دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2018.114902.2097
جلد ۳۴، شماره ۳، صفحه ۴۰۰-۳۹۱ (۱۳۹۷)

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

مجتبی بنیادیان[1*]، تارا روزخوش[2] و حمداله مشتاقی[3]

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 دریافت: مرداد ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: فروردین ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۷

چکیده

لیستریا مونوسیتوژنز به‌عنوان یکی از باکتری‌های منتقله از مواد غذایی به‌ویژه محصولات لبنی شناخته می‌شود. تقاضا برای جایگزینی نگهدارنده‌های شیمیایی با ترکیب‌های طبیعی افزایش یافته است. این مطالعه به‌منظور بررسی تأثیر عصاره اتانولی و آبی گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba* DC.) روی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به روش تهیه رقّت لوله‌ای در محیط کشت مایع و شیر، طراحی و اجرا شد. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) از روش استاندارد میکرودایلوش (Microdilution) استفاده شد و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) با استفاده از کشت روی محیط جامد تعیین شد. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی به‌ترتیب ۵۰ و ۷۰mg/ml و حداقل غلظت باکتری‌کشی برای این عصاره‌ها به‌ترتیب ۷۰ و ۱۰۰mg/ml بدست آمد. براساس نتایج بدست آمده، هر دو عصاره آبی و اتانولی اثر ضد لیستریایی قابل قبولی در شیر از خود نشان دادند، به‌نحوی 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 ($P<۰/۰۵$). 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 ($P<۰/۰۵$). 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 مونوسیتوژنز*، عصاره، خوشاریزه (*Echinophora platyloba* DC.)، شیر.

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز باسیل کوتاه، گرم مثبت، بدون اسپور، هوازی اختیاری، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و سرماگرا می‌باشد (Mehdizadeh *et al*., 2010). *لیستریا مونوسیتوژنز*، در محیط به طور وسیع پراکنده است و توانایی 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 مونوسیتوژنز قادر به رقابت با باکتری های دیگر نیست، از این‌رو در محیط‌هایی که رقیب کم باشد مانند دمای یخچال بهتر رشد می‌کند (Marth & Steele, 2001؛ Montville & Matthews, 2005). این باکتری به‌طور 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 (Tajbakhsh, 1998؛ Cother *et al.*, 2001).

لیستریا مونوسیتوژنز در تعداد زیادی از غذاهای فرآوری شده و خام، محصولات گوشتی مانند سوسیس، گوشت گاو و محصولات تازه مثل تربچه و همچنین در محصولات ماهی، غذاهای دریایی، تخم‌مرغ، میوه، فرآورده های 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 مونوسیتوژنز* 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 اعضاء، بیماری کبدی، نارسایی کلیه، دیابت و در برخی موارد همراه با AIDS (سندرم نقص ایمنی اکتسابی) بوده‌اند (Shayanfar & Jalilvand, 2004) تمایل *لیستریا مونوسیتوژنز* 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 مونوسیتوژنز در زنان باردار معمولاً باعث بیماری باکتریمی (Bacteremea) مشابه آنفلوانزا می‌شود که اگر درمان نشود، می‌تواند به التهاب جفت و یا پرده آمنیوتیکو عفونت جنین و در نهایت سقط، به دنیا آمدن نوزاد مرده و یا منجر به تولد زودهنگام شود (Orndorff *et al.*, 2006). استفاده از نگهدارنده‌هایی که قادر باشند رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* 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 ضدمیکروبی 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، تیغ توراغ، 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 ضدمیکروبی و ضدسرطانی آن اخیراً نشان داده شده‌است (Glamoclija *et al.*, 2011؛ Hashemi *et al.*, 2009). این گیاه همچنین دارای اثر محافظتی از کبد در برابر سمّیت حاصل از استامینوفن است (Heidarian *et al.*, 2014). ترکیب های گیاه خوشاریزه براساس نتایج بدست آمده از مطالعات Sharafati-chaleshtori و همکاران (۲۰۱۲) شامل ترکیب های 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 مونوسیتوژنز* در محیط کشت و شیر، طراحی و اجرا شد.

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 پودر گردید.

استخراج عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه خوشاریزه

برای تهیه عصاره های آبی و اتانولی، ۵۰ گرم از پودر خوشاریزه به همراه ۴۵۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر برای تولید عصاره آبی و همین میزان پودر (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 سانتی گراد (برای حفظ شرایط مناسب ازجمله محیط خشک و خنک) نگهداری شد.

آماده‌سازی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* برای تلقیح

سویه استاندارد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز، 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 سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شد. سری رقّت تا ۶-۱۰ از سوسپانسیون باکتری بعد از گرمخانه‌گذاری تهیه گردید. رقّت های ۴، ۵ و ۶ در پلیت کشت سطحی داده شد و برای مدت زمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شد. تعداد کلنی‌های پلیت مناسب (پلیت حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی) شمارش گردید و تعداد لیستریا مونوسیتوژنز 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 مونوسیتوژنز* به تعداد 10^5cfu/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 قرارداده شد. سپس پلیت‌ها برای مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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

به‌عنوان MIC و غلظت‌های بعد از آن، ۲۰ میکرولیتر به پلیت‌های حاوی محیط کشت PCA (مرک، آلمان) منتقل گردید و کشت سطحی انجام شد. تمامی پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و بعد، از نظر رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. پلیت فاقد کلنی به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد.

بررسی اثر ضد لیستریایی عصاره‌های آبی و اتانولی در شیر

از عصاره‌های آبی و اتانولی، غلظت برابر MIC و سه غلظت بالاتر از آن به لوله‌ها منتقل شد و توسط شیر استریلیزه به حجم ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. در هر یک از لوله‌ها، از کشت ۲۴ ساعته باکتری تلقیح شد، به‌نحوی که در هر میلی‌لیتر محیط 10^5 باکتری موجود باشد. برای هر غلظت از عصاره‌های آبی و اتانولی سه تکرار قرار داده شد. یک لوله حاوی شیر بدون عصاره و حاوی باکتری به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. لوله‌ها در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از آنها نمونه‌برداری و پس از تهیه رقّت و کشت بر روی محیط TSA (مرک، آلمان) و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت تعداد کلنی‌ها شمارش شد. تمام این مراحل برای شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد نیز تکرار شد ولی نمونه‌برداری و شمارش باکتری در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت انجام گردید.

تجزیه‌وتحلیل آماری

داده‌های بدست آمده از شمارش پرگنه‌ها، توسط نرم‌افزار آماری Sigma Stat 4 با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تکمیلی Tukey مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت و اختلاف بین گروه‌ها در سطح آماری $P<۰/۰۵$ ارزیابی شد.

نتایج

نتایج مطالعه بیانگر این بود که عصاره های آبی و اتانولی خوشاریزه، باعث کنترل رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* هم در محیط کشت و هم در محیط شیر می‌شوند. براساس نتایج بدست آمده، حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) برای عصاره آبی و الکلی به‌ترتیب ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل میزان کشندگی (MBC) به‌ترتیب ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

میانگین تعداد کلنی‌های باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (cfu/ml) در غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و اتانولی، در محیط شیر استریلیزه، در دو دمای متفاوت در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده‌است. براساس نتایج بدست آمده، جمعیت باکتریایی در گروه کنترل نسبت به تیمارهای حاوی عصاره آبی و اتانولی، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ۷۲ ساعت، اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P<۰/۰۵$).

همین نتایج برای دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نیز پس از گذشت ۲۴ ساعت، بین گروه کنترل و تیمارهای حاوی عصاره (اتانولی و آبی) مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). با توجه به داده‌های جدول ۱، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، پس از ۷۲ ساعت بین عصاره‌های آبی با غلظت ۵٪ و ۸٪ و همچنین غلظت‌های ۶٪ و ۸٪ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). اما بین غلظت‌های ۷٪ و ۸٪ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، بین عصاره‌های آبی با غلظت‌های ۵٪ و ۶٪ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$) ولی بین سایر غلظت‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری بود ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱- میانگین تعداد کلنی‌های باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (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	$۴/۸\times۱۰^{۶}\pm۷\times۱۰^{۵}$a	$۱/۶۶\times۱۰^{۸}\pm۵\times۱۰^{۶}$a
٪۵	$۱/۰۶\times۱۰^{۴}\pm۵\times۱۰^{۲}$b	$۱/۵۳\times۱۰^{۵}\pm۵\times۱۰^{۳}$b
٪۶	$۷/۴۶\times۱۰^{۳}\pm۹\times۱۰^{۲}$b	$۱/۱۳\times۱۰^{۵}\pm۵\times۱۰^{۳}$b
٪۷	$۱/۲۶\times۱۰^{۳}\pm۲\times۱۰^{۲}$bc	$۲/۰۳\times۱۰^{۴}\pm۱\times۱۰^{۳}$c
٪۸	$۱/۶۳\times۱۰^{۲}\pm۲\times۱۰$c	$۱/۰۱\times۱۰^{۳}\pm۱\times۱۰^{۲}$d

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<۰/۰۵$ می‌باشد.

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 ($P>۰/۰۵$) و بین غلظت‌های ۸٪ و ۹٪ نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۲- میانگین تعداد کلنی‌های باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (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	$۴/۸\times۱۰^{۶}\pm۷\times۱۰^{۵}$a	$۱/۶۶\times۱۰^{۸}\pm۵\times۱۰^{۶}$a
٪۷	$۷/۳۳\times۱۰^{۳}\pm۵\times۱۰^{۲}$b	$۱/۱۳\times۱۰^{۴}\pm۱\times۱۰^{۳}$b
٪۸	$۲/۶\times۱۰^{۳}\pm۵\times۱۰^{۲}$bc	$۷/۷\times۱۰^{۳}\pm۸\times۱۰^{۲}$c
٪۹	$۱/۵۶\times۱۰^{۳}\pm۴\times۱۰^{۲}$c	$۳/۶۵\times۱۰^{۳}\pm۴\times۱۰^{۳}$c
٪۱۰	$۸\times۱۰^{۲}\pm۱۰^{۲}$d	$۱/۶\times۱۰^{۲}\pm۴\times۱۰$d

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<۰/۰۵$ می‌باشد.

میانگین تعداد کلنی‌های باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (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 معنی داری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). عصاره آبی با غلظت ۷٪ در ۴ درجه سانتی گراد از عصاره اتانولی با همین غلظت، در کنترل رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* قوی‌تر عمل می‌کند. همچنین عصاره آبی با غلظت ۸٪ در دمای ۴ درجه سانتی گراد، 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 سانتی گراد اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$)، (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین تعداد کلنی‌های باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (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	۱/۲۶×۱۰^۳±۲×۱۰^۲a	۱/۶۳×۱۰^۲±۲×۱۰a	۲/۰۳×۱۰^۴±۱×۱۰^۳a	۱/۰۱×۱۰^۳±۱×۱۰^۲a
اتانولی	۷/۳۳×۱۰^۳±۵×۱۰^۲b	۲/۶×۱۰^۳±۵×۱۰^۲b	۱/۱۳×۱۰^۴±۱×۱۰^۳a	۷/۷×۱۰^۳±۸×۱۰^۲a

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<۰/۰۵$ می‌باشد.

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 سانتی گراد اختلاف معنی داری با یکدیگر داشتند ($P<۰/۰۵$). نتایج نشان‌دهنده این بود که عصاره آبی در شرایط دمایی ۴ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۷۲ ساعت، نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۲۴ ساعت، تأثیر قوی‌تری در کاهش رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* از خود نشان می‌دهد (جدول‌های ۴ و ۵).

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

گروه	دمای ۴ درجه سانتی‌گراد	دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد
شاهد	۴/۸×۱۰^۶±۷×۱۰^۵a	۱/۶۶×۱۰^۸±۵×۱۰^۶b
٪۵	۱/۰۶×۱۰^۴±۵×۱۰^۲a	۱/۵۳×۱۰^۵±۵×۱۰^۳b
٪۶	۷/۴۶×۱۰^۳±۹×۱۰^۲a	۱/۱۳×۱۰^۵±۵×۱۰^۳b
٪۷	۱/۲۶×۱۰^۳±۲×۱۰^۲a	۲/۰۳×۱۰^۴±۱×۱۰^۳b
٪۸	۱/۶۳×۱۰^۲±۲×۱۰a	۱/۰۱×۱۰^۳±۱×۱۰^۲b

حروف غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<۰/۰۵$ می‌باشد.

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

گروه	دمای ۴ درجه سانتی‌گراد	دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد
شاهد	۴/۸×۱۰^۶±۷×۱۰^۵a	۱/۶۶×۱۰^۸±۵×۱۰^۶b
٪۷	۷/۳۳×۱۰^۳±۵×۱۰^۲a	۱/۱۳×۱۰^۴±۱×۱۰^۳a
٪۸	۲/۶×۱۰^۳±۵×۱۰^۲a	۷/۷×۱۰^۳±۸×۱۰^۲a
٪۹	۱/۵۶×۱۰^۳±۴×۱۰^۲a	۳/۶۵×۱۰^۳±۴×۱۰^۳a
٪۱۰	۸×۱۰^۲±۱۰^۲a	۱/۶×۱۰^۲±۴×۱۰a

حروف غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<۰/۰۵$ می‌باشد.

بحث

براساس نتایج این مطالعه، هر دو عصاره آبی و اتانولی گیاه خوشاریزه، اثر ضد لیستریایی قابل قبولی از خود نشان دادند. براساس 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 ضدمیکروبی 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 میکرودایلوشن، 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 به‌مراتب 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 ضدمیکروبی عصاره آبی سماق تأثیر فزاینده‌ای داشت، به گونه‌ای که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد خاصیت ضدمیکروبی 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 باکتری های 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 و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهش خود در بررسی اثر ضدلیستریایی عصاره‌های چند گونه گیاهی ازجمله جَفت، 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 ضدمیکروبی 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 باکتری های 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 منوسیتوژنز* ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد. نتایج این مطالعه نشان داد که از میان باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش *لیستریا منوسیتوژنز* بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره کاکوتی دارد.

براساس نتایج مطالعات Noudoost و همکاران (۲۰۱۶)، عصاره چای سبز آزاد بر روی همه باکتری های مورد آزمایش نقش بازدارندگی از خود نشان داد. بیشترین و 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

همچنین درصد بالاتر ترکیب‌های فنولیک موجود در عصاره آبی خوشاریزه، نتایج بدست آمده قابل قبول به‌نظر می‌رسد. گیاه خوشاریزه علاوه‌بر ایجاد طعم در فرآورده‌های لبنی مانند پنیر، ماست و دوغ، قادر است رشد باکتری های *لیستریا مونوسیتوژنز* را نیز مهار نماید. از این‌رو می‌توان پیشنهاد کرد که از این گیاه و ترکیب های 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.
- 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 factorsin 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 *Escherchia 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.

- 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 *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 pathogenes. Journal of Food Hygiene, 4: 27-36.

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

M. Boniadian[1*], T. Rouzkhosh[2] and H. Moshtaghi[3]

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 4ºC and 25ºC 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 4ºC than that of 25ºC in the same concentration ($P<0.05$).

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