial effect. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 19(4): 525-532.
 - Shayanfar, N. and Jalilvand, A., 2004. Listeriosis: two reported cases from Iran. Razi Journal of Medical Sciences, 11(42): 565-570.
 - Soltani nejad, Sh., Satani mokhtari, T. and Rahbarian, P., 2010. The study of antibacterial effect of the essential oil and methanol extracts of

Archive of SID

Anti listeria effects of *Echinophora platyloba* DC. extracts in broth medium and milk

M. Boniadian^{1*}, T. Rouzkhosh² and H. Moshtaghi³

1*- Corresponding author, Department of Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, E-mail: boniadian@vet.sku.ac.ir

2- M.Sc. in Food Hygiene, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

3- Department of Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: August 2017

Revised: April 2018

Accepted: April 2018

Abstract

Listeria monocytogenes is known as one of the bacteria transmitted by food, especially dairy products. Recently, the demand for replacing chemical preservatives with natural compounds has increased. The aim of this study was to investigate the antibacterial effects of *Echinophora platyloba* DC. extracts on *Listeria monocytogenes* in broth medium and milk. The standard method of microdilution was used to determine the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration of aqueous and ethanol extracts of *Echinophora platyloba* on tested bacteria. The results showed that the minimum inhibitory concentrations of aqueous and ethanol extracts, were 50 and 70 mg/ml respectively and the minimum bactericidal concentrations for these extracts, were 70 and 100 mg/ml respectively. Based on the results, both aqueous and ethanol extracts showed acceptable anti listeria effects at 4°C and 25°C in milk compared to the control group ($P<0.05$). At the same concentrations, the aqueous extract showed a stronger effect on the *Listeria monocytogenes* as compared with ethanol extract. Also, the results revealed that the antimicrobial effect of the aqueous extract was greater at 4°C than that of 25°C in the same concentration ($P<0.05$).

Keywords: *Listeria monocytogenes*, extract, *Echinophora platyloba* DC., milk.