Archive of SID

Journal of North Khorasan Medical Sciences
No 41, Volume 11, Issue 1

Research Article

Investigation of Antimicrobial Effect of *Biebersteinia multifida* on White Cheese Stored at Refrigerator Temperature

Mohammad Reza Jalilvand [1], Ameneh Mohammadi [2], Katayoun Roghani [3], Mitra Hashemi [4], Nahid Ghodrati [5], Pouyan Feyzi [6], Peiman Alesheikh [7,*], Parastoo Zarghami Moghaddam [8,*]

[1] Ph.D. of Nutrition, Natural products and medicinal plants Research center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

[2] MS of Phytochemistery, Natural products and medicinal plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

[3] MS of Analytical Chemistry, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

[4] MSc of Statistics, Deputy of Research, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

[5] MS of Food Science and Technology, Food and Drug Administration, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

[6] PhD of Chemical Engineering, Chemical and Petroleum Engineering Department, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

[7] PhD of Chinese Medicine, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

[8] PhD Student of Microbiology, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

*** Corresponding author:** Peiman Alesheikh, PhD of Chinese Medicine, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: arezoopayman@yahoo.com
Parastoo Zarghami Moghaddam, PhD Student of Microbiology, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: parastoozarghami@yahoo.com

DOI: 10.21859/nkjmd-110108

How to Cite this Article:
Jalilvand MR, Mohammadi A, Roghani K, Hashemi M, Ghodrati N, et al. Investigation of Antimicrobial Effect of *Biebersteinia multifida* on White Cheese stored at Refrigerator Temperature. *J North Khorasan Univ Med Sci.* 2019; **11**(1):58-64. DOI: 10.21859/nkjmd-110108

Received: 04 Aug 2018
Accepted: 29 Oct 2018

Keywords:
Natural Preservatives
Biebersteinia multifida
White Cheese
Antibacterial

© 2019 North Khorasan Medical Sciences

Abstract

Introduction: In recent years, food manufacturers have taken a lot of attention to the use of natural preservatives instead of chemical preservatives in their products, which has led consumers to prefer to use processed food without preservatives or even with natural preservatives. The aim of the present study was to investigate the antibacterial effect of ethanolic extract of *Biebersteinia multifida* on the growth of food-borne bacteria on white cheese.

Methods: After the plant gathering, the ethanolic extract of plant prepared, after ensuring the milk is not microbial contamination, Bacterial inoculation, Calcium chloride, extract and Enzyme added to milks and divided to five groups (control negative, positive and treatment). Survey of growth rate of bacteria did in 60 days.

Results: The results indicated that in the specimen containing the extract, the number of bacteria decreased throughout the study period compared to the non-extracting specimen. The most antibacterial effect of the extract was observed in removing or inhibiting bacterial growth in the first 24 hours. But over time, the antibacterial properties of the extract decreased and the number of developed bacteria increased.

Conclusions: Despite the fact that the effect of inhibiting bacterial growth of the *Biebersteinia multifida* extract in the first 24 hours was positive, the observation of the instability of the effect of the extract of the cheese in the next stages of the experiment led to the growth of food-borne bacteria and could not be used as substitutes for chemical preservatives.

www.SID.ir

Archive of SID

مجله علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه قان تپر (*Biebersteinia multifida*) بر پنیر سفید نگهداری شده در دمای یخچال

محمد رضا جلیلوند [۱]، آمنه محمدی [۲]، کتایون روغنی [۳]، میترا هاشمی [۴]، ناهید قدرتی [۵]، پویان فیضی [۶]، پیمان آل‌شیخ [۷،*]، پرستو ضرغامی‌مقدم [۸،*]

[۱] دکتری تخصصی تغذیه، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۲] کارشناسی ارشد فیتوشیمی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۳] کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۴] کارشناسی ارشد آمار زیستی، معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۵] کارشناسی ارشد شیمی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۶] دکتری تخصصی مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران
[۷] دکتری تخصصی طب چینی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۸] دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
* **نویسنده مسئول:** پیمان آل‌شیخ، دکتری تخصصی طب چینی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: arezoopayman@yahoo.com
پرستو ضرغامی‌مقدم، دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: parastoozarghami@yahoo.com

DOI: 10.21859/nkjms-110108

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۰۷
واژگان کلیدی:
نگهدارنده طبیعی
قان تپر
پنیر
ضدباکتری

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی محفوظ است.

چکیده

مقدمه: در سالهای اخیر تولید کنندگان مواد غذایی توجه زیادی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی با منشأ گیاهی به جای نگهدارنده های شیمیایی در محصولات خود نموده‌اند که این امر موجب تمایل زیاد مصرف کنندگان به استفاده از مواد غذایی فرآوری شده بدون نگهدارنده یا حتی المقدور با نگهدارنده های طبیعی شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی گیاه قان تپر بر رشد باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی بر پنیر سفید است.

روش کار: پس از جمع آوری گیاه، عصاره اتانولی آن تهیه و بعد از اطمینان از عدم آلودگی میکروبی شیر، تلقیح باکتریایی، کلرید کلسیم، عصاره گیاه قان تپر و نهایتاً آنزیم (قرص مایه پنیر) به شیر انجام شد و ظرف‌های حاوی پنیر به پنج گروه کنترل مثبت و منفی و تیمار تقسیم بندی و از لحاظ افزایش میزان رشد باکتری‌های تلقیحی در طی ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در نمونه حاوی عصاره کاهش تعداد باکتری‌های رشد یافته در تمامی مدت زمان مورد بررسی در مقایسه با نمونه فاقد عصاره مشاهده گردید و بیشترین تأثیر ضد باکتری عصاره در حذف یا ممانعت از رشد باکتری در ۲۴ ساعت اول مشاهده شد ولی به مرور زمان این خاصیت ضد باکتریایی عصاره کاهش پیدا کرده و تعداد باکتری رشد یافته افزایش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: علی رغم اینکه تأثیر ممانعت از رشد باکتریایی عصاره گیاه قان تپر در ۲۴ ساعت اولیه مثبت بوده، ولی مشاهده ناپایداری اثر عصاره در پنیر در مراحل بعدی آزمایش موجب رشد باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی شده و نمی‌تواند به عنوان جایگزین نگهدارنده های شیمیایی بکار رود.

مقدمه

علی رغم پیشرفت‌های مدرن در بخش بهداشت و تکنیک‌های تولید غذا، سلامت غذا اهمیت فزاینده‌ای در سلامت عمومی ایفا می‌کند [۱]. سلامت و ایمنی مواد غذایی نگرانی اساسی مصرف کننده و صنایع غذایی می‌باشد به ویژه که عفونت‌های ناشی از غذا روند رو به افزایشی

www.SID.ir

Archive of SID

را نشان می‌دهند [۲]. گزارشات متعددی در مورد آلودگی غذاهایی مانند شیر، پنیر، بستنی و فرآورده‌های مختلف آنها وجود دارد، که نشان دهندهٔ نقش اساسی شیر خام در شیوع این آلودگی به خصوص در پنیر را دارد [۳]. در سالهای اخیر تولید کنند گان مواد غذایی توجه زیادی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی با منشأ گیاهی به جای نگهدارنده های شیمیایی در محصولات خود نموده‌اند. این امر از یک سو به علت تمایل زیاد مصرف کنندگان به استفاده از مواد غذایی فرآوری شده بدون نگهدارنده یا حتی المقدور با نگهدارنده های طبیعی و از طرف دیگر توجه هر چه بیشتر متولیان بهداشتی به این موضوع می‌باشد [۴, ۵]. در واقع نیاز جدی به جایگزین‌های سالم و مؤثر برای تیمارها و نگهدارنده های شیمیایی است. در این زمینه تمایل ویژه‌ای بر روی کاربردهای بالقوه اسانس‌های گیاهی متمرکز شده و خصوصیات ضدمیکربی اسانس‌های گیاهی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، شامل باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها تأیید شده است. لذا امروزه با توجه به عوارض جانبی نگهدارنده های شیمیایی، محققان توجه خاصی به استفاده مجدد از گیاهان دارویی و تحقیق در این زمینه از خود نشان داده‌اند که در این میان خاصیت طعم دهندگی برخی از این ترکیبات گیاهی نیز با استقبال مصرف کنندگان مواجه شده است و هر روزه اطلاعات جدید و نتایج سودمندی را در این زمینه به جامعه بشری عرضه می‌دارند که در پیشگیری و یا درمان بیماری‌ها کاربرد دارند. گونه‌های میکروبی زیادی از جمله استافیلوکوکوس ها، سالمونلاها، اشریشیاکلی ها مولد فساد در فراورده‌های غذایی می‌باشند. لیستریا مونوسیتوژنز نوعی باکتری است که در سه دهه اخیر انتقال آن به وسیله غذا کاملاً اثبات شده است و با توجه به مرگ و میر ناشی از آن به خصوص در بین نوزادان و افراد مسن و ضایعاتی که بر جا می‌گذارد به عنوان یک خطر جدی تلقی می‌شود .به هر حال پس از چندین همه‌گیری ناشی از غذا و مرگ‌های متعدد به وسیله این پاتوژن در ایالات متحده و دیگر کشورها، بسیاری بر این باورند که لیستریا مونوسیتوژنز حقیقتاً یک میکروارگانیسم موذی است. پنیر آلوده به این باکتری عامل اصلی چندین همه‌گیری در ایالات متحده و کشورهای اروپایی از جمله سوئیس، کانادا و آلمان شناخته شده که اکثر این پنیرها از نوع نرم یا نیمه نرم بوده است [۶]. اشریشیاکلی یکی از عوامل عمده اسهال است که در اثر مصرف انواع غذاهای آلوده ایجاد می‌گردد و در مطالعه‌ای وجود این میکروارگانیسم در شیر خام و پنیر نشان داده شد [۷]. استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان مهمترین علت یک سوم بیمار یهای مرتبط با غذا در جهان مطرح می‌شود و در طول دهه‌های گذشته استافیلوکوکوس اورئوس عامل ۲۵٪ بیمار یهای مرتبط با غذا در آمریکا بوده است [۸]. غذاهایی که با مسمومیت غذایی استافیلوکوکوس در ارتباط هستند شامل شیر، فرآورده‌های شیری و انواع گوشت هستند [۹]. در این خصوص توجه به کیفیت محصولات لبنی بسیار حائز اهمیت است زیرا این محصولات محیط مناسبی برای رشد و تکثیر استافیلوکوکوس هستند. استفاده از ترکیبات ضد باکتریایی گیاهی، به عنوان راهکاری مناسب در راستای کنترل باکتری‌های بیماریزا و افزایش ماندگاری مواد غذایی مطرح می‌باشد. اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس‌های گیاهی علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی در بسیاری از مطالعه‌ها تأیید شده است [۲].

گیاه قان تپر با نام علمی *Biebersteinia multifida* DC از تیره شمعدانی است که به حالت خودرو در بسیاری اراضی ایران، سوریه، لبنان، ارمنستان، آسیای مرکزی و افغانستان می‌روید و در زبان فارسی تحت عنوان گیاه آدمک یا قان تپر خوانده می‌شود، ریشه این گیاه درشت، سنگین و به رنگ قهوه‌ای روشن یا تیره است. از این گیاه، در طب سنتی برای رفع بیماری‌های روماتیسمی و بهبود دردها و شکستگی‌های استخوانی استفاده می‌شود. اثرات ضد التهاب و ضد درد این گیاه نیز بررسی شده است [۱]. از ریشه و اندام هوایی این گیاه آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و پلی ساکاریدها جدا شده است [۱۰-۱۲]. به دلیل گزارش‌های متعدد در ارتباط با آلودگی پنیر به باکتری‌های *سالمونلا، اشریشیاکلی، لیستریا منوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین ایجاد عفونت در اثر مصرف پنیر آلوده به این باکتریها، در این طرح اثر عصاره اتانولی گیاه قان تپر که به عنوان گیاه دارویی در طب سنتی به صورت خوراکی مصرف می‌شود، بر باکتریهای مذکور در مدل غذایی پنیر مورد بررسی آزمایشگاهی قرار گرفت.

روش کار

ابتدا گیاه مورد نظر از رویشگاههای طبیعی آن در خراسان شمالی جمع آوری شده و سپس عصاره اتانولی ریشه آن به روش خیساندن گرفته شده، عصاره مورد نظر توسط تبخیر کننده دوار تحت خلاء، حذف حلال شده و پس از بسته بندی در ظروف دربسته، جهت ازمایشات بعدی در یخچال نگهداری شد. باکتری‌های مورد نظر از کلکسیون میکروبی ایران تهیه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰-۱۸ ساعت و حداقل ۲ مرتبه به طور متوالی کشت داده می‌شود [۱۳]. پس از کشت دوم به نسبت ۱ به ۵ با گلیسیرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب های اپندروف در ۲۰- درجه سا نتیگراد نگهداری و برای انجام تحقیق به کار گرفته می‌شوند [14]. نظر به اینکه می‌بایست 10^3 باکتری به هر میلی‌لیتر از شیر مصرفی جهت تولید پنیر اضافه شود، لذا به منظور آماده‌سازی میزان تلقیح باکتریایی، ابتدا باکتری‌های نگهداری شده در ۲۰- درجه سا نتی‌گراد در محیط TSB کشت داده شده، این محیط به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و پس از آن یک لوپ از این محیط به یک لوله دیگر حاوی محیط TSB انتقال داده می‌شود. این لوله هم به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته تا یک محیط حاوی باکتری تازه به دست آید. سپس در لوله‌های کووت (Cuvett) استریل حاوی ۵ میلی لیتر برات TSB ابتدا برای بار اول مقادیر مختلفی از کشت ۲۰ ساعته دوم را اضافه نموده، و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر جذب نوری آنها خوانده می‌شود. سپس از لوله‌های کووت اسپکت شده جهت شمارش تعداد باکتری‌ها در پلیت استفاده خواهد شد. تا در نهایت، لوله کووت که دارای 2×10^6 باکتری در هر میلی لیتر بود مشخص گردد. بدین ترتیب در دفعات بعدی انجام آزمایش، در هر بار با مشخص شدن جذب نوری مورد نظر (۱= Absorbant و ۱۰٪= Transmitant) به طور تقریبی مقدار 2×10^6 باکتری در هر میلی لیتر مشخص می‌شود که بعداً با کشت بر روی آگار، شمارش باکتری مورد تأیید نهایی قرار می‌گیرد. از این لوله کووت حاوی مقدار 2×10^6 باکتری در هر میلی لیتر برای تلقیح به شیر مصرفی جهت تولید پنیر استفاده می‌شود و با افزودن ۰/۵ سی‌سی

www.SID.ir

Archive of SID

از این محیط TSB به ظروف حاوی یک لیتر شیر، در هر سی‌سی از شیر مصرفی معادل 10^3 باکتری تلقیح می‌گردند.

جهت تهیه پنیر: ۲۴ ساعت قبل از شروع کار به منظور اطمینان از عدم آلودگی شیر به باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیاکلی*، *سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس* یک مرحله کشت از شیر انجام شد و پس از اطمینان از منفی بودن کشت، در هر مرحله ۵ بشر استریل آماده و در هرکدام یک لیتر شیر ریخته و با استفاده از شعله و دماسنج دما به منظور پاستوریزاسیون به ۷۲±۲ درجه سانتیگراد رسانیده شده و ۱۵ ثانیه در این دما باقی می‌ماند. قبل از شروع انجام مراحل مختلف پنیر سازی دمای شیر را به ۳۵ درجه سانتیگراد رساندیم. سپس میزان تلقیح باکتریایی مورد نظر (10^3 باکتری *اشریشیاکلی*، و *استافیلوکوکوس اورئوس*) به شیر اضافه شد. مقدار ۰/۰۲٪ (وزن به حجم) از کلرید کلسیم که در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد حل شده بود، به طور یکنواخت به شیر اضافه می‌شود و در همین زمان عصاره گیاه قان تپر با غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. نهایتاً آنزیم (قرص مایه پنیر آنزیمکس تهیه شده از شرکت IIEC) به مقدار ۰/۰۰۱٪ (وزن به حجم) پس از حل نمودن آن درآب مقطر استریل به شیر افزوده شده و ظرف‌های حاوی پنیر به شکل زیر نام‌گذاری می‌شوند.

۱- نمونه شماره یک: این بشر حاوی شیر، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، رنت و عصاره گیاه قان تپر.

۲- نمونه شماره دو: این بشر حاوی شیر، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و رنت بوده که از این نمونه در این تحقیق تحت عنوان شاهد فاقد عصاره و حاوی باکتری نام برده شده است.

۳- نمونه شماره سه: این بشر حاوی شیر، باکتری *اشریشیا کلی*، رنت و عصاره گیاه قان تپر.

۴- نمونه شماره چهار: این بشر حاوی شیر، باکتری *اشرشیاکلی* و رنت بوده که از این نمونه در این تحقیق تحت عنوان شاهد فاقد عصاره و حاوی باکتری نام برده شده است.

به منظور کارایی بهتر رنت، دمای شیر در مدت زمان تشکیل لخته در حدود ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از گذشت مدت زمان دو ساعت، لخته تشکیل شده برش داده شده و در یخچال نگهداری گردید. به منظور شمارش *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* آزمایش‌های میکروبی در مراحل زیر انجام می‌گیرد:

ساعت صفر

روز اول (بعد از ۲۴ ساعت)

روز دوم (بعد از ۴۸ ساعت)

روز سوم (بعد از ۷۲ ساعت)

روز ۷

روز ۱۵

روز ۳۰

روز ۶۰

برای کشت در هر بار نمونه برداری، ۱۰ گرم از هر نمونه پنیر تولیدی برداشته، توزین نموده و به وسیله هاون و بوته چینی استریل خرد و با ۹۰ سی‌سی سیترات سدیم استریل مخلوط گردیده و یک سی‌سی از محلول به دست آمده را سه بار در لوله‌های حاوی سیترات سدیم استریل رقت سازی نموده تا غلظت‌های (۰،۰۰۱ و ۰،۰۰۰۱) بدست آید. در مرحله بعد یک سی سی از هر غلظت ساخته شده را در پلیت حاوی بیست سی سی محیط اسکیم میلک آگار مذاب انتقال داده و با حرکت دورانی سبب مخلوط شدن ترکیبات شده و بعد از سفت شدن محیط، محیط‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت و پس از آن کلنی‌ها توسط دستگاه کلنی کانت شمارش شد [۱۵، ۱۶].

آنالیز آماری

نتایج به صورت سه بار تکرار ثبت گردید و برای تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS و آزمون واریانس با اندازه‌های تکراری استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج بدست آمده بیانگر این بود که در دو نمونه شماره اول و دوم که مربوط به اثر عصاره بر روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و شاهدمی باشد، در نمونه حاوی عصاره کاهش تعداد باکتری رشد یافته در تمامی مدت زمان مورد بررسی در مقایسه با نمونه فاقد عصاره مشاهده گردید و بیشترین تأثیر ضد باکتری عصاره در مهار یا ممانعت از رشد باکتری در ۲۴ ساعت اول مشاهده شد، ولی به مرور زمان این خاصیت ضد باکتریایی عصاره کاهش پیدا کرده و تعداد باکتری رشد یافته افزایش پیدا کرد و به حدود هشت برابر در ۴۸ ساعت اولیه رسید که نشانه ناپایداری اثر عصاره در پنیر ساخته شده است. نتیجه بررسی تست در هر دو نمونه در روز ۷ و ۱۵ و ۳۰ و ۶۰ روز هم بیانگر رشد غیرقابل شمارش باکتری در نمونه‌های پنیر بود که می‌توان این طور بیان نمود که هیچ گونه اثری از ماده ممانعت کننده یا مهار کننده رشدی در این نمونه‌ها وجود ندارد و در نمونه حاوی عصاره خاصیت ضدباکتریایی عصاره کاملاً از بین رفته است (جدول ۱ و تصویر ۱).

نتایج آزمون Sphericity Assumed نشان می‌دهد تفاوت معنادار کلی بین چهار مقطع زمانی وجود دارد که با افزایش زمان اندازه گیری، میانگین نیز افزایش یافته است و اثر متقابل (زمان*گروه) کوچک‌تر از ۰،۰۵ است ($P < ۰/۰۰۵$)، بنابراین بسته به اینکه در چه زمانی و در چه گروهی اندازه گیری انجام گرفته است، تفاوت وجود دارد. همانطور که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود مقدار میانگین اندازه گیری شده در گروه دوم در تمامی زمان‌ها بالاتر از گروه اول است و دو گروه در هر چهار اندازه دارای واریانس برابر می‌باشند و تفاوت معناداری بین دو گروه وجود دارد ($P < ۰/۰۰۱$). بررسی نتایج در دو نمونه شماره سوم و چهارم که مربوط به اثر عصاره بر روی باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* و شاهد می‌باشد نشان داد که از لحاظ آماری تفاوت معناداری بین گروه سه و چهار وجود دارد ($P < ۰/۰۰۱$) که در نمونه شاهد تعداد باکتری‌ها به علت عدم حضور ماده ممانعت کننده از رشد، سیر صعودی در تمامی زمان‌ها داشته و در نمونه حاوی عصاره کاهش تعداد باکتری رشد یافته در تمامی مدت زمان مورد بررسی در مقایسه با نمونه فاقد عصاره مشاهده گردید که با نگاه به میانگین‌ها می‌بینیم میانگین گروه چهار به طور معناداری بالاتر از گروه سه است و دو گروه در هر چهار اندازه دارای واریانس برابر می‌باشند (P از ۰/۴۱۲ تا ۰/۶۹۷) و بیشترین تأثیر ضد باکتری نیز بر روی این باکتری همانند باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۲۴ ساعت اول مشاهده گردید، ولی به مرور زمان این خاصیت ضد باکتریایی عصاره ضعیف شده و تعداد باکتری افزایش پیدا

www.SID.ir

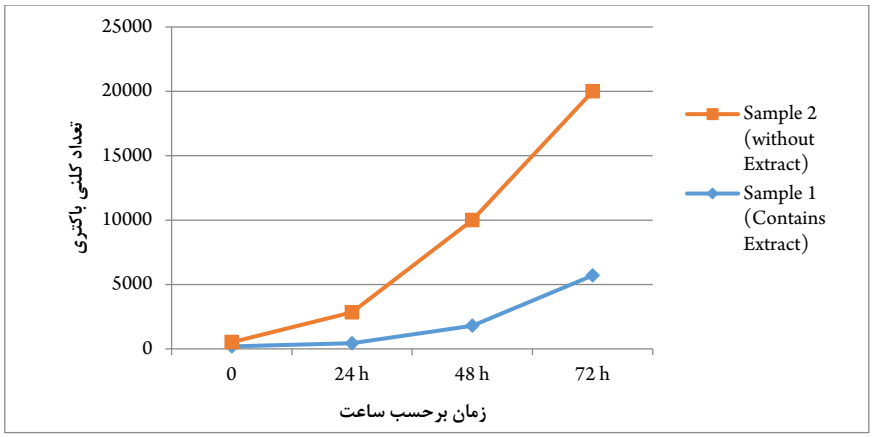
Archive of SID

کرد و به حدود ده برابر در ۴۸ ساعت اولیه رسید که نشانه ناپایداری اثر عصاره در این آزمایش است. در روز ۷، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز هم در دو نمونه شاهد و حاوی عصاره روند رو به رشد زیادی از باکتری *اشرشیاکلی* مشاهده گردید که غیرقابل شمارش بوده و اثر عصاره به احتمال زیاد از بین رفته است (جدول ۱ و تصویر ۲). در این دو گروه نیز اثر متقابل (زمان*گروه) در آزمون Sphericity Assumed کوچکتر از ۰/۰۵ بود ($P < ۰/۰۰۵$). در تمامی نمونه‌ها میزان رشد باکتری‌های مورد آزمایش در غلظت (۰/۰۰۱) در طی مدت زمان مورد بررسی بسیار زیاد و غیرقابل شمارش بوده است.

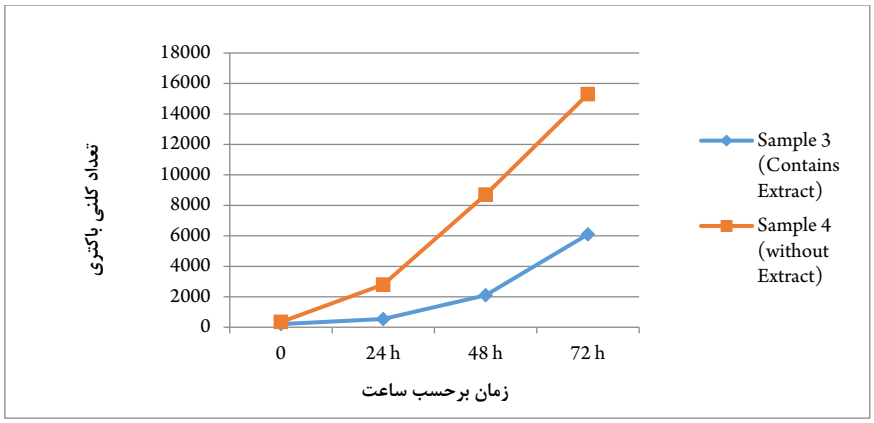
مقایسه دو سویه باکتری نشان می‌دهد که تأثیر ممانعت از رشد عصاره بر روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* بیشتر بوده و به طور کلی عصاره‌ها به طور چشمگیری بر باکتریهای گرم مثبت مؤثرتر از باکتریهای گرم منفی می‌باشند که علت آن احاطه شدن دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی توسط یک غشاء خارجی است که موجب کاهش خروج ترکیبات هیدروفوبی از میان پوشش لیپوپلی ساکاریدی می‌شود که نتایج بدست آمده در این آزمایش هم بیانگر همین مطلب می‌باشد (تصویر ۳).

جدول ۱: مقایسه تعداد کلنی‌ها در نمونه‌های مورد بررسی در طی ۶۰ روز

زمان	تعداد کلنی (غلظت ۰/۰۰۰۱)			
	نمونه شماره یک	نمونه شماره دو	نمونه شماره سه	نمونه شماره چهار
زمان صفر	$۱/۹\times۱۰^{۲}\pm۳/۰۵$	$۳/۳\times۱۰^{۲}\pm۲/۶۴$	$۲/۱\times۱۰^{۲}\pm۲/۶۴$	$۳/۵\times۱۰^{۲}\pm۳/۰۶$
۲۴ ساعت (روز اول)	$۴/۴\times۱۰^{۲}\pm۱/۷۳$	$۲/۴\times۱۰^{۳}\pm۲/۰۸$	$۵/۴\times۱۰^{۲}\pm۳/۲۱$	$۲/۸\times۱۰^{۲}\pm۳/۷۸$
۴۸ ساعت (روز دوم)	$۱/۸\times۱۰^{۳}\pm۳/۰۵$	$۸/۲\times۱۰^{۳}\pm۳/۵۱$	$۲/۱\times۱۰^{۳}\pm۴/۰۴$	$۸/۷\times۱۰^{۳}\pm۳$
۷۲ ساعت (روز سوم)	$۵/۷\times۱۰^{۲}\pm۳/۰۵$	$۱۴/۳\times۱۰^{۳}\pm۳/۲۱$	$۶/۱\times۱۰^{۳}\pm۳/۰۵$	$۱۵/۳\times۱۰^{۳}\pm۳/۰۵$
روز ۷	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	تعداد زیاد و غیر قابل شمارش	تعداد زیاد و غیر قابل شمارش
روز ۱۵	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	تعداد زیاد و غیر قابل شمارش	تعداد زیاد و غیر قابل شمارش
روز ۳۰	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	تعداد زیاد و غیر قابل شمارش	تعداد زیاد و غیر قابل شمارش
روز ۶۰	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	تعداد زیاد و غیر قابل شمارش	تعداد زیاد و غیر قابل شمارش



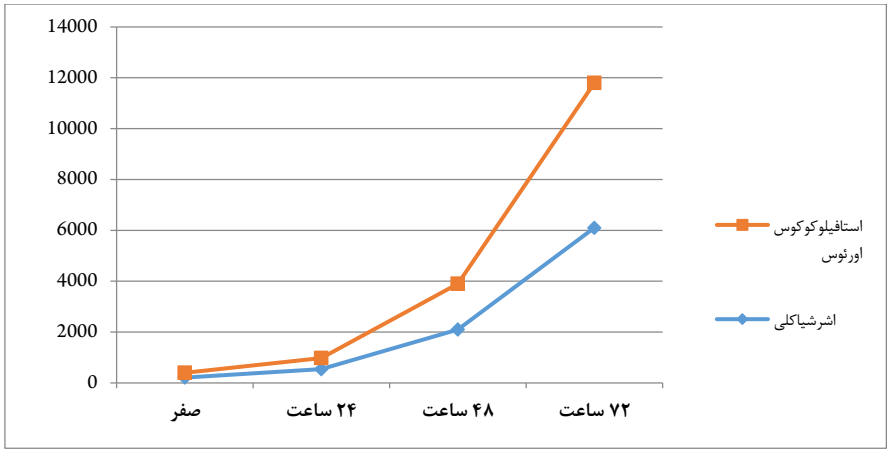
تصویر ۱: مقایسه تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در دو نمونه یک و دو



تصویر ۲: مقایسه تعداد باکتری *اشرشیاکلی* در دو نمونه سه و چهار

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۳: مقایسه تأثیر عصاره بر روی دو باکتری مورد آزمایش

بحث

تحقیقات متعددی به بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های گیاهی مختلف در محیط‌های کشت و در مواردی در مدل‌های غذایی پرداخته‌اند. در مطالعه مشتاقی و همکاران، اثر عصاره متانولی نعناع را در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر نرم که به هر گرم آن 10^6 باکتری اضافه شده بود، در دماهای ۷ و ۱۵ درجه سانتیگراد و در یک دوره ۱۵ روزه بررسی شد. در دمای ۷ درجه سانتیگراد، *لیستریا مونوسیتوزنز* پس از ۱۵ روز در تمام غلظت‌های به کار برده شده، باعث کاهش ۲ و ۳ سیکل لگاریتمی در تعداد شد؛ اما در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد عصاره مذکور با غلظت ۰/۵٪ تنها یک لگاریتم کاهش در تعداد باکتری را نشان داد [۱۵].

در تحقیق ویریندا و همکاران، آثار ضد لیستریایی اسانس میخک در مدل‌های غذایی پنیر و گوشت را در دو دمای ۷ و ۳۰ درجه سانتیگراد بررسی کردند. غلظت ۱ درصد اسانس میخک سبب جلوگیری از رشد *لیستریا مونوسیتژنز* در هر دو دما و هر دو مدل غذایی گردید. بنابراین چنین نتیجه‌گیری شد که اسانس میخک دارای یک اثر بالقوه به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در گوشت و پنیر است [۱۶].

از آنجا که استفاده همزمان اسانس‌های گیاهی و پروبیوتیک ها در مواد غذایی روش جدیدی برای جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن به حساب می‌آید، در مطالعه‌ای اثر اسانس‌های چندین گیاه بر روی باکتری‌های پروبیوتیک مواد غذایی نشان داد که برخی از آنها مانند (پونه، دارچین، سیر، نعناع فلفلی و سویا، زیره و شوید) اثر مثبت و گونه‌های (کرفس کوهی، آویشن شیرازی وکلپوره) دارای اثرات منفی بر روی رشد باکتری‌های پروبیوتیک داشتند [۱۷].

در مطالعه‌ای روی اثر نعناع بر باکتریهای *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریتیدیس* در دو دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتیگراد انجام گرفت طبق این مطالعه رشد سالمونلا در ماده غذایی موردنظر (tzatziki) به جز پاستا مهار شد. *لیستریا مونوسیتوژنز* نیز در تمام طول مدت آزمایش زنده باقی ماندند و کاهش خیلی کمی مشاهده شد [۱۸]. در تحقیق موسوی و همکارانش به بررسی اثر ضدمیکروبی نعناع بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر لیقوان پرداخته شد. در این مطالعه از دو غلظت ۲ و ۰/۵٪ عصاره نعناع در شیر خام میش استفاده شد. نمونه‌برداری پس از ۶۰ روز انجام گرفت و نتایج نشان داد که عصاره نعناع در تمامی غلظتها در برابر لیستریا مؤثر است و تغییر معناداری بین غلظت‌های عصاره وجود ندارد [۱۹]. طباطبائی یزدی و همکاران تحقیقی در رابطه با اثر عصاره گیاهان تیره نعناع (آویشن، نعناع و کاکوتی)در جلوگیری از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ژئوتریکوم کاندیدوم* در نمونه‌های دوغ صنعتی استان خراسان رضوی با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند .مقایسه نتایج اثر عصاره در جلوگیری از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ژئوتریکوم کاندیدوم* در نمونه‌های دوغ مشخص کرد که عصاره گیاهان تیره نعناع به میزان بیشتری بر کاهش جمعیت استافیلوکوکوس تأثیر داشت [۲۰].

در مطالعه دیگری به بررسی اثر ضد باکتریایی گیاه چوچاق پرداخته شد .با توجه به نتایج به دست آمده از ارزیابی اثر ضدباکتریایی عصاره الکلی گیاه چوچاق بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر سویا در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد می‌توان نتیجه گرفت که عصاره الکلی چوچاق دارای اثر ضد باکتریایی روی باکتری مورد آزمایش بود که این اثر در غلظت ۱۰ درصد عصاره مورد بررسی بیشتر از غلظت 5 درصد عصاره بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی داری داشت [۲۱].

در مطالعات فیتوشیمی بر روی گیاه قان تپر نیز گزارش گردید که ریشه گیاه بیشترین ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی اکسیدانی را نسبت به سایر اندامها از خود نشان داده است [۲۲].

در مطالعه ضد باکتریایی قدرتی و همکاران نشان داد که از بین عصاره‌های مختلف (هگزانی، دی کلرومتانی و اتانولی) ریشه گیاه آدمک، عصاره اتانلی بیشترین اثر را بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلستریدیوم پرفرنژنس* داشته است. کمترین غلظت مهار کنندگی برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر ۰/۷۸۱ میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین غلظت کشندگی ۳/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش گردید [۲۳].

علت حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به ترکیبات آنتی باکتریایی، ممکن است ناشی از وجود تفاوت در دیواره سلولی آن‌ها با این دیواره در باکتری‌های گرم منفی باشد، به این صورت که باکتری‌های گرم مثبت در دیواره خود تنها یک لایه دارند، در حالی که در باکتری‌های گرم منفی این دیواره از چند لایه تشکیل شده که نسبت به نفوذ مواد خارجی از خود مقاومت نشان می‌دهند [۲۴].

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

علی رغم اینکه تأثیر ممانعت از رشد باکتریایی عصاره گیاه قان تپر در ۲۴ ساعت اولیه مثبت بوده، ولی مشاهده ناپایداری اثر عصاره در پنیر در مراحل بعدی آزمایش، موجب رشد باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی شده لذا مطالعه بر روی سایر حلال‌ها و ترکیب با سایر گیاهان به عنوان نگهدارنده طبیعی مواد غذایی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی بخاطر تصویب این طرح با کد ۹۶/پ/۹۶۱ و تأمین منابع مالی آن برای اجرا و همچنین از مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی که ما را در اجرای این طرح یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Khakpour S, Akhlaghdoust M, Naimi S, Mohammad S, Mirlohi J, Abedian M, et al. Effect of Biebersteinia Multifida DC. Root Extract on Cholesterol in Mice. Zahedan J Res Med Sci. 2013;15(11):49-51.
2. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. Int J Food Microbiol. 2004;94(3):223-53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022 pmid: 15246235
3. Razavilar V. Pathogenic Microorganisms in Foods and Epidemiology of Foodborne Intoxications. 3rd ed. Tehran Tehran University Publications; 2008.
4. Delaquis P. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. Int J Food Microbiol. 2002;74(1-2):101-9. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00734-6
5. Tassou C, Koutsoumanis K, Nychas GJE. Inhibition of Salmonella enteritidis and Staphylococcus aureus in nutrient broth by mint essential oil. Food Res Int. 2000;33(3-4):273-80. doi: 10.1016/s0963-9969(00)00047-8
6. Monerro J. Modern Food Microbiology. 6th ed. Mashhad Mashhad University Publication; 2003.
7. Ingham SC, Su Y-C, Spangenberg DS. Survival of Salmonella typhimurium and Escherichia coli O157:H7 in cheese brines. Int J Food Microbiol. 2000;61(1):73-9. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00331-7
8. Zhang S, Iandolo JJ, Stewart GC. The enterotoxin D plasmid of Staphylococcus aureus encodes a second enterotoxin determinant (sej). FEMS Microbiol Lett. 1998;168(2):227-33. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13278.x pmid: 9835033
9. Boerema JA, Clemens R, Brightwell G. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of Staphylococcus aureus. Int J Food Microbiol. 2006;107(2):192-201. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.008 pmid: 16310270
10. Arifkhodzhaev AO, Rakhimov DA. Polysaccharides of saponin-bearing plants. IV. Structure of glucans A, B, and C of Biebersteinia multifida. Chem Nat Compounds. 1993;29(2):151-3. doi: 10.1007/bf00630103
11. Kurbanov D, Zharekeev BK. Investigation of the alkaloids of Biebersteinia multifida and Peganum harmala from Karakalpakia. Chem Nat Compounds. 1974;10(5):715-. doi: 10.1007/bf00567903
12. Omurkamzinova VB, Maurel ND, Bikbulatova TN. Flavonoids of Biebersteinia multifida. Chem Nat Compounds. 1991;27(5):636-7. doi: 10.1007/bf00630376
13. Farsam H, Amanlou M, Reza Dehpour A, Jahaniani F. Anti-inflammatory and analgesic activity of Biebersteinia multifida DC. root extract. J Ethnopharmacol. 2000;71(3):443-7. doi: 10.1016/s0378-8741(00)00174-4 pmid: 10940581
14. Moosavy MH, Basti AA, Misaghi A, Karim G, Zahraei Salehi T, Mostafavi E. Effect of Nisin on the growth of Staphylococcus aureus in Commercial Barley Soup. Pharmac Sci. 2009;15(3):235-40.
15. Raeisi M, Tajik H, Razavi R, Maham M, Moradi M, Hajimohammadi B, et al. Essential oil of tarragon (Artemisia dracunculus) antibacterial activity on Staphylococcus aureus and Escherichia coli in culture media and Iranian white cheese. Iran J Microbiol. 2012;4(1):30-4.
16. Hassanien MF, Mahgoub SA, El-Zahar KM. Soft cheese supplemented with black cumin oil: Impact on food borne pathogens and quality during storage. Saudi J Biol Sci. 2014;21(3):280-8. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.10.005 pmid: 24955014
17. Rasouli M, Mahmoudi R, Kazeminia M. [A Review on the Effect of Medicinal Plant Essences on the Performance of Probiotic Bacteria]. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016;26(144):411-23.
18. Tassou CC, Drosinos EH, Nychas GJ. Effects of essential oil from mint (Mentha piperita) on Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 4 degrees and 10 degrees C. J Appl Bacteriol. 1995;78(6):593-600. pmid: 7615414
19. Moosavy M-H, Esmaeili S, Mostafavi E. Antibacterial Effect ofMentha spicataEssential Oil onListeria monocytogenesin Traditional Lighvan Cheese. J Food Safety. 2013;33(4):509-14. doi: 10.1111/jfs.12083
20. Tabataba i Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi SA. Investigation Effects of Lamiaceae plants (Thymus vulgaris L., Mentha spp. and Ziziphora tenuir L.) Inhibitory Staphylococcus aureus and Geotrichum candidium in Razavi Khorasan Province Industrial Doogh Samples with Response Surface Method (RSM). Food Sci Technol. 2016;13(51):15-28.
21. Amini F, Moshtaghi H, Abbasvali M. Antibacterial effect of methanolic extract of Eryngium Caeruleum and Mentha Spicata on Staphylococcus aureus in a food model at 15°C. J Food Microbiol. 2016;3(3):25-36.
22. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Nabavi S, Eslami B. Antihemolytic and antioxidant activities of Allium paradoxum. Open Life Sci. 2010;5(3). doi: 10.2478/s11535-010-0013-5
23. Ghodrati N, Asili J, Mohammadi Sani A, Fazli Bazzaz BS. Evaluation of antibacterial activities of different roots extracts of Biebersteinia multifida DC. J North Khorasan Univ Med Sci. 2013;4(5):149-54. doi: 10.29252/jnkums.4.5.S5.149
24. Palombo EA, Semple SJ. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2001;77(2-3):151-7. doi: 10.1016/s0378-8741(01)00290-2 pmid: 11535358

www.SID.ir