اثر ضدمیکروبی عصاره کاردین (*Biarum bovei*) بر *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*: مطالعه در محیط in vitro و همبرگر

رضا فرهمندفر[1*]، عارفه کردجزی[2]

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
۲- کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی خزر، ایران

(تاریخ دریافت: ۹٦/۰۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹٦/۱۰/۱۸)

چکیده

بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی در سال‌های اخیر رشد چشمگیری داشته است. در این پژوهش اثر ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی کاردین (*Biarum bovei*) در محیط کشت آزمایشگاهی و محیط غذایی همبرگر بر باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شد. در ابتدا، غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی کاردین تهیه و اثر ضدباکتریایی عصاره با استفاده از روش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)، حداقل غلظت کشندگی(MBC)، انتشار در آگار (دیسک و چاهک) و منحنی زمان-کشندگی ارزیابی شد. فعالیت ضدمیکروبی عصاره در برابر *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها درطی دوره نگهداری همبرگردر دمای ۱۲- درجه سانتیگراد در طی انبارداری (۰، ۱۵، ۳۰ و ٤٥ روز) مورد مطالعه قرار گرفت. 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 ضدمیکروبی آن افزایش می‌یابد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که به منظور بهبود ماندگاری، عصاره هیدروالکلی کاردین به عنوان یک ماده ضدمیکروبی طبیعی می‌تواند جایگزین مواد مصنوعی گردد.

کلید واژگان: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، فعالیت ضدمیکروبی، کاردین، همبرگر

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

۱- مقدمه

گوشت و فرآورده‌های گوشتی از مهمترین منابع غذایی در جیره روزانه افراد در کشورهای توسعه یافته بوده و مصرف آنها تحت تأثیر عوامل متعددی قرار دارد. مصرف این قبیل فرآورده‌ها به دلیل تنوع غذایی در کنار سهولت مصرف و عدم نیاز به پخت اکثر آنها، افزایش چشمگیری داشته و بخش قابل ملاحظه‌ای از نیاز غذایی جامعه به ویژه جوانان و نوجوانان را تأمین می‌کند [۱و۲]. از سوی دیگر، در سال‌های اخیر تا حدود زیادی افراد به مصرف غذاهای سلامتی بخش به ویژه مواردی که در ترکیب آنها از گوشت استفاده شده، اقبال پیدا کرده‌اند. با این همه، گزارشات روزافزون از بیماری‌های انتقال یافته از غذا و آلودگی‌های ثانویه محصولات غذایی در خلال مراحل بعد از فرآوری، نگرانی مصرف کنندگان، تولیدکنندگان و دیگر عوامل درگیر در صنایع غذایی را درپی داشته است [۳]. نگهداری در سردخانه، متداول‌ترین روش نگهداری گوشت و فرآورده‌های گوشتی محسوب می‌شود. در برخی از کشورها به منظور افزایش مدت زمان نگهداری گوشت و فرآورده‌های گوشتی، از مواد ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان‌ها (خصوصاً انواع سنتتیک آنها) استفاده می‌شود [۱]. این در حالی است که امروزه مصرف کنندگان نیز آگاهی بیشتری در مورد عوارض استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی پیدا کرده‌اند و تقاضای غذاهای تازه‌تر، طبیعی‌تر و کنترل شده‌تر را دارند.

همبرگر یکی از فرآورده‌های گوشتی است که به دلایل گوناگون از جمله سهولت مصرف، استفاده از گوشت در ترکیب آن و طعم مطلوب مصرف بالایی دارد و با توجه به اینکه این فرآورده تا زمان مصرف فرآورده‌ای خام است، کنترل کیفیت میکروبی این فرآورده گوشتی ضروری به نظر می‌رسد. عمده میکروارگانیسم‌های آلوده کننده همبرگر، باکتری‌ها (همچون استافیلوکوک‌ها، اشریشیاها، باسیلوس‌ها و اسیدلاکتیک باکتری‌ها) و نیز مخمرها (نظیر کاندیدا) می‌باشند [٤و٥]. از مهمترین باکتری‌های آلوده کننده می‌توان به *استافیلوکوکوس* اشاره نمود. حضور *استافیلوکوکوس* از آن جهت در مواد غذایی حائز اهمیت است که به دلیل تولید انتروتوکسین، عامل مسمومیت استافیلوکوکال می‌باشد [٦]. علائم کلاسیک این مسمومیت که در اثر مصرف غذا حاویان تروتوکسین استافیلوکوکوس به وجود می‌آید، عبارتند از: دردهای ناحیه شکمی، تهوع، استفراغ و اسهال که در بعضی بیماران همراه با سر درد می‌باشد [۷]. شیوع بیماری ناشی از *E.coli O157:H7* در سال ۱۹۹۳ در آمریکا به واسطه مصرف همبرگرهای نیم پز بوده که در اثر مصرف آن ٦۰۰ نفر دچار بیماری شده و ٤ کودک تلف شدند. همچنین، مصرف همبرگرهای آلوده در سال ۱۹۹٦ منجر به ابتلای ۵۰۰ نفر در اسکاتلند گردید که در طی آن ۲۰ نفر جان خود را از دست دادند [۸]. البته ذکر این نکته ضروری است که پیش بینی رفتار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* در فرآورده‌های غذایی مختلف از جمله همبرگر، به دلایل متعدد از جمله طبیعت گوشت، افزودنی‌ها، میزان اکسیژن در دسترس، فعالیت آبی، درجه حرارت، pH و خصوصاً اثر متقابل سایر ارگانیسم‌ها (سینرژیسم و آنتاگونیسم) بسیار دشوار است [۹].

گیاه کاردین (*Biarum bovei*) گیاهی برگ پهن است که در کوه‌های استانفارس 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 [۱۰]. یوسفلی و همکاران (۱۳۹۰) اثر ضدمیکروبی عصاره برگ نوروزک را در چهار سطح (۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۵۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و سه دوره زمانی ۱۵، ۳۰ و ٤۵ روز بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و شمارش کلی در همبرگر نگهداری شده در دمای ۱۲- درجه سانتیگراد، مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج، کاهش تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* و شمارش کلی میکروب‌ها در تمامی عصاره نشان داد که این روند کاهشی در روزهای پانزدهم و سی‌ام به ترتیب برای *استافیلوکوکوس* و شمارش کلی معنی‌دار بود. در بین سطوح عصاره افزوده شده به ترتیب کمترین و بیشترین تأثیر برای سطوح غلظتی ۵۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم گزارش شد [۱۱].

Sallam و همکاران (۲۰۰٤) اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی سیر در برابر اکسیداسیون چربی‌ها و رشد میکروبی در سوسیس مرغ را بررسی کردند. نتایج نشان داد که با استفاده از سیر تازه (۳۰ گرم در کیلوگرم) و یا پودر سیر (۹ گرم در کیلوگرم)،

شمارش کلی باکتری‌های هوازی به‌طور قابل توجهی کاهش و متعاقباً زمان ماندگاری افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج، سیر تازه و پودر سیر، به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی و اثرات ضد میکروبی خود به طور بالقوه در حفظ محصولات گوشت مفید می‌باشند [۱۲].

پزشک و همکاران (۱۳۹۱) اثر ضدباکتریایی و ضد اکسیداسیونی عصاره زرد چوبه (*CurcumaLonga*) در شرایط آزمایشگاهی بر ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را بررسی کردند. نتایج حاصله نشان داد مقادیر باکتری‌های سرما دوست و کل باکتری‌ها در طول دوره نگهداری در ماهیان تیمار شده با عصاره زرد چوبه، زیر حد قابل قبول پیشنهادی (۷ لوگ cfu بر گرم) باقی ماند و فساد میکروبی در این نمونه‌ها نسبت به نمونه شاهد به طور معنی‌داری (P< ۰/۰۵) کاهش یافت. طبق بررسی‌های حسی و آنالیزهای میکروبی، ماهی قزل آلای رنگین کمان تیمار شده با عصاره زردچوبه نسبت به نمونه شاهد تا انتهای دوره نگهداری قابل مصرف بود [۱۳].

با توجه به مرور منابع، تاکنون فعالیت ضدمیکروبی کاردین علیه باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زا در محیط کشت و مواد غذایی، به ویژه فرآورده‌های گوشتی مورد مطالعه و بررسی قرار نگرفته است. مطالعات بیشتر در خصوص اثرات ضد میکروبی این گیاه، می‌تواند آن را به عنوان یک نگهدارنده طبیعی برای جایگزین شدن با انواع سنتتیک مطرح نماید. بر این اساس هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی و بررسی اثر ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی کاردین بر *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط آزمایشگاهی و همبرگر می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع آوری گیاه و عصاره گیریبا اولتراسوند

برگ گیاه کاردین در فاصله فروردین تا اردیبهشت ۱۳۹۵ از شیراز جمع آوری شد و پس از تمیز و خشک کردن، توسط آسیاب پودر شده و در ظروف دربسته و به دور از نور و حرارت نگهداری شد. دستگاه اولتراسوند (مدل YJ5120-1، ایتالیا) با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز برای استخراج عصاره استفاده شد. ۱ گرم برگ کاردین پودرشده توسط ۱۰ میلی‌لیتر از حلال (اتانول ۵۰ درصد) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به کمک اولتراسوند عصاره گیری شد. برای حذف تفاله و مواد غیرمحلول، عصاره با کاغذ واتمن شماره یک صاف شد. بعد از این مرحله، عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتیگراد در ۳۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس عصاره حاصل در دمای کمتر از ٤۰ درجه سانتیگراد تحت 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 گرفت [١٤].

۲-۲- سویه‌های باکتریایی

باکتری‌های مورد مطالعه شامل *اشریشیا کلی (ATCC 35218)* و *استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923)* بودند که به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند.

۲-۳- تهیه میزان تلقیح باکتری

آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری‌ها ابتدا در شرایط سترون، باز و به محیط کشت مایع نوترینت براث[1] انتقال و به مدت ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس جهت اطمینان از خالص بودن، باکتری از محیط نوترینت براث به صورت خطی روی محیط کشت انتخابی- افتراقی کشت داده شد و به مدت ٤۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. از کلنی باکتری یک لوپ برداشت کرده و ٢٤ ساعت قبل از هر آزمون آن را به نوترینت براث تلقیح نموده و به همین صورت برای هر آزمون جهت بررسی اثرات ضدمیکروبی کشت تازه ٢٤ ساعته تهیه گردید. با استفاده از سمپلر یک میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی ٢٤ ساعته به لوله حاوی نوترینت براث سترون انتقال داده و سپس کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده، با استفاده از استاندارد ۰/۵ مکفارلند (۰/۵ میلی‌لیتر از کلرور باریم ($BaCl_2$) ۰/۰٤۸ مول بر لیتر (٪۱/۱۷۵ W/V $BaCl_2.2H_2O$) را به ۹/۹۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۱۸ مول بر لیتر (۱٪ حجمی/ حجمی) اضافه کرده و با هم زدن مداوم سوسپانسیون بدست آمد) تنظیم شده با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج

1. Nutrient Broth

۶۲۵ نانومتر با میزان جذب ۰/۱۳–۰/۰۸ (برابر با $1/5 \times 10^8$ CFU بر میلی‌لیتر) مقایسه گردید. کلیه محیط‌های کشت بر اساس دستور کارخانه سازنده مرک تهیه و با استفاده از دستگاه اتوکلاو سترون گردید [۱۵].

۲-٤- تعیین ضدباکتریایی عصاره کاردین در در محیط in vitro

۲-٤-۱- حداقل غلظت بازدارندگی[2] (MIC) و حداقل غلظت کشندگی[3] (MBC) عصاره

با استفاده از روش رقت سازی در لوله، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی ماده ضدمیکروبی تعیین گردید. برای تعیین MIC، از یک سری ۱۲ تایی از لوله‌های آزمایش استفاده شد. ۹ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت (حاوی عصاره رقیق شده به علاوه محیط کشت) و 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 ۰/۰۳۹۰ میلی گرم/ میلی لیتر 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 ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد 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 پخش کننده بر روی محیط کشت پخش شد. بعد از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ 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 [۱٦و۱۷].

۲-٤-۲- روش انتشار در آگار با استفاده از دیسک

جهت تهیه دیسک‌های مورد آزمایش، هر دیسک (شرکت پادتن طب، ایران) با قطر ٦/٤ میلی متر از هر غلظت عصاره اشباع شد. 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، با 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 پخش کننده در تمام نقاط آن پخش گردید. سپس دیسک‌های تهیه شده از عصاره‌ها با غلظت‌های مختلف، در فاصله مناسب از یکدیگر کاشته و برای مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس دیجیتال اندازه گیری و میانگین مربوطه گزارش گردید [۱۸و۱۹].

۲-٤-۳- روش انتشار در آگار با استفاده از چاهک

در این روش، بعد از ریختن محیط کشت درون پلیت و بسته شدن آن، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (دارای $1/5 \times 10^8$ CFU/ml) را روی محیط کشت ریخته و با پخش کننده در تمام نقاط محیط کشت پخش شد. سپس چاهک‌هایی با قطری معادل دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (٦ میلی‌متر) روی ژلوز آگار ایجاد گردید. با سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت، در چاهک‌های پلیت تخلیه و پلیت‌ها برای مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس دیجیتال اندازه‌گیری و میانگین مربوطه گزارش گردید [۱۹و۲۰].

2. Minimal Inhibitory Concentration
3. Minimum Bactericidal Concentration
4. Mueller Hinton Agar

۲-٤-٤- تعیین منحنی زمان – کشندگی

فعالیت ضدباکتریایی عصاره مورد آزمایش در طیف گسترده یعنی از صفر تا ٤ برابر MIC (۰، ۱، ۲ و ٤ برابر) مورد مطالعه قرار گرفت و در ۳۷ درجه سانتیگراد در کنار نمونه شاهد (بدون عصاره) گرمخانه گذاری شد. در زمان‌های از پیش تعیین شده (۰، ۳، ٦، ۹ و ۱۲ ساعت) نمونه ۱۰۰ میکرولیتری از هر سوسپانسیون (محیط براث+تلقیح باکتری+ عصاره) برداشته و به صورت سری تا ۱۰ برابر در سالین[5] استریل رقیق و برای تعیین تعداد کلونی‌ها روی پلیت آگار خون کشت داده شد. اطلاعات حاصله به صورت Log CFU/ml در برابر زمان (ساعت) برای هر نقطه زمانی رسم شد [۱۹].

۲-۵- تهیه همبرگر، افزودن عصاره و تلقیح باکتری

گوشت، سویا، فلفل دلمه، روغن، پیاز، ادویه و نمک، اجزاء تشکیل دهنده همبرگر را تشکیل می‌دهند. در کارخانه فرآورده‌های گوشتی نوژ سرخرود، این مواد ابتدا با هم مخلوط و چرخ شد. مواد به دستگاه قالب‌زن منتقل و کاغذ رویی همبرگر روی آن قرار گرفت. همبرگرها به سردخانه منتقل و ۲٤ ساعت در دمای ۲٤- درجه نگهداری و منجمد شدند. سپس همبرگرها در آزمایشگاه و شرایط استریل، به صورت نمونه‌های ۱۰ گرمی توزین شده و مقادیر مورد نظر عصاره (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی-گرم در گرم همبرگر برای *اشریشیا کلی* و شمارش کلی، مقادیر ۰، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در گرم همبرگر برای *استافیلوکوکوس اورئوس*) و 10^6 سلول باکتری در هر گرم اضافه گردید. همبرگرها در فریزر (با دمای ۱۲- درجه سانتیگراد) نگهداری و در روزهای صفر (روز اول انجام کار و پس از تلقیح)، ۱۵، ۳۰ و ٤۵ نمونه‌ها جهت شمارش باکتری‌ها (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی*) و شمارش کلی مورد آزمایش قرار گرفتند. لازم به ذکر است که برای هر غلظت در تیمار شاهد، همبرگر حاوی باکتری و فاقد عصاره در نظر گرفته شد.

۲-٦- ارزیابی رشد باکتری‌ها در همبرگر

۲-٦-۱- تعیین میزان رشد باکتری *اشریشیا کلی*

در زمان مورد نظر، به نمونه‌های همبرگر در شرایط استریل ۲۲۵ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد اضافه شد و ۲ دقیقه در دمای اتاق توسط استوماکر هموژن گردید؛ سپس رقت‌های بعدی با استفاده از لوله‌های رقت حاوی آب پپتونه۰/۱ درصد بدست آمد و در پلیت حاوی آگار قلب و مغز کشت داده شد و در ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری گردید [۲۱].

۲-٦-۲- تعیین میزان رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

یک سی سی از نمونه رقیق شده را در پلیت حاوی محیط کشت برد پارکر آگار[6] به صورت سطحی کشت داده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در اینکوباتور قرار گرفت. به منظور شمارش و شناسایی میکروارگانیسم از کلنی کانتر مدل SANA SL-902 (شرکت مبین طب، ایران) استفاده شد[۲۲].

۲-٦-۳- تعیین میزان شمارش کلی باکتری‌ها

برای این آزمون، یک سی سی از نمونه رقیق شده را در پلیت حاوی محیط کشت پلیت کانت آگار[7] به صورت مخلوط کشت داده شد. پلیت‌های آماده را به صورت وارونه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری، کلنی‌های موجود در پلیت شمارش شدند [۲۳].

۲-۷- طرح آماری مورد استفاده

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 19 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس تحلیل و تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها توسط تست چند دامنه‌ای دانکن مشخص گردید و نمودار داده‌ها بر اساس میانگین‌های سه تکرار در نرم افزار Excel 2016 رسم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی میزان MIC و MBC عصاره

اساساً MIC کمترین مقدار از یک ترکیب است که می‌تواند به میزان زیادی رشد یک ارگانیسم را پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص مهار نماید. نتایج نشان داد که عصاره

5. Saline

6. Baird Parker Agar

7. Plate Count Agar

هیدروالکلی کاردین دارای اثرات مهارکنندگی و کشندگی بر هر دو باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، MIC و MBC برای *اشریشیا کلی* به ترتیب معادل ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب معادل ۱۲/۵ و ۵۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر بود.

Table 1 Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of cardin extract

Bacteria	Antibacterial activity (mg/ml)	
	MIC	MBC
Escherichia coli	25	50
Staphylococcus aureus	12.5	50

بنابراین می‌توان گفت که حداقل غلظت بازدارندگی عصاره هیدروالکلی کاردین در باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است. در این زمینه، Burt (۲۰۰٤) گزارش کرد که تأثیر عصاره‌های گیاهی (اسطوخودوس، رزماری، دارچین، پونه کوهی و غیره) روی باکتری‌های گرم منفی کمتر از باکتری‌های گرم مثبت بوده که این امر به دلیل وجود لایه لیپو پروتئین- لیپوپلی‌ساکاریدی موجود در پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت و در نتیجه مقاومت بیش‌تر در برابر ترکیبات ضدباکتریایی موجود در عصاره‌هااست[٢٤]. بهدانی و همکاران (۱۳۸۸) بیان کردند عصاره آبی حنا فعالیت ضدمیکروبی کمی بر علیه باکتری‌های گرم منفی مانند *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلی* دارد، اما دارای فعالیت ضد میکروبی مناسبی بر علیه گونه‌های *استافیلوکوکوس* به عنوان باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد [۲۵]. کرمانشاهی روحا و همکاران (۱۳۸۸) اثرات ضد میکروبی عصاره الکلی گیاه رازک بر سویه‌های مختلف میکروبی را بررسی کردند. بر اساس نتایج بدست آمده، مشخص گردید که اثر مهارکنندگی و ضد میکروبی عصاره الکلی گیاه رازک روی باکتری‌های گرم مثبت به طور مشخص بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است [٢٦]. مشاهدات این پژوهشگران مبنی بر اثر بیشتر عصاره‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی نیز با مشاهدات ما همخوانی داشت. مقدار کمتر MIC نسبت به MBC در عصاره کاردین نشان می‌دهد که این عصاره در غلظت پایین‌تر دارای خاصیت باکتری و استاتیک و در غلظت بالاتری دارای خاصیت باکتریوسید است. در مطالعه‌ای که توسط Simoes-Gurgel و همکاران (۲۰۱۲) بر خاصیت ضدباکتریایی عصاره متانولی *Cleome rosea vahl* انجام شد، همین نتیجه مشاهده شد [۲۷].

۳-۲- بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره به روش انتشار در آگار (دیسک و چاهک)

با استفاده از روش انتشار در آگار، اثر ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی کاردین (در ۹ رقت مختلف) به دو روش کمی دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت بر باکتری‌ها انجام شد و نتایج حاصل در جدول‌های ۲ و ۳ آورده شده است.

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

Extract concentration (mg/ml)	Bacteria	
	Escherichia coli	*Staphylococcus aureus*
100	6.66 [b]	7.12[a]
50	6.01[b]	3.03 [b]
25	4.85 [c]	2.70 [c]
12.5	0 [d]	2.36 [c]
6.25	0 [d]	0 [d]
3.125	0 [d]	0 [d]
1.562	0 [d]	0 [d]
0.781	0 [d]	0 [d]
0.390	0 [d]	0 [d]
Solvent control	0 [d]	0 [d]
Gentamicin control (10 µg)	13.13 [a]	7.26 [a]

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

بر اساس نتایج در روش دیسک (جدول ۲)، بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد (٦/٦٦ میلی‌متر) در باکتری *اشریشیا کلی* مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که از لحاظ آماری با تیمار جنتامایسین ۱۰ میکروگرم (۱۳/۱۳ میلی‌متر) اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). همچنین نتایج نشان داد که کمترین میزان قطر هاله عدم رشد (۰ میلی‌متر) به تیمار شاهد حلال مربوط بود که البته از لحاظ آماری با تیمارهای عصاره در غلظت‌های مختلف ۰/۳۹۰، ۰/۷۸۱، ۱/۵٦۲، ۳/۱۲۵، ٦/۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). نتایج مقایسه میانگین‌ها روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد در روش دیسک (۷ میلی‌متر) مربوط به تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که از لحاظ آماری با تیمار جنتامایسین ۱۰ میکروگرم اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). همچنین نتایج نشان داد که کمترین میزان قطر هاله عدم رشد (۰ میلی‌متر) به تیمار شاهد حلال مربوط بود که از لحاظ آماری با تیمارهای عصاره کاردین در غلظت‌های مختلف ۰/۳۹۰، ۰/۷۸۱، ۱/۵٦۲، ۳/۱۲۵ و ٦/۲۵ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). در این آزمایش از دیسک آنتی بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم در هر دیسک) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. اثر مهارکنندگی عصاره کاردین بر باکتری‌های مورد آزمایش همواره کمتر از جنتامایسین بود، که این نتیجه با تحقیق خسروی نیا و همکاران (۱۳۹۲) که اثر ضدباکتریایی عصاره سلولی حاصل از کشت درون شیشه‌ای زیره سیاه (*Bunium persicum*) را بررسی کردند[۲۸] مطابقت داشت.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها در روش چاهک، بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد (٤/۵ میلی‌متر) در باکتری *اشریشیا کلی* مربوط به تیمار عصاره کاردین در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شد (جدول ۳). همچنین نتایج نشان داد که کمترین میزان قطر هاله عدم رشد (صفر میلی‌متر) متعلق به تیمار شاهد حلال بود که البته از لحاظ آماری با تیمارهای عصاره کاردین در غلظت‌های مختلف ۳۹۰/ الی ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری نداشت(P> ۰/۰۵).در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد (٦ میلی‌متر) مربوط به تیمار عصاره در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. همچنین نتایج نشان داد که کمترین میزان قطر هاله عدم رشد (صفر میلی-متر) متعلق به تیمار شاهد حلال بود که البته از لحاظ آماری با تیمارهای عصاره در غلظت‌های مختلف ۰/۳۹۰، ۰/۷۸۱، ۱/۵٦۲، ۳/۱۲۵ و ٦/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری نداشت (P> ۰/۰۵).

Table 3. Inhibition zone diameter (mm) in agar-well diffusion method

Extract concentration (mg/ml)	Bacteria	
	Escherichia coli	*Staphylococcus aureus*
100	4.51[a]	6.32[a]
50	3.24[b]	2.55[b]
25	2.52[c]	2.40[c]
12.5	0 [d]	2.36[c]
6.25	0 [d]	0 [c]
3.125	0 [d]	0 [c]
1.562	0 [d]	0 [c]
0.781	0 [d]	0 [c]
0.390	0 [d]	0 [c]
Solvent control	0 [d]	0 [c]

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

اثر ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی کاردین به روش انتشار دیسک و روش چاهک نشان داد که کاهش غلظت‌های عصاره نسبت مستقیم با کاهش قطر هاله‌های عدم رشد در باکتری‌های مورد مطالعه دارد. حلال عصاره (آب) که به عنوان شاهد در روش دیسک و چاهک مورد استفاده قرار گرفت، بر هیچ یک از باکتری‌های مورد مطالعه خاصیت ضد میکروبی نداشت.

نتایج بیانگر اثر بازدارندگی قابل توجه عصاره بر رشد باکتری‌ها بود که به صورت هاله عدم رشد نمایان شد. از نظر تئوری قطر

هاله که نشان دهنده عدم رشد باکتری‌ها می‌باشد، عکس العملی از غلظت ماده مؤثره موجود در گیاه است. این پدیده یک ارتباط خطی بین اندازه هاله و لگاریتم غلظت ماده مورد آزمایش می‌باشد که با اندازه گیری قطر هاله و مقایسه آن با استاندارد مشخص، قدرت ضد میکروبی ماده مورد آزمایش تعیین می‌شود [۲۹]. در هر دو روش انتشار در آگار، توانایی عصاره در جلوگیری از رشد باکتری‌ها کاملاً قابل مشاهده بود، با این تفاوت که در روش دیسک گذاری هاله‌های عدم رشد منظم‌تر گزارش شد. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با تحقیقات برخی از محققان هماهنگی‌ها و تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد. این تفاوت‌ها را می‌توان به تأثیر عوامل متعددی از جمله نوع گیاه، نوع حلال، نوع بافت گیاهی مورد استفاده، زمان و محل جمع آوری گیاه، تغییرات آب و هوایی و شرایط جغرافیایی منطقه و امکانات آزمایشگاه و غیره نسبت داد [۲۸].

۳-۳- بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره به روش منحنی زمان-کشندگی

در این تحقیق، فعالیت‌های ضدباکتریایی عصاره اتانولی ۵۰ درصد به دست آمده با استفاده از روش رقت سازی، توسط منحنی‌های زمان کشندگی تایید شد. اثر کشندگی عصاره اتانولی ۵۰ درصد کاردین در ٦ غلظت (۰، ۰/۵، ۱، ۲، ٤ و ۸ برابر MIC) در ۵ زمان (۰، ۳، ٦، ۹ و ۱۲ ساعت) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۲ برابر MIC) عصاره موجب مهار رشد *اشریشیا کلی* در ۳ ساعت اول گردید، در حالی که غلظت‌های پایین‌تر یعنی ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۰/۵ و ۱ برابر MIC) پس از ٦ ساعت اثر باکتری کشی نشان دادند (شکل ۱). همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شد، سینتیک غیر فعالسازی در زمان بیش از ٦ ساعت، فعالیت ثابت عصاره اتانولی ۵۰ درصد کاردین را در برابر *اشریشیا کلی* نشان می‌دهد.

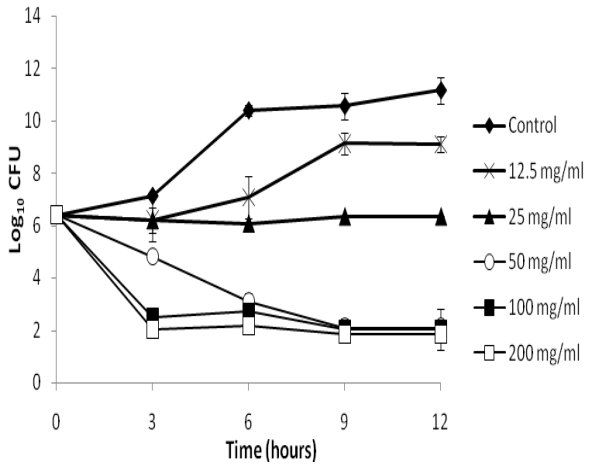

Fig 1 Time-kill curve of cardin extract against *Escherichia coli*

در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* نتایج نشان داد که غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۲، ٤ و ۸ برابر MIC) عصاره باعث کاهش رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در ساعات اولیه شدند ولی در غلظت ٦/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۰/۵ برابر MIC) عصاره، میزان باکتری تا ۹ ساعت افزایش یافت (شکل ۲). لازم به ذکر است که کلیه غلظت‌های عصاره میزان باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را نسبت به نمونه شاهد کاهش دادند.

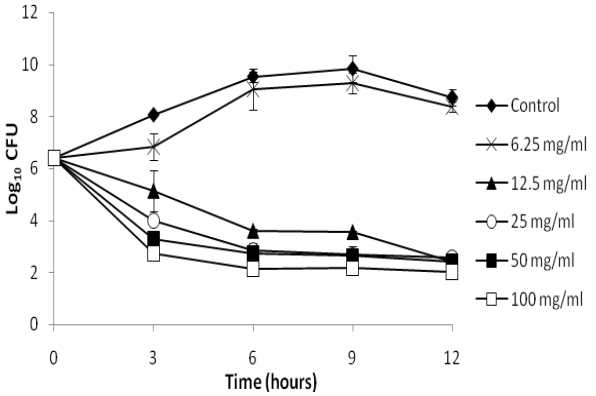

Fig 2 Time-kill curve of cardin extract against *Staphylococcus aureus*

اگرچه اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مختلف فنولی به خوبی شناخته شده ولی مکانیسم عمل این محصولات و ترکیبات آنها به طور کامل شناخته نشده است. تصور می‌شود که پلی‌فنول‌ها دارای فعالیت‌های سطحی هستند و موجب آسیب به غشاء سلول‌های

باکتریایی، مهار آنزیم‌های آن و یا تداخل با تولید برخی از آمینو اسیدهای ضروری برای رشد باکتری می‌شوند [١و٥].

سلطان دلال و همکاران (١٣٩١) نیز به بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس گیاهی آویشن شیرازی بر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از مواد غذایی پرداختند. آنها منحنی زمان-کشندگی اسانس آویشن شیرازی بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقادیر ٠، ٠/٥، ١ و ٢ برابر MIC را در زمان‌های ٠، ١/٥، ٣، ٦، ١٢ و ٢٤ ساعت بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که با افزایش غلظت اسانس تا ٢ برابر MIC، کاهش لگاریتم تعداد باکتری افزایش می‌یابد [٣٠].

٣-٤- ارزیابی رشد باکتری‌ها در همبرگر

در شکل ٣، رشد *اشریشیا کلی* در همبرگر در زمان‌های ٠، ١٥، ٣٠ و ٤٥ روز در فریزر مورد ارزیابی قرار گرفته است. همانطور که مشاهده می‌کنید همبرگر شاهد دارای بیشترین مقدار باکتری بود و همبرگر دارای ١٠٠ میلی¬گرم بر گرم عصاره، کمترین مقدار باکتری را به خود اختصاص داد. نتایج نشان داد که کمترین تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به تیمار غلظت ٥٠ میلی-گرم در گرم در زمان ٤٥ روز بود (شکل ٤). با گذشت زمان و افزایش غلظت عصاره در طی انبارداری، میزان باکتری کاهش یافت به طوری که این کاهش در بیشترین غلظت (یعنی ٥٠ میلی‌گرم در گرم) معنی‌دار گزارش شد ($P<$ ٠/٠٥). همانطور که در نمودار ٥ مشاهده می‌شود، با گذشت ٤٥ روز انبارداری، بیشترین تعداد شمارش کلی (یعنی ٦/٢) مربوط به تیمار شاهد و کمترین مقدار آن متعلق به نمونه حاوی ١٠٠ میلی‌گرم در گرم بود. نتایج نشان داد با افزایش همزمان غلظت عصاره و مدت انبارداری در فریزر، شمارش کلی باکتری‌ها (خصوصاً در غلظت-های بالای عصاره) روند نزولی به خود گرفت.

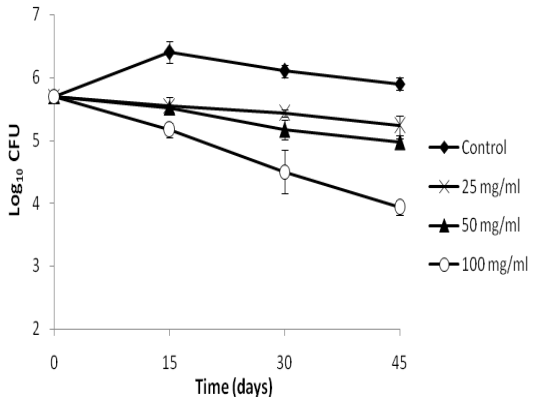

Fig 3 *Escherichia coli* curve in hamburger during storge

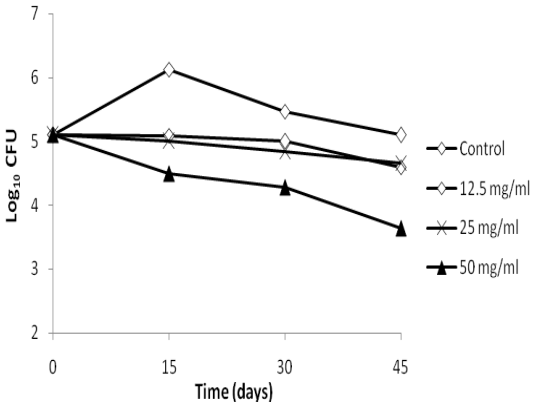

Fig 4 *Staphylococcus aureus* curve in hamburger during storge

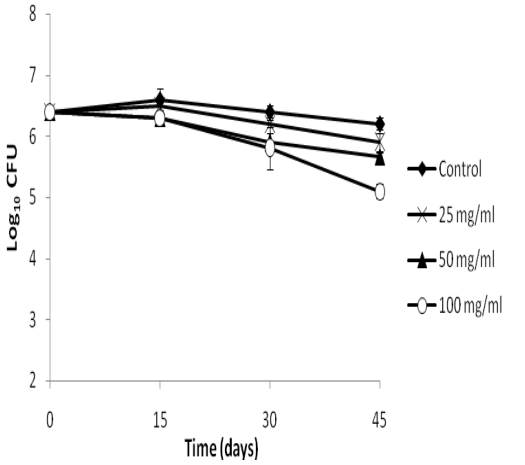

Fig 5 Total count of bacteria in hamburger during storge

در مطالعه حاضر، عصاره کاردین رشد و تکثیر *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و شمارش کلی در غلظت‌های مورد استفاده در همبرگر را محدود نمود. به طور کلی، با افزایش غلظت عصاره کاردین و مدت نگهداری در فریزر، مقدار تکثیر باکتری‌ها روند کاهشی داشت. از طرف دیگر، در نمونه‌های شاهد با افزایش زمان نگهداری مقدار *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز شمارش کلی باکتری‌ها در ابتدا (تا روز ۱۵) افزایش و سپس کاهش داشت. روند افزایشی احتمالاً ناشی از حضور آب، چربی، پروتئین و محتوای املاحی است که به طور بدیهی در مواد غذایی فرآوری شده همچون همبرگر یافت شده و مقاومت میکروبی را افزایش می‌دهند [۳۱و۳۲]. دلیل دیگری که می‌توان در این ارتباط ذکر نمود، مقاوم بودن این باکتری‌ها در برابر انجماد است [۳۳].

در تحقیقی اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف اسانس (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) بر رشد باکتری *E. coli O157: H7* در گوشت چرخ کرده طی انبارداری ١٤ روزه در دماهای ٤ و ۱۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در غلظت ۰/۰۳ درصد اثر ضدباکتریایی قوی وجود دارد و با افزایش غلظت اسانس، میزان رشد باکتری در طی دوره نگهداری کاهش می‌یابد [٣٤]. چالشتری و همکاران (۱۳۹۱) خواص آنتی-اکسیدانی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی و اثر ضدمیکروبی آن بر *استافیلوکوکوس اورئوس* را در دمای یخچال روی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* طی مدت زمان نگهداری معین (۰، ۱، ۳، ٦، ۹ و ۱۲ روز) مورد بررسی قرار دادند. این محققین گزارش دادند که در غلظت‌های ۰/۵ و ۱/۵ درصد عصاره، کاهش تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد [۳۵]. یوسفلی و همکاران (۱۳۹۰) نیز اثر ضدمیکروبی پودر عصاره برگ نوروزک در ٤ سطح (۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۵۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ۳ دوره زمانی ۱۵، ۳۰ و ٤٥ روز بر شمارش کلی در همبرگر نگهداری شده در دمای ۱۲- درجه سانتیگراد را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل کاهش تعداد شمارش کلی میکروب‌ها را در تمامی سطوح پودر افزوده شده نشان داد که این روند کاهشی در روز سی ام برای شمارش کلی معنی‌دار بود. در بین سطوح پودر افزوده شده به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر برای سطوح ۲۰۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شد [۱۱]. در مطالعه حاضر نیز غلظت‌های مورد استفاده از عصاره کاردین در همبرگر، سبب کاهش تعداد باکتری‌ها در فریزر شدند.

٤- نتیجه گیری

هدف اصلی این تحقیق، بررسی خواص ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی کاردین در محیط in vitro و اثر ضدمیکروبی روی همبرگر طی نگهداری در فریزر بود. در محیط in vitro، استفاده از عصاره هیدروالکلی کاردین در برابر باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر مهارکنندگی و کشندگی عصاره را نشان داد. علاوه بر این، پس از تیمار نمونه‌های همبرگر با غلظت‌های مختلف عصاره در دمای ۱۲- درجه سانتیگراد مشخص شد که با افزایش غلظت عصاره و کاهش مدت انبارداری اثر ضدمیکروبی آن افزایش می‌یابد. برطبق نتایج این مطالعه ثابت شد که عصاره هیدروالکلی کاردین دارای اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است و می‌تواند یک منبع طبیعی برای استفاده در مواد غذایی باشد. لذا می‌توان پیشنهاد نمود که از غلظت‌های بالای عصاره هیدروالکلی کاردین به عنوان یک نگهدارنده طبیعی ضدباکتریایی در صنعت گوشت و فرآورده‌های آن مورد استفاده قرار گیرد.

۵- منابع

[1] Jiang, J., Xiong, Y.L. 2016. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat science*, 120, 107-117.

[2] Inguglia, E.S., Zhang, Z., Tiwari, B.K., Kerry, J.P., Burgess, C.M. 2017. Salt reduction strategies in processed meat products–A review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 70-78.

[3] Reij, M.W., Den Aantrekker, E.D. 2004. Europe risk analysis in microbiology task force. *Int. J. Food Microbiol*, 91, 1-11.

[4] Nejad, A.S.M., Shabani, S., Bayat, M., Hosseini, S.E. 2014. Antibacterial effect of garlic aqueous extract on *Staphylococcus aureus* in hamburger. *Jundishapur journal of microbiology*, 7, 1-5.

[5] Fernández - Ginés, J.M., Fernández - López, J., Sayas - Barberá, E., Pérez - Alvarez, J. 2005. Meat products as functional foods: A review. *Journal of food science*, 70, 37-43.

[6] Kaur, K., Kahlon, R.S. 2017. Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Ready to Eat Foods, Hand Swabs and Utensil Swabs of Street Vendors Selling Food on Wheels. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6, 2424-2431.

[7] Hu, D.L., Nakane, A. 2014. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *European journal of pharmacology*, 722, 95-107.

[8] Adams, M.R. and Moss, M., 2007. *Food microbiology*. Royal society of chemistry.

[9] Jay, J.M., 2012. *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media.

[10] Akbary, P., Fereidouni, M.S., Gholam Hosseini, A. 2016. 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*, *Journal of Veterinary Research*, 71, 403-407.

[11] Yousefli, M., Hosseini, Z., Haddad Khodaparast, M. H., Azarnivand, H., Pezeshki, P. 2011. Antimicrobial effect of *Salvia leriifolia* leaf extract powder against the growth of *Staphylococcus aureus* in hamburger. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 8, 126-136.

[12] Sallam, K.I., Ishioroshi, M., Samejima, K. 2004. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *LWT-Food Science and Technology*, 37, 849-855.

[13] Pezeshk S., Rezaei M., Rashedi H. Hosseini H. 2012.Investigation of antibacterial and antioxidant activity of turmeric extract (*Curcuma Longa*) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vitro. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 9, 77-87.

[14] Farahmandfar, R., Asnaashari, M., Sayyad, R. 2015. Comparison antioxidant activity of *Tarom Mahali* rice bran extracted from different extraction methods and its effect on canola oil stabilization. *Journal of food science and technology*, 52, 6385-6394.

[15] Jalali, M., Abedi, D., Ghasemi Dehkordi, N., Charmahali, A. 2006. Evaluation of antibacterial activity of ethanol extracts of some medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences*, 8, 25-33.

[16] Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Cos, P., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A., Berghe, D.V. 1999. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 65, 71-77.

[17] Anzabi, Y., Aghdam, V.B., Makoui, M.H., Anvarian, M., Mousavinia, M.N. 2013. Evaluation of antibacterial properties of edible oils and extracts of a native plant, *Ziziphora clinopodioides* (Mountains" Kakoty), on bacteria isolated from urinary tract infections. *Life Science Journal*, 10, 121-127.

[18] Mangena, T., Muyima, N.Y.O. 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters in applied microbiology*, 28, 291-296.

[19] Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., Abram, M. 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127, 1821-1827.

[20] De Wet, P.M., Rode, H., Sidler, D., Lastovica, A.J. 1999. Allicin: a possible answer to antibiotic resistant campylobacter diarrhoeal infection? *Archives of disease in childhood*, 81, 278-278.

[21] Periago, P.M., Moezelaar, R. 2001. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *International journal of food microbiology*, 68, 141-148.

[22] Shahraz, F., Dadkhah, H., Khaksar, R., Mahmoudzadeh, M., Hosseini, H., Kamran, M., Bourke, P. 2012. Analysis of antibiotic resistance patterns and detection of mecA gene in *Staphylococcus aureus* isolated from packaged hamburger. *Meat science*, 90, 759-763.

[23] Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A. 2011. Application of chitosan-sunflower oil edible films to pork meat hamburgers. *Procedia Food Science*, 1, 39-43.

Antimicrobial effect of Zataria multiflora on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from food. Scientific *Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 17, 21-29.

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

[32] Snyder, O.P. 1997. Antimicrobial effects of spices and herbs. *Institute of Technology and Management, Minnesota*.

[33] Archer, D.L. 2004. Freezing: an underutilized food safety technology?*International journal of food microbiology*, 90, 127-138.

[34] Noori, N., Rokni, N., Akhondzade Basti, A., Misaghi, A., Dabbagh Moghaddam, A., Yahyaraeyat, R., Ghanbari Sagharloo, N. 2012. The antimicrobial effect of *ZatariamultifloraBoiss* essential oil against *E.coli* O157: H7 in minced beef during refrigerated storage as a replacement for chemical preservatives in order to maintain the consumers health. *Annals of Military and Health Sciences Research*, 10, 194-197.

[35] Sharafati Chaleshtori, R., Rafieian Kopaei, M., Rokni, N., Mortezaei, S., Sharafati Chaleshtori, A. 2013. Antioxidant activity of *Zataria Multiflora*hydroalcoholic extract and its antibacterial effect on *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 22, 88-94.

[24] Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94, 223-253.

[25] Behdani, M., Ghazvini, K., Mohammadzadeh, A., Sadeghian, A. 2009. Antibacterial activity of Henna extracts against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeroginosa*. *Quarterly of Horizon of Medical Sciences*, 15, 46-51.

[26] Kermanshahi Roha, K., Nasr esfahani, B., Poorbabaii, A.A., Asghari, G., Esmi sarkani, Z. 2009. Evaluation of alcoholic extract of Razak (*Humulus lupulus*) against some gram-negative bacteria and gram-negative bacteria. Journal of Medicinal Plants, 9, 92-97.

[27] Simões-Gurgel, C., Rocha, A.S., Cordeiro, L.S., Gayer, C.R.M., Castro, T.C., Coelho, M.G.P., Albarello, N., Mansur, E., Rosa, A.C.P. 2012. Antibacterial activity of field-grown plants, in vitro propagated plants, callus and cell suspension cultures of *Cleome rosea Vahl*. *J Pharm Res*, 5, 3304-3308.

[28] Khosravinia, S., Ziaratnia, S.M. Bagheri, A., Marashi, S.H. 2013. Investigation of antibacterial effects of cell suspension culture and comparison by essential oils and seed extract in *Bunium persicum*. *Journal of research and innovation in food science and technology*, 2, 79-92.

[29] Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79.

[30] Soltan Dallal, M.M., Bayat, M., Yazdi, M.H., Aghaamiri, S., Meshkani, M.G., Abedi Mohtasab, T.P., Shojaee Sadi, B. 2012.

Antimicrobial effect of Cardin (*Biarum bovei*) extract against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Studies in vitro and hamburger

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

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran
2. MSc, Department of Food Science and Technology, Khazar Institute of Higher Education, Iran

(Received: 2017/10/14 Accepted:2018/01/08)

Evaluation of the antimicrobial activity of plant extracts and essential oils has grown dramatically in recent years. In this study, the antimicrobial effect of Cardin extract (*Biarum bovei*) in vitro and hamburger on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria and total countt is investigated. At first, different concentrations of Cardin hydroalcholicextract was prepared. Antibacterial effects of extracts were evaluated by agar method (disc and wells), minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration (by dilution method) and time-killing curves. Antimicrobial activity of extract against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*and its effect on total microbial count in hamburger at -12 °C during storage (0, 15, 30 and 45 days) was studied. In diffusion method, with increasing concentration, the diameter of inhibition increased. MIC of extract for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, was 25 and 12.5 mg/ml and MBC was 50 and 50 mg/ml, respectively. After treatment the hamburger samples with different concentrations of the extract, it was found that antimicrobial activity increased with increasing the concentration and decreasing the temperature. Thus, it can be concluded that hydroalcoholic Cardinextract can be replaced by synthetic materials as a natural antimicrobial compoundto improve durability.

Keywords: *Staphylococcus aureus***,** *Escherichia coli***,** Antimicrobial activity**,** Cardin**,** Hamburger

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