اثر ضد میکروبی عصاره آبی گلبرگ زعفران بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی

لیلا اعظمی[۱]، علیرضابابا‌پور[۱*]، میثم قره چاهی[۱]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: alireza.babapour@live.com

(دریافت مقاله: ۹۱/۳/۳ پذیرش نهایی: ۹۱/۸/۲۴)

چکیده

با توجه به نگرانی‌های عمومی در خصوص عوارض نگه‌دارنده‌های شیمیایی، تمایل به مصرف محصولات فاقد مواد نگه‌دارنده و یا داری نگه‌دارنده‌های طبیعی افزایش یافته است. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی عصاره آبی گلبرگ زعفران در محیط آزمایشگاهی و با بکارگیری روش دیسک انتشاری بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *اشریشیا کولای* $O_{157}:H_7$، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* که از مهمترین باکتری‌های ایجادکننده مسمومیت و عفونت غذایی هستند، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) عصاره گلبرگ زعفران به روی ٤ باکتری مورد مطالعه به روش رقت-سازی در محیط کشت جامد و محیط کشت مایع مورد مطالعه قرار گرفت. در بین باکتری‌های مورد مطالعه *سالمونلا تیفی‌موریوم* حساس‌ترین باکتری و *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* $O_{157}:H_7$ به عنوان مقاوم‌ترین باکتری شناسایی گردید. به علاوه بر اساس نتایج حاصله میزان MIC عصاره آبی گلبرگ زعفران در روش میکرودایلوشن برای تمام باکتری‌های فوق ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. مطالعه حاضر نشان داد، عصاره آبی گلبرگ زعفران را می‌توان به عنوان نگه‌دارنده طبیعی بر ضد باکتری-های فوق استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: عصاره آبی زعفران، باکتری‌های بیماری‌زای غذایی، حداقل غلظت ممانعت‌کننده

مقدمه

بیماری‌های حاصل از مصرف غذاهای آلوده به باکتری‌های بیماری‌زا از اهمیت فراوانی در بهداشت عمومی برخوردار بوده و سالانه خسارات مالی وجانی فراوانی را به جوامع تحمیل می‌نماید (Sharon, 2001). در سال ۱۹۹۹ مرکز کنترل و پیش‌گیری بیماری‌ها اعلام کرد که سالانه ٧٦ میلیون نفر در ایالات متحده براثر میکروب‌های بیماری‌زا با منشأ مواد غذایی بیمار می‌شوند (Oussalah et al., 2007). چنین بیماری‌هایی سالانه منجر به ۲۲۵۰۰۰ مورد بستری در بیمارستان و ۵۰۰۰ مورد مرگ می‌گردند (Oussalah et al., 2007). مطابق ارزیابی دپارتمان کشاورزی ایالات متحده

(USDA) هزینه‌های پزشکی و زیان‌های اقتصادی ناشی از دورریزی مواد غذایی ایجادکننده بیماری غذایی در محدوده ٦/٥ تا ٣٤/٩ بیلیون دلار در هرسال است (Vahidi et al., 2002). کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی از نظر قوانین استاندارد کیفی مواد غذایی و همچنین از نظر بهداشت و سلامت عمومی حائز اهمیت فراوان است. یکی از راه‌های کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی استفاده از نگه‌دارنده‌ها و ترکیبات ضد میکروبی می‌باشد (Erturk O., 2006). افزودن مواد شیمیایی به منظور نگه‌داری مواد غذایی معمولاً بر مبنای جلوگیری از رشد میکروبی و یا کشتن و از بین بردن گروه‌هایی از میکروارگانیسم‌های مضر می‌باشد. با توجه به نگرانی‌های عمومی در خصوص عوارض نگه-دارنده‌های شیمیایی تمایل به مصرف محصولاتی است که فاقد نگه‌دارنده بوده و یا از نگه‌دارنده طبیعی استفاده شده است. به همین دلیل در سال‌های اخیر مطالعات زیادی پیرامون نگه‌دارنده‌های طبیعی صورت گرفته است. عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل‌دهنده آنها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی می‌باشند (Canillac and Mourey, 2001). از جمله این نگه‌دارنده‌ها اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مانند زعفران است. زعفران گیاهی کوچک و چندساله از خانواده زنبق که کلاله‌ی خشک شده گل این گیاه به عنوان زعفران در صنایع غذایی (به عنوان ادویه معطر و برای رنگین کردن غذا) و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف نهایی استفاده از عصاره‌های طبیعی و گیاهی جهت افزایش عمر نگه‌داری مواد غذایی و ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زای غذایی، است و در صورت داشتن چنین اثری به راحتی می‌توان از این ماده در صنایع غذایی استفاده نمود تا علاوه بر برآورده کردن خواست مصرف‌کنندگان برای نگه‌دارنده‌های طبیعی و افزایش عمر نگه‌داری مواد غذایی و بالا بردن سطح ایمنی مواد غذایی از هدر رفتن یک فرآورده فرعی جلوگیری نمود. مطالعات مختلفی در ارتباط با اثر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مختلف بر روی پاتوژن‌های مهم غذایی در محیط کشت و غذا انجام شده است ولی تاکنون مطالعه‌ای روی اثرات ضدمیکروبی گلبرگ زعفران صورت نگرفته است. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره گلبرگ زعفران بر روی مهمترین باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *اشریشیاکولای* (*Escherichia coli* $O_{157}:H_7$)، *سالمونلا تیفی موریوم* (*Salmonella typhimurium*)، *لیستریامونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogene*) و *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورد مطالعه

شامل باکتری‌های *Escherichia coli* $O_{157}:H_7$، *Salmonella typhimurium phage type 2 19118*، *Staphylococcus aureus ATCC 6538*، *Listeria monocytogenes ATCC* و *Bacillus cereus 11778ATCC* می‌باشد (متعقل به شرکت Chr-Hansen کشور دانمارک) این باکتری ها در محیط آبگوشت BHI دردمای ٣٧ درجه سلسیوس به مدت ١٨-١٦ساعت حداقل دو بار متوالی کشت داده

شده و سپس از کشت دوم به نسبت ۵ به ۱ با گلیسیرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب‌های اپندرف در ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد (Vahidi et al., 2002).

استخراج عصاره‌های آبی

گلبرگ زعفران مورد مطالعه از مزرعه‌ای واقع در شهرستان قائن جمع آوری و خشک گردید. جهت تهیه عصاره‌های آبی،۵۰ گرم از گلبرگ خشک شده با ٤٥٠ میلی لیتر آب مقطر با استفاده از همزن به مدت ٢٤ ساعت عصاره‌گیری شد. عصاره استخراج شده با دستگاه روتاری اواپوراتور تغلیظ و در فور ٤٠ درجه سلسیوس خشک گردید. سپس عصاره‌ها جهت خشک شدن نهایی لیوفلیزه شد. برای لیوفلیزه کردن عصاره‌ها از دستگاه لیوفلیزه (شرکت آرمیتا طب نوین، ایران) موجود در دانشکده داروسازی دانشگاه تهران استفاده شد. عصاره خشک شده تا زمان مصرف در شیشه‌های رنگی و در یخچال نگه‌داری شد (Takdani, 2001).

آماده‌سازی کشت‌های باکتریایی

ابتدا کشت‌های نگه‌داری شده در۲۰- درجه سلسیوس به محیط آبگوشت BHI منتقل شده و ۱۸- ١٦ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس از این محیط کشت Slant تهیه شد و جهت استفاده در طول آزمایش در یخچال ٤ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. برای تهیه دوز تلقیح باکتری‌ها از روش سنجش جذب نوری با استفاده از اسپکتوفتومتر استفاده گردید. باکتری‌ها از Slant تهیه شده به براث منتقل و به مدت ۱۸-١٦ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. از باکتری گرم‌خانه‌گذاری شده برای تهیه سوسپانسیون با جذب نوری ۰/۱ استفاده شد. ابتدا دستگاه اسپکتوفتومتر (PG- t80 uv/wis spectometr انگلستان) در طول موج ٦٠٠nm تنظیم شده و توسط لوله شاهد حاوی BHI استریل جذب نوری روی عدد صفر تنظیم شد. از باکتری گرم‌خانه‌گذاری شده مقدار مناسبی به کووت حاوی ٤ میلی‌لیتر محیط آبگوشت BHI استریل اضافه و جذب نوری قرائت گردید. این کار تا حدی ادامه داده شد تا جذب نوری این لوله به ۰/۱ رسید. تعداد باکتری‌های این کووت به روش کشت سطحی شمارش شد. در مراحل بعدی با تهیه سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ و رقیق‌سازی دوز تلقیح مورد نظر تهیه شد.

تعیین حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه در مقابل عصاره‌های گلبرگ زعفران به روش دیسک انتشاری

در این مطالعه ابتدا سوسپانسیون باکتریایی از باکتری‌های مورد مطالعه باجذب نوری ۰/۱ تهیه شده و سپس با استفاده از سوآب سطح پلیت‌های حاوی محیط آگار BHI با باکتری‌های مورد نظر تلقیح شد. بعد از اینکه سطح پلیت خشک شد، دیسک‌های کاغذی حاوی ٦٠ میلی‌گرم از عصاره مورد مطالعه به پلیت منتقل و به مدت ٢٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. بعد از این مدت قطر هاله مهار رشد اندازه‌گیری و هر تیمار دو بار تکرار شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش آگاردایلوشن

ابتدا محیط کشت آگار BHI را آماده نموده و حجم‌های ۱۹ میلی لیتر از آگار حاوی ۱۰٪ DMSO در لوله‌های یونیورسال توزیع گردید. بعد از استریل نمودن محیط کشت و سرد شدن محیط تا دمای ۵۰ درجه ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌های فیلتر شده با

غلظت‌های برابر صفر، ۱۰، ۲۰ و ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر را اضافه نموده و با استفاده از ورتکس به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کرده و در پلیت‌های با غلظت‌های مورد استفاده عصاره‌های آبی، پخش گردید. همچنین در پلیت کنترل ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۱۰٪ DMSO ریخته شد.

بعد ازپخش کردن محیط کشت‌های حاوی رقت‌های مختلف عصاره در پلت، مقدار۵ میکرولیتر از باکتری‌های مورد نظر توسط سمپلر به صورت نقطه‌ای تلقیح شد (به نحوی که در هر۵ میکرولیتر برابر 10^3 باکتری موجود باشد). سپس پلیت‌ها در انکوباتور به مدت ٢٤ ساعت و ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه-گذاری شد (Erturk, 2006) و غلظت‌های ماده مورد نظر در پلیت‌هایی که بیشتر از ۹۹٪ سبب ممانعت از رشد شده بود تحت عنوان MIC برای ارگانیسم زیربط لحاظ گردید.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش براث میکرودایلوشن

جهت تعیین MIC از روش میکرودایلوشن استفاده گردید. در این روش از پلیت‌های ۹٦ چاهکی استفاده می‌شود و تعیین MIC در این روش بر پایه مشاهده چشمی کدورت می‌باشد. در این مطالعه از پلیت ۹٦ خانه با چاهک ته‌گرد با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده شد. غلظت‌های مورد استفاده عصاره آبی گلبرگ زعفران برابر صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ٤٠ میلی‌گرم در میلی لیتر بود. برای تعیین MIC به این روش ابتدا مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در DMSO ۱۰٪ حل شد و توسط فیلتر ۰/٤۵ میکرومتر استریل و سپس غلظت‌های تعیین شده از آن توسط آبگوشت BHI تهیه گردید (غلظت نهایی DMSO ۵٪ می‌باشد). ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره آبی به هر چاهک انتقال داده شد. سپس به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد. غلظت نهایی باکتری در هر چاهک برابر 10^4 CFU/ml بود (تعداد دقیق باکتری از طریق کشت سطحی و شمارش پرگنه تأیید شد). در چاهک کنترل ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۵٪ DMSO به همراه باکتری تلقیح گردید. محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه با استفاده از پلیت شیکر مخلوط گردید. پلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شده و بعد از اتمام گرم‌خانه‌گذاری کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده شد.

یافته‌ها

تعیین حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه به عصاره آبی گلبرگ زعفران به روش دیسک انتشاری

نتایج اثر عصاره آبی گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$، *سالمونلا تیفی موریوم*، *لسیتریا مونوسیتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* در روش انتشار از دیسک درجدول ۱ آمده است. در مورد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* عصاره مورد مطالعه سبب مهار رشد باکتری گردیده و قطر هاله عدم رشد در خصوص عصاره آبی ۲۱ میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. در مورد باکتری *باسیلوس سرئوس* مهار رشد مشاهده نشد. در مورد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ عصاره مورد مطالعه نتوانست رشد باکتری را

مهار کند و در رابطه با باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* هم عصاره آبی نتوانست باعث مهار رشد شود.

جدول ۱: قطر هاله مهار رشد باکتری‌های مورد مطالعه تحت اثر عصاره آبی گلبرگ زعفران

باکتری های مورد مطالعه	قطر هاله مهار رشد (میلی متر)
Salmonella typhimurium	۲۰
Staphylococcus aureus	-
Listeria monocytogene	-
Bacillus cereus	-
Escherichia coli O157:H7	-

نتایج تعیین MIC عصاره آبی گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های مورد مطالعه به روش آگاردایلوشن

نتایج تعیین MIC عصاره آبی گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های مورد مطالعه در روش آگار دایلوشن در جدول ۲ آمده است. بر اساس نتایج حاصله میزان MIC عصاره آبی در این روش برای تمامی باکتری‌های فوق برابر ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. غلظت‌های پایین‌تر از ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثری بر رشد باکتری‌های مورد مطالعه نداشتند.

جدول ۲: حداقل غلظت بازدارنده عصاره آبی گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های مورد مطالعه به روش آگار دایلوشن

باکتری‌های مورد مطالعه	حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC)
Salmonella typhimurium	٤٠
Staphylococcus aureus	٤٠
Listeria monocytogene	٤٠
Bacillus cereus	٤٠
Escherichia coli O157:H7	٤٠

نتایج تعیین MIC عصاره آبی گلبرگ زعفران به روش براث میکرودایلوشن

نتایج MIC عصاره آبی گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های مورد نظر در روش میکرودایلوشن در جدول ۳ آمده است. در مورد عصاره آبی تا غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره، در تمام چاهک‌های مربوط به تمام باکتری‌ها کدورت حاصل از رشد باکتری قابل تشخیص بود در حالیکه در چاهک‌های حاوی ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره در مورد تمام باکتری‌ها هیچ کدورتی مشاهده نگردید و MIC عصاره در برابر تمام باکتری‌های مورد مطالعه ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید.

جدول ۳: حداقل غلظت بازدارنده (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره آبی گلبرگ زعفران علیه باکتری‌های مورد مطالعه به روش میکرو دایلوشن

باکتری‌های مورد مطالعه	حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC)
Salmonella typhimurium	٤٠
Staphylococcus aureus	٤٠
Listeria monocytogene	٤٠
Bacillus cereus	٤٠
Escherichia coli O157:H7	٤٠

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری‌های قابل انتقال از مواد غذایی از اهمیت فراوانی در بهداشت عمومی برخوردار بوده و سالانه خسارات مالی وجانی فراوانی را به جوامع تحمیل می‌نماید (Vanne et al., 1996). در این مطالعه اثر عصاره آبی گلبرگ زعفران بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$،

سالمونلا تایفی موریوم، *لستیریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس* مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نگرانی مصرف‌کنندگان و متولیان بهداشتی در مورد استفاده از نگه‌دارنده‌های شیمیایی و مضرات آنها، در سال‌های اخیر تولیدکنندگان مواد غذایی به استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی در مواد غذایی گرایش پیدا نموده‌اند. لذا مطالعات مختلفی در ارتباط با اثر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مختلف بر روی پاتوژن‌های مهم غذایی در محیط کشت و غذا انجام شده است (Arques et al., 2005; Ozkan et al., 2003; Erturk, 2006; Zhang et al., 2004; Singh et al., 2001). در سال ۲۰۰۷ فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های *تکریوم مونتانوم* مورد بررسی قرار گرفت در این مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه فوق را علیه ۱۳ گونه باکتری و ۳ گونه قارچ با روش انتشار از دیسک به اثبات رسید (Vukovic et al., 2007).

Sharifa و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر عصاره اتانولی، متانولی و آبی گیاه *پلانتاگو ماجور* را به روی باکتری‌های گرم منفی، گرم مثبت و مخمر آزمایش کردند. در این مطالعه نشان داده شد که عصاره متانولی این گیاه دارای اثرات ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* با MIC برابر ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و *اشریشیاکولای* با MIC برابر۱۲۰میلی گرم در میلی‌لیتر است. عصاره اتانولی نیز اثرات ضد میکروبی را در ۱۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داد. هیچ یک از عصاره‌ها بر *باسیلوس سوبتیلیس* اثری نداشتند. عصاره آبی نیز اثر ضد میکروبی از خود نشان نداد (Sharon, 2001). Singh و همکاران در سال ۲۰۰۱ فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه *اورامنتال سی آنمون* را علیه باکتری‌های پاتوژن غذایی نشان دادند. این مطالعه نشان داد که عصاره فوق می‌تواند مانع از رشد باکتری‌های بیماری‌زا شود (Singh et al., 2001). فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های میوه کف کومین تهیه شده از مناطق مختلف توسط Parlatan و همکاران در سال ۲۰۰۸ مورد مطالعه قرار گرفت. عصاره گیاه اثرات ضد میکروبی چشمگیری روی باکتری‌های بیماری‌زا داشت. در اسانس این گیاه اثر ضد میکروبی مشاهده نشد (Sharifa et al., 2008). مطالعات دیگر Skandamis و همکاران در ۲۰۰۲ بر روی اثرات ضد باکتری و قارچی برخی از اسانس‌ها و عصاره‌های طبیعی گیاهی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا مهم غذایی در مدل‌های غذایی و محیط کشت انجام شده است (Skandamis et al., 2002; Islam et al., 2008). عصاره ۱۸ گونه گیاهی علیه ۲۳ سویه باکتریایی در مقایسه با ۱۱ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌ها اثرات ضد باکتریایی چشمگیری از خود نشان دادند (Parlatan et al., 2008). Sengul و همکاران در سال ۲۰۰۹ طی مطالعه ای خواص ضد میکروبی عصاره فنولیک برخی گیاهان دارویی را نشان دادند. عصاره متانولی گیاه *ویکام آلبوم و آلکانا تینکتوریا* خواص ضد میکروبی را علیه ۹ باکتری از ۳۲ باکتری مورد آزمایش از خود نشان داد. به علاوه عصاره *اینولا آچرانا* فعالیت ضد میکروبی را علیه ۱۵ باکتری از ۳۲ باکتری مورد آزمایش از خود نشان داد (Sengul et al., 2009).

بررسی اثر ضد میکروبی چند نوع عصاره مختلف میوه گیاه توسط Jalali (۲۰۰۸) انجام شد. در این مطالعه

اثرات ضد میکروبی یکی از اعضای خانواده چتریان گیاه سگ دندان خاردار بررسی گردید. در این مطالعه عصاره‌های هیدروالکلی، هگزانی، کلروفرمی و متانولی گیاه تهیه گردید و اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس آزمایشات فوق عصاره‌های مورد استفاده بر روی *باسیلوس سوبتیلیس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* اثر ضد میکروبی داشتند. عصاره هیدروالکلی دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بود (Jalali, 2007). اثرات ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی *کالستیموس سیترینوس* و *آلبزیا لبک* توسط Seyydnejad و همکاران (۲۰۱۰) بررسی شد. در این مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی بر روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس آنتراسیس*، *سالمونلا تیفی*، *استرپتوکوکوس اپیدرمیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *پزدوموناس آئروژنز* و *اشریشیا کولای* انجام شد. عصاره *الستیموس سیترینوس* اثرات چشمگیری علیه اکثر باکتری‌های فوق نشان داد که قابل مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. عصاره هیدروالکلی *آلبزیا لبک* برخلاف عصاره قبلی اثرات چشمگیری از خود نشان نداد (Parlatan et al., 2008). اثرات ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی تعدادی از گیاهان دارویی علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* توسط Jalali (۲۰۰۸) بررسی شد. در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی ۵ گیاه بومی و در دسترس ایران به نام‌های آویشن، اکالیپتوس، بابونه، رزماری و مریم گلی به روی دو سروتیپ بیماری‌زای 4a و 4b باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* بررسی گردید. در این مطالعه MIC و MBC به روش ماکرودایلوشن تعیین گردید. این مطالعه نشان داد که عصاره اکالیپتوس می‌تواند به عنوان ترکیب ضد لیستریایی مطرح باشد و در غذا نیز می‌توان از آن به عنوان ماده حفاظت‌کننده استفاده نمود. در تحقیق از عصاره گیاه آویشن شیرازی هیچ‌گونه اثر ضد باکتریایی مشاهده نگردید (Jalali, 2007). Abu-Shanab و همکاران (۲۰۰۶) اثر ضد میکروبی عصاره خالواش را علیه استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) بررسی کردند و نشان دادند هم عصاره آبی و هم عصاره الکلی این گیاه روی این باکتری‌ها موثر می‌باشد و MIC عصاره الکلی این گیاه ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر تا ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد (Abu-Shanab et al., 2006). Nair و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی و الکلی چند گونه گیاهی از جمله *منتا آرونی* را بررسی کردند و نشان دادند که عصاره های الکلی از عصاره‌های آبی قوی‌تر است. همچنین در این مطالعه *سالمونلا تیفی موریوم* و *پزدوموناس آئروجینوزا* به این عصاره‌ها مقاوم بودند. در حالی که *باسیلوس سرئوس* و *پروتئوس میرابلیس* بیشترین حساسیت را داشتند (Nakhaei et al., 2008). اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره‌های اتانولی ۱۱ گونه گیاهی توسط Erturk (۲۰۰۶) بررسی شد. در این مطالعه ۱۱ گونه گیاهی از مناطق مختلف ترکیه جمع‌آوری شد و فعالیت ضد باکتریایی روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی بررسی شد. اثر ضد باکتریایی برخی از این گیاهان تأیید شد (Erturk, 2006). در خصوص اثرات بازدارندگی زعفران و ترکیبات آن تاکنون مطالعاتی انجام شده

است، از جمله Vahidi و همکاران (۲۰۰۲) اثرات ضد میکروبی عصاره قسمتهای مختلف زعفران از جمله برگها، مادگی و کرولا را علیه باکتری های *اشریشیا کولای*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، میکروکوکوس و قارچ‌ها بررسی و اثرات ضد میکروبی آنها را گزارش نمودند. MIC عصاره‌های مورد نظر اندازه‌گیری شد. نتایج کسب شده نشان از فعالیت بالای عصاره اتیل استاتی استخراج شده از قسمت‌های مختلف گیاه به جز برگ‌ها علیه ارگانیسم‌های فوق بود (Vahidi et al., 2002). در مطالعه‌ای توسط Razagi و همکاران اثرات ضد میکروبی کلاله زعفران به روی سه سویه میکروبی *اشریشیا کولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصله نشان داد سافرانال موجود در زعفران باعث بازدارندگی رشد سویه‌های *اشریشاکولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* شده است (Razagi, 2003). اثر سمیت سلولی عصاره تام زعفران برروی سلول‌های کارسینومای کبد انسان توسط Tavakol و همکاران مورد بررسی قرار گرفت و اثر مهارکنندگی رشد سلول‌های سرطانی به اثبات رسید (Tavakol, 2003). همچنین اثر ضد هلیکوباکتری زعفران هم توسط محققین گزارش گردیده است. در این مطالعه MIC عصاره متانولی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که زعفران اثرات ضد هلیکو باکتریایی متوسطی دارد (Oussalah et al., 2007). تاکنون مطالعه‌ای روی اثرات ضد میکروبی گلبرگ زعفران صورت نگرفته و این مطالعه می‌تواند از این نظر حائز اهمیت باشد. ولی در خصوص خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه زعفران مطالعاتی انجام شده است. Tajalli و همکاران (۲۰۰۹) اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گلبرگ زعفران را بررسی کردند. نتایج نشان داد درصد بازدارندگی عصاره گلبرگ با زیاد شدن میزان غلظت افزایش می‌یابد. در مجموع نشان داده شد که گلبرگ زعفران یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی و سهل الوصول بوده که غلظت ۳۰۰pmm عصاره آن بیشترین درصد بازدارندگی را دارد (Tajalli, 2008). بررسی اثر ضدتومور و سمیت سلولی کلاله و گلبرگ زعفران توسط Hoseinzade و همکاران (۲۰۰۵) نیز گزارش شد. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق عصاره‌های الکلی و گلبرگ زعفران سبب کاهش تعداد تومورهای ایجاد شده توسط اکروباکتریوم شدند و اثر ضد توموری با این روش نشان داده شد (Hoseinzade, 2005). یکی از دلایل تفاوت در میزان MIC در مطالعات مختلف اختلاف ترکیب عصاره‌ها می‌باشد. ترکیبات عصاره‌های حاصل از یک گونه گیاهی می‌تواند بر اساس جغرافیای منطقه، فصل برداشت، سن گیاه، مرحله رشد و روش خشک کردن و استخراج متفاوت باشد. به طور کلی عصاره در گیاه در طی گل‌دهی و یا بلافاصله پس از گلدهی دارای بیشترین فعالیت ضد میکروبی است. همچنین ترکیبات عصاره‌های بدست آمده از بخش‌های مختلف یک گیاه خاص نیز فعالیت ضد میکروبی متفاوتی دارد. همچنین حساسیت باکتری‌های مختلف نسبت به عصاره‌های مختلف متفاوت می‌باشد. Islam و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که عصاره‌های گیاهان علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی مؤثر است (Islam et al., 2008). همچنین اختلاف در روش‌های ارزیابی بررسی خواص ضد

باکتریایی عصاره‌ها می‌تواند سبب نتایج متفاوت در میزان MIC محاسبه شده در تحقیقات مختلف شود. به طوری که در مطالعه حاضر نتایج روش دیسک انتشاری با نتایج تعیین MIC قابل مقایسه نمی‌باشد. روش دیسک انتشاری یک روش غربالگری تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به مواد بازدارنده می‌باشد و این روش یک روش کیفی مقدماتی است و نتایج دقیقی ندارد. این مطالعه نشان می‌دهد که نتایج تعیین MIC به روش آگار دایلوشن بجز در مورد عصاره اتانولی با نتایج میکرو دایلوشن هم‌خوانی دارد. روش آگار دایلوشن روش مناسبی در تست‌های ضد میکروبی می‌باشد که نتایج قابل اعتمادی را به همراه دارد اما به علت سختی روش، روشی معمول در آزمایشگاه‌ها نمی‌باشد و بیشتر روش براث دایلوشن مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج این مطالعه به طور کلی نشان‌دهنده اثر ضد میکروبی عصاره آبی گلبرگ زعفران بر باکتری‌های مورد نظر می‌باشد و MIC عصاره ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید و به همین دلیل امکان استفاده از این عصاره در صنایع غذایی وجود دارد. همچنین به دلیل طعم و عطر مناسب گلبرگ امکان استفاده از غلظت‌های بالاتر وجود دارد. همچنین از آنجایی که گلبرگ به عنوان یک ماده جانبی در تولید زعفران می‌باشد که دور ریخته می‌شود بنابراین عملی نمودن استفاده از این ماده در صنعت غذایی می‌تواند راه‌گشا باشد.

منابع

- Abullaev, FI. (2002). Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron, 227(1): 20-25.
- Abu-Shanab, B., Adwan, G., Jarrar, N., Abu-hijleh, A. and Adwan, K. (2006). Antibacterial activity of four plant extracts used in Palestine in Folkloric Medicine against Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus*. Turkish Journal of Biology, 30: 195-198.
- Arques, J.L., Rodriquez, E., Gaya, P., Medina, M. and Nunez, M. (2005). Effect of combinations of high pressure treatment and bacteriocin producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. International Dairy Journal, 15: 893-900.
- Canillac, N. and Mourey, A. (2001). Antibacterial activity for the essential oil of picea excelsa on Listeria, *Staphylococcus aureus* and colifom bacteria. Food Microbiology, 18: 261-268.
- Chi-Zhang, Y., Yam, K.L., Chikindas, M.L. (2004). Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. International Journal of Food Microbiology, 90(1): 15-22.
- Erturk, O. (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. Section Cellular and Molecular Biology, 61(3): 275-278.
- Fisgin, N.T., Cayci, Y.T., Coban, A.Y., Ozatli, D., Tanyel, E., Durupinar, B. and Tulek, N. (2009). Antimicrobial activity of plant extracts Ankaferd Blood Stopper. Fitoterapia, 80: 48-50.
- Hosein zade, H. (2005). Effect of anti-tumor cytotoxicity of saffron stigma and petal discs of potato and brineshrimp. Herb Quarterly, 4(15): 59[In Farsi].
- Islam, M.J., Barua, S., Das, S., Khan, M.S. and Ahmad, A. (2008). Antibacterial activity of some indigenous medicinal plants. Journal of Soil of Nature, 2(3):26-28.

- Jalali, M. (2008). Antimicrobial effects of ethanol extracts of some medicinal plants against *Listeriamonocytogenes*. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 8(3): 23-25[In Farsi].
- Jalali, M. (2007). Several different types of fruits, plant extracts microbial Asrzd review Pycnocycla spinosa. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 17(59): 26-37[In Farsi].
- Lee, S., Musa, N., Wendy, W., Musa, N. and song, C.T. (2007). Antimicrobial property of 12 spieces and methanol extract of Oramental sea anmon against Edwarsiella agent and other bacteria. Advanced in Biological Research, 1(5-6): 164-166.
- Mirheydar, H. (1996). Herbal Education. Office of the Islamic culture. Volume 2, 2nd Edition[In Farsi].
- Mortazavi, A. (2002). Food Microbiology. Mashhad Ferdowsi University Press, pp. 559-531[In Farsi].
- Mortazavi, A. (2006). Modern Food Microbiology. Mashhad Ferdowsi University Press, pp. 285-479[In Farsi].
- Nair, R. and Chanda, S.V. (2007). Antibacterial activities of some medicinal plants of the western region of India. Turkish Journal of Biology, 31: 231-236.
- Nakhaei, M., Khajeh-Karamoddin, M. and Ramezani, M. (2008). Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by saffron (*Croccus sativus* L). Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 11(2): 91-96.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E.coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control, 18: 414-420.
- Ozkan, G., Ozcan, M., Karahan, A.G. and Sagdic, O. (2003). Effect of some spice extracts on bacterial inhibition. Food Science and Technology International, 9(5): 353-358.
- Parlatan, A., Saricoban, C. and Zcan, M.M. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the extracts of Kefe cumin (*Laser trilobum* L) fruits from different regions: International Journal of Food Science and Nutrition, 84(1): 22-25.
- Razaghi, R. (2003). Investigation of antibacterial compounds of saffron stigma. Third National Conference on Saffron, Iran[In Farsi].
- Razavilar, V. (2002). Epidemiology of pathogenic microbes in food and food poisoning. Printing, Publishingand Printing Institute of Tehran University, pp. 154-1[In Farsi].
- Report of Research Project Search and anthocyanins extracted from the petals of saffronand its stability in a model beverage. Iranian Research Organization for Science and Technology-Food Technology Research Institute of Iran[In Farsi].
- Rios, J.L., Recio, M.C., Giner, R.M. and Manez, S. (1996). An update review of saffron and its active compounds. Phytotherapy Research, 10(3): 189-193.
- Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z. and Ercisly, S. (2009). Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. Pakistanian Journal of Pharmacology, 22(1): 102-106.
- Seyydnejad, S.M., Niknejad, M., Darabpoor, I. and Motamedi, H. (2010). Antibacterial Activity of Hydroalcoholic Extract of Callistemon citrinus and Albizia lebbeck. American Journal of Applied Sciences, 7(1): 13-16.
- Sharifa, A.A., Neoh, Y.L., Iswadi, M.I., Khairul, O., Abdul Halim, M., Jamaludin, M., Mohamed Azman, A.B. and Hing, H.L. (2008). Effects of Methanol, Ethanol and Aqueous Extract of *Plantago major* on Gram Positive Bacteria. Gram Negative Bacteria and Yeast, 8: 42-44.
- Sharon, B. (2001). Electroimmunoassay technology for foodborn pathogen detection. IVD Technology, 16: 13-34.

- Singh, B., Bernadette, F.M. and Adams, M.R. (2001). Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic exteract. Food Microbiology, 18: 133-139.
- Skandamis, P., Tsingarida, E. and Nychas, G-J.E. (2002). The effect of organo essential oil on survival/death of *salmonella thyphimurium* in meat stored at 5º under aerobic, VP/MAP Conditions. Food Microbiology, 19(1): 97-103.
- Tajalli, F. (2008). Two methods to determine antioxidant properties of saffron petals DPPH and linoleic acid model system. The National Congress of Food Science and Technology, Iran[In Farsi].
- Takdani, A. (2001). Saffron and its medicinal properties. Third National Conference on Saffron, Iran [In Farsi].
- Tavakol, A. (2003). Effect of human liver carcinoma cells on cellcytotoxicity saffron. Third National Conference on Saffron, Iran[In Farsi].
- Tayel, A.A., EL-Tras, W.F. (2009). Possibility of fighting foodborne bacteria by Egyptian folk medicinal herbs and spices extracts. Journal of Egypt Public Health Association, 84(1-2): 21-32.
- Vahidi, H., Kamalinejad, M. and Sedaghati, N. (2002). Antimicrobial Properties of *Croccus sativus* L. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 1: 33-35.
- Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S. and Sjoberg, A.M. (1996). HACCP-based food quality control and rapid detection methods for micro organisms. Food Control, 7(6): 263-276.
- Vukovic, N., Sukdolak, S., Milosevic, T. and Solujic, S. (2007). Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of Teucrium montanum. eCAM, 4: 17-20.
- Wuthrich, B., Schmid-Grendelmeyer, P. and Lunberg, M. (1997). Anaphylaxis to saffron Allergy, 52(4): 476-477.
- Zahraei, T. (2009). Salmonella. Tehran University Press, pp. 26-37[In Farsi].
- Zlem, B., Medine, G., Fikrettin, H., Hakan, Z., Hamdullah, K., Nevver, M., Kmens, S. and Lin, T. (2006). Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii Afan*. (Asteraceae). Turkish Journal of Biology, 30: 65-73.

Antimicrobial Effect of aqueous extract of saffron petals on some of food-borne bacterial pathogen

Azami, L.[1], Babapour, A.[1*], Garechahi, M.[1]

1- Ph.D Student of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Quality control, Faculty of Specialty Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran.
*Corresponding author email: alireza.babapour@live.com
(Received: 2012/5/23 Accepted:2012/11/14)

Abstract:

Ever-increasing public debates over the adverse effects that may result from exposure to the chemical preservatives have enhanced the interests for the consuming of preservative-free foods or at least the product containing natural preservatives. In this laboratory experiment, the antimicrobial effect of aqueous extracts of Saffron petals against *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O_{157}:H_7, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* were investigated using the disk diffusion method. Moreover, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the extract was assessed by agar dilution and broth microdilution method. According to the results, *S. typhimurium* was found as the most sensitive, while, *S. aureus* and *E. coli* O_{157}:H_7 as the most resistant species. MICs of the extract by microdilution method were estimated at 40 mg/ml for all of the 4 bacterial species. The results also revealed that the extract of Saffron petals could be used as a natural preservative against the aforementioned bacteria.

Key words: Saffron aqueous extract, Food-borne bacterial pathogens, Minimum Inhibitor concentration (MIC)