علمی پژوهشی

فعالیت ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی برگ کاردین بر *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا اینترتیدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا*

عارفه کردجزی[۱و۲]، رضا فرهمندفر[۳*]

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی خزر، محمود آباد، ایران
۲- گروه فرآوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۲۱)

چکیده

در سال‌های اخیر، مقاومت برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به علت بی‌توجهی و استفاده نامناسب از داروهای تجاری ضدمیکروبی افزایش یافته است. این موضوع دانشمندان را مجبور ساخته تا به جستجوی مواد جدید از منابع مختلف مانند گیاهان دارویی به عنوان منابع مناسب از مواد شیمیایی ضدمیکروبی بپردازند. در این تحقیق، اثر ضدباکتریایی عصاره کاردین بررسی گردید. عصاره هیدروالکلی برگ‌های این گیاه با غلظت‌های ۰/۳۹۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و اثر ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن و انتشار چاهک روی سویه‌های لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا مورد آزمون قرار گرفت. حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره کاردین با روش رقت‌سازی بررسی شد. در روش‌های دیسک و چاهک، بیشترین میزان تأثیر عصاره بر باکتری‌های مورد آزمون در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و با تشکیل بیشترین قطر هاله بازدارندگی مشاهده شد. البته این اثر بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی مشهود بود. میزان MIC عصاره روی لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب معادل ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و میزان MBC به ترتیب معادل ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد که تأثیر عصاره کاردین روی باکتری‌های گرم مثبت بیش از گرم منفی بود و قطر هاله‌های عدم رشد با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت.

کلید واژگان: اثر ضدباکتریایی، عصاره کاردین، حداقل غلظت مهار کنندگی، حداقل غلظت باکتری کشی، دیسک دیفیوژن

*مسئول مکاتبات: r.farahmandfar@sanru.ac.ir

۱- مقدمه

در طی سال‌ها، طبیعت منبع مواد دارویی مختلف بوده است، لذا تعداد قابل توجهی از داروهای مدرن از منابع طبیعی جدا شده‌اند [۱]. گیاهان مورد استفاده در طب سنتی، دارای طیف وسیعی از مواد هستند که می‌توانند برای درمان بیماری‌های مزمن و عفونی مورد استفاده قرار گیرند. میکروبیولوژیست‌ها علاقه زیادی به غربالگری گیاهان دارویی برای فعالیت‌های ضدمیکروبی و فیتوکمیکال‌ها به عنوان درمان‌های بالقوه جدید دارند. پس از سال ۱۹۹۰ و زمانی که مردم متوجه شدند که طول عمر آنتی‌بیوتیک‌ها محدود است و تجویز بیش از حد و سوء استفاده از آنتی‌بیوتیک-های سنتی سبب ایجاد مقاومت میکروبی می‌شود، استفاده از عصاره‌های گیاهی برای درمان‌های پزشکی از محبوبیت زیادی برخوردار گردید [۲].

کاردین (*Biarum bovei*) گیاهی برگ پهن است که در کوه-های استان فارس می‌روید. از مصارف محلی آن می توان به غذای آش کارده اشاره کرد. آش کارده، سوپ سرد افراد سرما خورده نیز هست که معتقدند جلوی عفونت را می گیرد. از اهمیت دارویی این گیاه می‌توان به درمان بیماری‌هایی چون چربی خون، فشار خون، عفونت، دیابت و یرقان اشاره کرد [۳]. فرهمندفر و کردجزی (۱۳۹۷) اثر ضد میکروبی عصاره کاردین در محیط کشت آزمایشگاهی و محیط غذایی همبرگر بر باکتری-های اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس را مورد بررسی قرار دادند. آنها نشان دادند که MIC عصاره برای اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب معادل ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MBC به ترتیب معادل ۵۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در روش انتشار در آگار، با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله‌های عدم رشد افزایش یافت. در منحنی زمان-کشندگی، با افزایش غلظت عصاره، تعداد باکتری‌ها روند نزولی به خود گرفت. پس از تیمار نمونه‌های همبرگر با غلظت‌های مختلف عصاره، مشخص شد که با افزایش غلظت عصاره و زمان انبارداری اثر ضد میکروبی آن افزایش می‌یابد. لذا بیان کردند که به منظور بهبود ماندگاری، عصاره کاردین به عنوان یک ماده ضد میکروبی طبیعی می‌تواند جایگزین مواد مصنوعی گردد [٤].

لیستریا مونوسیتوژنز عامل بیماری‌زا در مواد غذایی است که می-تواند موجب لیستریوزیس با علائمی مانند تهوع، استفراغ و اسهال شود. عفونت می‌تواند به سپتی سمی، منتژیت، آنسفالیت و عفونت داخل رحمی و یا گردن رحم در زنان باردار منجر شود لذا ممکن است باعث سقط جنین و یا تولد زود هنگام گردد [٥و٦]. سالمونلا اینترتیدیس یکی دیگر از پاتوژن‌های شایع است که می‌تواند منجر به تب، اسهال، استفراغ و دردهای شکمی شود [٦]. سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و میله ای شکل است که در افراد دارای نقص ایمنی و سوختگی به عنوان یک باکتری بیماریزای فرصت طلب عمل می کند و به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های معمول مقاوم است [۷]. با توجه به غنی بودن ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی در برگ کاردین و بومی بودن این گیاه در ایران، هدف از این تحقیق، بررسی اثرات ضدمیکروبی برگ گیاه کاردین بر لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

برگ‌های تازه گیاه کاردین از شهر شیراز جمع آوری و در مکانی به دور از آفتاب خشک شد. برگ‌های خشک شده با آسیاب برقی پودر گردید. از دستگاه اولتراسوند با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز برای استخراج عصاره استفاده شد. یک گرم برگ کاردین پودرشده توسط ۱۰ میلی‌لیتر از حلال (اتانول ۵۰ درصد) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به کمک اولتراسوند عصاره گیری شد. برای حذف تفاله و مواد غیرمحلول، عصاره با کاغذ واتمن شماره یک صاف گردید. بعد از این مرحله، عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵ درجه سلسیوس در g ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس عصاره حاصل در دمای کمتر از ٤٠ درجه سلسیوس و در شرایط خلاء تا مرز خشکی تبخیر گردید. پودر بدست آمده از فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و در نهایت در ظروف شیشه ای استریل تیره در یخچال قرار داده شد [۸].

سوش‌های باکتریایی شامل لیستریا مونوسیتوژنز[1] (ATCC 19115)، سالمونلا اینترتیدیس[2] (CMCC 50041) و سودوموناس آئروژینوزا[3] (ATCC 9027) بوده که به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. کشت باکتری‌ها به مدت یک شبانه روز در محیط

1. *Listeria monocytogenes*
2. *Salmonella enteritidis*
3. *Pseudomonas aeruginosa*

نوترینت آگار انجام شد. سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری را داخل لوله دربدار استریل حاوی نوترینت براث ریخته و کدورت آن با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول نیم مک فارلند، با نوترینت براث رقیق و سوسپانسیون باکتریایی با غلظت $1/5 \times 10^8$ CFU/ml تهیه گردید.

در آزمون دیسک دیفیوژن، دیسک‌ها (شرکت پادتن طب، ایران) با قطر ۶/۴ میلی‌متر از هر غلظت عصاره اشباع شدند. دیسک‌ها را به مدت ۱ ساعت روی صفحه مشبک سترون قرار داده تا عصاره به طور کامل جذب دیسک شود. در هر سری آزمایش یک دیسک حاوی آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی بکار برده شد. جهت مقایسه هاله‌های عدم رشد از آنتی بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم در دیسک) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. در این آزمایش، پس از ریختن محیط کشت مولر هینتون آگار[4] درون پلیت و بسته شدن آن، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (دارای $1/5 \times 10^8$ CFU بر میلی‌لیتر باکتری) را روی محیط کشت ریخته و با سوآب در تمام نقاط آن پخش گردید. سپس دیسک‌های تهیه شده از عصاره‌ها با غلظت‌های مختلف، در فاصله مناسب از یکدیگر کاشته و برای مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس دیجیتال اندازه گیری و میانگین مربوطه گزارش گردید [۴].

در آزمون چاهک، بعد از ریختن محیط کشت درون پلیت و بسته شدن آن، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (دارای $1/5 \times 10^8$ CFU/ml) روی محیط کشت ریخته و با سوآب در تمام نقاط محیط کشت پخش شد. سپس چاهک‌هایی با قطری معادل دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (۶ میلی‌متر) روی ژلوز آگار ایجاد گردید. با سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت، در چاهک‌های پلیت تخلیه و پلیت‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس دیجیتال اندازه‌گیری و میانگین مربوطه گزارش گردید [۹و۱۰].

با استفاده از روش رقت سازی در لوله، حداقل غلظت بازدارندگی[5] (MIC) و حداقل غلظت کشندگی[6] (MBC) ماده ضد میکروبی تعیین گردید. برای تعیین MIC، یک سری ۱۲ تایی از لوله‌های آزمایش استفاده شد. ۹ لوله برای آزمایش رقت-های مختلف عصاره، یک لوله به عنوان کنترل مثبت (حاوی عصاره رقیق شده به علاوه محیط کشت)، یک لوله به عنوان کنترل منفی (حاوی سوسپانسیون میکروبی به علاوه محیط کشت) و همچنین یک لوله حاوی آب مقطر استریل، سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت جهت اطمینان از رشد باکتری‌ها در محیط حاوی حلال بکار رفته برای رقت سازی استفاده شد. غلظت عصاره از ۱۰۰ تا ۰/۳۹۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بود. در ۹ لوله اول ۵۰۰ میکرولیتر از هر غلظت عصاره ریخته شد، سپس به تمام لوله‌ها به جز لوله شماره ۱۰ (کنترل مثبت)، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (که دارای $1/5 \times 10^8$ CFU بر میلی‌لیتر باکتری بود) انتقال داده شد. همه لوله‌های آزمایش برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی گردیدند. از همه لوله‌هایی که در آنها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود، نمونه برداری و جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره، به روش سطحی کشت داده شد. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از لوله‌هایی که عدم رشد باکتری را نشان می‌دادند بر روی محیط کشت نوترینت آگار ریخته شد و با سوآب بر روی محیط کشت پخش شد. بعد از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، پلیت‌های کشت داده شده از نظر وجود رشد میکروبی کنترل شد. لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوطه عدم رشد باکتری مشاهده گردید، به عنوان MBC عصاره در نظر گرفته شد [۴].

۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمون انتشار دیسک (جدول ۱) نشان داد که غلظت ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره کاردین روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز اثر ضدمیکروبی داشته است ($p<0/05$). در کمترین غلظت (۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) قطر هاله برابر ۷/۹۷ میلی‌متر و در بیشترین غلظت (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) هاله‌ای به قطر ۱۳/۷۷ میلی‌متر تشکیل شد. در مورد سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا در غلظت ۲۵ تا

4. Mueller Hinton Agar
5. Minimal Inhibitory Concentration
6. Minimum Bactericidal Concentration

۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره، هاله عدم رشد باکتری مشاهده شد. قطر هاله‌های ایجاد شده در کمترین غلظت (۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در این دو باکتری به ترتیب معادل ۱/۷۵ و ۲/۳۳ میلی-متر و در بیشترین غلظت (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب معادل ۲/۵ و ۲/۷۵ میلی‌متر بود. از دیسک‌های جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) به عنوان شاهد استفاده گردید که در سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا قطر هاله تشکیل شده با جنتامایسین بیشتر از عصاره بود و اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$). اما در مورد لیستریا مونوسیتوژنز قطر هاله تشکیل شده توسط عصاره کاردین در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیش از جنتامایسین بوده و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

Table 1 Inhibition zone diameter (mm) in disc diffusion method

Extract concentration (mg/ml)	Bacteria		
	Listeria monocytogenes	*Salmonella enteritidis*	*Pseudomonas aeruginosa*
100	13.77 [a]	2.50 [b]	2.75 [b]
50	10.60 [b]	2.00 [b]	2.50 [b]
25	8.10 [c]	1.75 [c]	2.33 [b]
12.5	7.97 [c]	0 [d]	0 [c]
6.25	0 [d]	0 [d]	0 [c]
3.125	0 [d]	0 [d]	0 [c]
1.562	0 [d]	0 [d]	0 [c]
0.781	0 [d]	0 [d]	0 [c]
0.390	0 [d]	0 [d]	0 [c]
Solvent control	0 [d]	0 [d]	0 [c]
Gentamicin control (10 µg)	13.16 [a]	12.10 [a]	12.35 [a]

* Means within a column with the same letters are not significantly different at $P < 0.05$.

میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده توسط عصاره کاردین به روش چاهک، در جدول ۲ بیان شده است. نتایج بدست آمده از این روش بیانگر آن بود که تأثیر عصاره هیدروالکلی برگ کاردین در غلظت ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر لیستریا مونوسیتوژنز و در غلظت ۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). در باکتری لیستریا مونوسیتوژنز، در کمترین غلظت، هاله رشد به قطر ۸/۰۳ و در بیشترین غلظت، هاله‌ای به قطر ۱۲/۱۶ میلی‌متر مشاهده شد. در مورد سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا قطر هاله‌های ایجاد شده در کمترین غلظت (۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در این دو باکتری به ترتیب معادل ۱/۶۸ و ۱/۹۶ میلی‌متر و در بیشترین غلظت (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب معادل ۲/۵۴ و ۳/۷۲ میلی‌متر بود.

Table 2 Inhibition zone diameter (mm) in agar diffusion method

Extract concentration (mg/ml)	Bacteria		
	Listeria monocytogenes	*Salmonella enteritidis*	*Pseudomonas aeruginosa*
100	12.16 [a]	2.54 [a]	3.72 [a]
50	9.26 [b]	2.10 [b]	2.59 [b]
25	7.93 [c]	1.68 [b]	1.96 [c]
12.5	8.03 [c]	0 [c]	0 [d]
6.25	0 [d]	0 [c]	0 [d]
3.125	0 [d]	0 [c]	0 [d]
1.562	0 [d]	0 [c]	0 [d]
0.781	0 [d]	0 [c]	0 [d]
0.390	0 [d]	0 [c]	0 [d]
Solvent control	0 [d]	0 [c]	0 [d]

* Means within a column with the same letters are not significantly different at $P < 0.05$.

Table 3 Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of cardin extract

Bacteria	Antibacterial activity (mg/ml)	
	MIC	MBC
Listeria monocytogenes	12.5	50
Salmonella enteritidis	25	100
Pseudomonas aeruginosa	50	100

بر اساس نتایج بدست آمده در روش رقت‌سازی، میزان MIC و MBC عصاره هیدروالکلی برگ کاردین در مورد لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب معادل ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و مقدار MBC به ترتیب معادل ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

بررسی‌های انجام شده در این پژوهش در مورد اثرات ضدمیکروبی عصاره برگ کاردین نشان داد که عصاره هیدروالکلی این گیاه بر لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا اثر ضدمیکروبی داشته و با تشکیل هاله روی محیط کشت از رشد باکتری‌های مذکور جلوگیری نموده است. البته اثر ضدمیکروبی عصاره فوق الذکر نسبت به آنتی‌بیوتیک شاهد یعنی جنتامایسین (به استثناء لیستریا مونوسیتوژنز) کمتر بود، به طوری که میانگین قطر هاله‌های عدم رشد ایجاد شده در روش دیسک دیفیوژن توسط عصاره برگ کاردین برای سالمونلا اینترتیدیس در محدوده ۱/۷۵ تا ۲/۵ میلی-متر و قطر هاله توسط جنتامایسین برابر ۱۲/۱ میلی‌متر بدست آمد که اختلاف معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$). در مورد سودوموناس آئروژینوزا قطر هاله توسط عصاره در محدوده ۲/۳۳ تا ۲/۷۵ میلی‌متر و قطر هاله جنتامایسین معادل ۱۲/۳۵ میلی‌متر گزارش شد که این اختلاف معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). در مورد لیستریا مونوسیتوژنز شرایط متفاوت بود، طوری که قطر هاله‌های عدم رشد در محدوده ۷/۹۷ تا ۱۳/۷۷ میلی‌متر و در مورد جنتامایسین معادل ۱۳/۱۶ میلی‌متر بود که این مقدار با مقدار قطر هاله تشکیل شده در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری نداشت که علت این امر را می‌توان به عدم انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب و یا غلظت بسیار بالا عصاره نسبت داد [۹].

فرهمندفر و رمضانی زاده (۲۰۱۸) نشان دادند که کاردین دارای مقادیر بالایی از فنول، فلاونوئید و توکوفرول است که می‌تواند دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی بالایی باشد [۱۱]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش غلظت عصاره در تمام نمونه‌ها میانگین قطر هاله‌های ایجاد شده افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). شاید این امر ناشی از افزایش حساسیت میکروبی در سوش‌های باکتری مورد آزمون در برابر مقادیر بالاتری از عصاره گیاهی و یا افزایش خاصیت ضدمیکروبی عصاره در مقادیر بالا باشد. البته اثر مذکور نمی‌تواند رابطه دارو-غلظت یعنی شکل خطی را به طور کامل توجیه کند، چرا که با افزایش مقاومت‌های باکتریایی و تغییر سوش‌ها امکان اثر خطی به مسطح و اینکه احتمالا در غلظت‌های بالاتر مقاومت سازگار[7] ایجاد کند، وجود دارد. البته باید در نظر داشت که با افزایش غلظت و افزایش اثر، ممکن است سمیت نیز ایجاد شود [۱۰].

بنابراین با نتایج این تحقیق مشخص شد که عصاره هیدروالکلی برگ کاردین دارای اثر ضدمیکروبی بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت (لیستریا مونوسیتوژنز) نسبت به باکتری‌های گرم منفی (سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا) است که این امر از بررسی میزان MIC و MBC این عصاره کاملا مشهود می-باشد. شاید این مسئله به علت ساختار غشای پلاسمایی و دیواره سلولی این گونه از باکتری‌ها (گرم منفی) باشد که ورود مواد مؤثره عصاره گیاهی را به داخل سلول محدود می‌نماید. در این زمینه سجادی و همکاران (۱۳۹۵) نیز در پژوهشی روی اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی میوه گیاه گل سفید بر استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به نتیجه رسیدند که عصاره مذکور دارای اثر ضدمیکروبی بیشتری بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به باکتری اشرشیاکلی می‌باشد [۱۲]. شریفی و همکاران (۱۳۹٤) در بررسی فعالیت های ضد میکروبی، غلظت‌های مختلف عصاره گیاه چویر بر دو نوع باکتری گرم منفی (اشریشیاکلی و کلبسیلا اکسی توکا) و دو باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اروئوس و انتروکوکوس فکالیس) گزارش دادند که عصاره اثرات مهارکنندگی بیشتری بر روی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری های گرم مثبت داشت و همچنین با

7. Adaptive resistance

کاهش غلظت عصاره خاصیت ضدمیکروبی آن نیز کاهش پیدا کرد [۱۳]. لذا با توجه به افزایش مقاومت دارویی باکتری‌های پاتوژن، تحقیق بیشتر در این زمینه در جهت جایگزین کردن عصاره‌های طبیعی گیاهی با داروهای شیمیایی پیشنهاد می‌گردد. همچنین با توجه به گسترش وسیع این گیاه در نقاط مختلف کشورمان تحقیقات بیشتری در زمینه شناسایی خصوصیات بیولوژیکی و فارماکولوژیکی این گیاه ضروری به نظر می‌رسد.

٤- نتیجه گیری

عصاره‌ها حاوی ترکیبات مؤثری در بازدارندگی رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشند لذا می‌توانند جایگزین مناسبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی در فرآیند تولید مواد غذایی گردند. عصاره کاردین دارای خاصیت ضدمیکروبی است و می‌تواند در نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد. بررسی عصاره هیدروالکلی برگ کاردین از طریق آزمون‌های MIC، MBC، دیسک و چاهک نشان داد که دارای اثر ضدمیکروبی بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت (لیستریا مونوسیتوژنز) نسبت به باکتری-های گرم منفی (سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا) است و قدرت ضدمیکروبی آن با افزایش غلظت عصاره، روند صعودی به خود می‌گیرد. لذا از توانایی عصاره هیدروالکلی برگ کاردین می‌توان در نگهداری مواد غذایی و مقابله با باکتری‌های پاتوژن بهره برد.

٥- منابع

[1] Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process* 2011;89(3):217-33.

[2] Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, Norlock FE, Calkins DR, Delbanco TL. Unconventional medicine in the United States--prevalence, costs, and patterns of use. *N Engl J Med* 1993;328(4):246-52.

[3] Akbary P, Fereidouni MS, Hosseini AG. The effects of Biarum carduchorum and Quercus infectoria Gall extracts on percentage of hatching and survival rate in the early growth stage of Oncorhynchus mykiss larvae. *J Vet Res* 2016; 71, 403-407. [in Persian]

[4] Farahmandfar R, Kordjazi A. Antimicrobial effect of Cardin (*Biarum bovei*) extract against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Studies in vitro and hamburger. *J Food Sci Technol* 2018, 16(86), 1-13 [in Persian]

[5] Rocourt J, BenEmbarek P, Toyofuku H, Schlundt J. Quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;35(3):263-267.

[6] Wisner AL, Potter AA, Köster W. Effect of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system on Salmonella survival in activated chicken macrophage-like HD11 cells. *PloS one* 2011;6(12):e29787.

[7] Farahmandfar. R., Shokooh saremi, A., Shahiri tabarestani, H., Azizkhani, M. Comprehensive basics of microbiology of food industry. 2014. Sahra press. Mashhad. [in Persian]

[8] Farahmandfar R, Asnaashari M, Sayyad R. Comparison antioxidant activity of Tarom Mahali rice bran extracted from different extraction methods and its effect on canola oil stabilization. *J Food Sci Technol* 2015 Oct 1;52(10):6385-94.

[9] Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chem* 2011 Aug 15;127(4):1821-7.

[10] De Wet PM, Rode H, Sidler D, Lastovica AJ. Allicin: a possible answer to antibiotic resistant campylobacter diarrhoeal infection? *Arch Dis Child* 1999 Sep 1;81(3):278-280.

[11] Farahmandfar, R. and Ramezanizadeh, M.H., 2018. Oxidative stability of canola oil by Biarum bovei bioactive components during storage at ambient temperature. *Food science & nutrition*, *6*(2), pp.342-347.

[12] Sajadi Kaboodi P, Bakhshi D, Moghadamnia AA, Sefidgar A. The Antibacterial Effects of Methanol Extract of Ammi majus on Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *J Babol Univ Med Sci* 2017;19(1):36-42. [in Persian]

[13] Akbary P, Fereidouni MS, Hosseini AG. The effects of Biarum carduchorum and Quercus infectoria Gall extracts on percentage of hatching and survival rate in the early growth stage of Oncorhynchus mykiss larvae. *J Vet Res* 2016;71(4):403-407.

Antibacterial activity of hydroalcoholic extract of Cardin leaf on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas aeruginosa*

Kordjazi, A. [1,2], Farahmandfar, R. [3*]

1. MSc, Department of Food Science and Technology, Khazar Institute of Higher Education, Mahmood Abad, Iran
2. Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

(Received: 2018/10/10 Accepted:2020/01/11)

In recent years, multiple drug resistance in human pathogenic microorganisms have developed due to indiscriminate use of commercial antimicrobial drugs commonly used in the treatment of infectious diseases. This situation forced scientists for searching new antimicrobial substances from various sources, like medicinal plants, which are the good sources of novel antimicrobial chemotherapeutic agents. In this study, the antibacterial effect of Cardin leaf was investigated. Hydroalcoholic extract of this plant was prepared at concentrations of 0.390 to 100 mg/ml and antimicrobial effect of extract were tested with disk diffusion and agar-well diffusion diffusion method against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the Cardin extract were investigated by dilution method. In the disk and well diffusion methods, the highest effect of extract on the bacteria was observed at concentration of 100 mg / ml, with the highest diameter of deterioration hole. Of course, the effect on gram-positive bacteria was more than gram negative. The inhibitory concentration of extract (MIC) on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas aeruginosa* was 12.5, 25 and 50 mg/ml and the MBC was 50, 100 and 100 mg/ml, respectively. The results showed that effect of Cardin extract on gram-positive bacteria was more than gram negative and the diameter of the non-growth halo increased with increasing concentrations of the extract.

Key words: Antibacterial effect, Cardin extract, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration, Disc diffusion

* Corresponding Author E-Mail address: r.farahmandfar@sanru.ac.ir