اثر ضد میکروبی پودر عصاره برگ نوروزک در برابر استافیلوکوکوس اورئوس در همبرگر (پوستر)

محمد حسین حداد خداپرست (۱)، هادی مهدویان مهر (۲)، زهره حسینی (۲) و مژگان یوسفلی (۳)

۱- عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد، ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی منابع طبیعی گرایش مدیریت مناطق بیابانی- دانشگاه تهران

چکیده

نگهداری غذا امروزه شامل بکار بردن روشهایی جهت به حداقل رساندن آلودگی است که یکی از این راهها افزودن مواد نگهدارنده غذایی می باشد. این مواد با دخالت در اعمال غشای سلولی، فعالیت آنزیمی یا ساختارهای ژنتیکی بر ریزسازواره ها اثر بازدارندگی دارند. در این تحقیق اثر پودر عصاره نوروزک در ٤ سطح و در ۳ دوره زمانی ۱۵، ۳۰ و ٤۵ روز بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و شمارش کلی در همبرگر نگهداری شده در دمای ۱۲ċ- مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا استافیلوکوکوس اورئوس به همبرگر اضافه شد و همبرگر به خوبی مخلوط گردید. در مجموع ۵ تیمار مورد بررسی عبارت بودند از: نمونه شاهد Control (همبرگر آلوده به استاف و عاری از پودر عصاره)، نمونه T1 (همبرگر آلوده + ۵۰۰۰ mg/lit عصاره) و T_2,T_3و T_4 هم مشابه T_1 و به ترتیب حاوی ۱۰۰۰۰ mg/lit و ۱۵۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ پودر عصاره بودند. در تمامی تیمارها در دوره های زمانی ذکر شده تعداد استافیلوکوکوس اورئوس و شمارش کلی میکروبها اندازه گیری شد. نتایج حاصل نشان داد که در تمامی سطوح پودر افزوده شده، شاهد کاهش تعداد استافیلوکوکوس اورئوس و شمارش کلی میکروبها هستیم. این تاثیر در روزهای ۱۵ برای استافیلو کوکوس و ۳۰ روز برای شمارش کلی بیشتر نمود داشت. در بین سطوح پودر افزوده شده بیشترین تاثیر را سطح ۲۰۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (T_4) و کمترین تاثیر را سطح ۵۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نشان داد. نتایج حاصل نشان داد که پودر عصاره برگ نوروزک می تواند از رشد استافیلوکوکوس اورئوس در همبرگر جلوگیری نماید. بنابراین می توان استفاده از آن را بعنوان یک ترکیب نگهدارنده طبیعی در فرآورده های غذایی پیشنهاد نمود.

مقدمه

با توجه به اینکه گزارشات مربوط به عفونتهای با منشاء غذایی رو به افزایش می باشد مسئله سلامت مواد غذایی نگرانی عمده ای را هم برای مصرف کنندگان و هم برای صنایع غذایی ایجاد کرده است(۱۰). افزایش میزان بروز بیماریهای حاصل از غذا همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی ناشی از آن لزوم تولید مواد غذایی سالمتر و نیز استفاده از ترکیبات ضد میکروبی جدید را مطرح نموده است. نگرانی در خصوص استفاده از برخی نگهدارنده های شیمیایی و واکنش منفی مصرف کنندگان به استفاده از این مواد موجب افزایش توجه به نگهدارنده های طبیعی به عنوان جایگزین نگهدارنده های شیمیایی شده است. در این میان توجه تولید کنندگان و مصرف کنندگان به استفاده از عصاره های گیاهی معطوف شده است. خواص ضد میکروبی این مواد بر علیه طیف وسیعی از باکتریها، مخمرها و قارچها به اثبات رسیده است. اکثر مطالعات انجام شده در این موارد در محیط های آزمایشگاهی بوده است، لذا اطلاعات کمتری در مورد اثرات آنها در مواد غذایی موجود می باشد(۷). نوروزک گیاهی از خانواده نعناعیان است و بومی مناطق جنوبی خراسان و سمنان بوده، برای اولین بار در سال ۱۹۸۲ در فلور

طبیعی ایران بدان اشاره شده است(۱۱). شاخ وبرگ این گیاه دارای اسانس وخاصیت آنتی بیوتیکی و پوست خارجی آن حاوی موسیلاژ است جنس Salvia چند ساله و غالبا نیز بسیار معطرند. جنس Salvia ، 500گونه دارد که در ایران از این جنس٥٦ گونه گزارش گردیده است گیاه دارویی علوفه ای و صنعتی Salvia leriifolia با نام فارسی نوروزک در ایران از خراسان و سمنان گزارش گردیده است(۸) . همبرگر یکی از فرآورده های گوشتی است که به دلایل گوناگون از جمله سهولت مصرف این ماده غذایی، استفاده از گوشت در ترکیب آن و طعم مطلوب همبرگر، مصرف آن در حال افزایش است. با توجه به مصرف بالای این ماده غذایی، توجه به ویژگیهای مختلف آن، بخصوص کیفیت میکروبی ضروری به نظر می رسد. مهمترین میکرو ارگانیسمهای آلوده کننده همبرگر شامل باکتریهایی از قبیل باسیلوسها، استافیلوکوکها، باکتریهای اسید لاکتیک و مخمرهایی نظیر کاندیدا می باشند. از مهمترین ارگانیسمهای آلوده کننده می توان به استافیلوکوکوس اشاره نمود. حضور استافیلوکوکوس از آن جهت در مواد غذایی حائذ اهمیت است که به دلیل تولید انترو توکسین می تواند سندرم مسمومیت استافیلو کوکال را ایجاد نماید(۱۲). این سندرم در اثر مصرف غذای حاوی انتروتوکسین استافیلوکوکوس به وجود می آید. علائم کلاسیک این مسمومیت عبارتند از دردهای ناحیه شکمی، تهوع و استفراغ و اسهال . در بعضی بیماران سردرد نیز تظاهر می نماید(۳). مطالعاتی در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی، آنتی میکروبی و تغذیه ای برگ نوروزک انجام شده است(۲و٦). اما تاکنون مطالعه ای در مورد فعالیت آنتی میکروبیالی برگ این گیاه در مواد غذایی انجام نشده است. هدف از این پژوهش بررسی فعالیت آنتی میکروبی عصاره الکلی برگهای این گیاه در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و شمارش کلی میکروبی در فرآورده همبرگر است .هدف از این پژوهش در راستای تقلیل بار میکروبی، بخصوص کنترل استافیلوکوکوس اورئوس در همبرگر و در نهایت ایجاد شرایطی است که با مصرف همبرگر ایمنی مصرف کننده تضمین شود.

مواد و روشها

تهیه پودر عصاره نوروزک: برگهای گیاه نوروزک در بهار ۱۳۸۷ پس از جمع آوری از کوههای بخش کوهسرخ واقع در جنوب غرب نیشابور، بلافاصله در دمای اتاق و دور از نور خورشید خشک و سپس پودر شدند. برگ پودر شده(۱:۱۰،حجمی/وزنی) با متانل در طی یک شبانه روز با استفاده از دستگاه همزن در دمای اتاق عصاره گیری شد. عصاره حاصل صاف گردید و مراحل عصاره گیری با حلال تازه تحت همان شرایط برای رسوب مرحله اول تکرار شد. پس از مخلوط کردن عصاره های صاف شده مرحله اول و دوم، عصاره حاصل توسط کربن فعال(۱:۵، وزن برگ/ وزن زغال) رنگبری گردید. در مرحله بعد عصاره توسط قیف بوخنر صاف شده و سپس حلال آن توسط دستگاه تبخیر گردان)دمای٤٥ درجه سانتیگراد) و تحت خلاء جدا شد، و در گرمخانه ٤٥ درجه سانتی گراد و تحت خلاء تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. پس از حذف کامل حلال به شکل پودر به رنگ زرد قهوه ای با بوی اندک ادویه مانند، نمونه جمع آوری گردید (٦). سویه میکروبی : در این مطالعه استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC-1337) مورد نیاز جهت افزودن به همبرگر بصورت آمپول لیوفیلیزه از کلکسیون باکتریها و قارچها، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. فعال سازی سویه میکروبی: آمپول لیوفیلیزه حاوی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس طبق دستورالعمل شرکت سازنده در شرایط کاملاً استریل باز شد. کشت مادر روی محیط کشت تریپتون سویا براث و آگار آماده شد. از کشت مادر، کشت ذخیره شده تهیه شد و در مراحل بعدی استفاده گردید. تهیه سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند: از کشت ذخیره به محیط کشت شیبدار آگار مغذی تلقیح گردید و بمدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. سپس کلنی های سطح محیط کشت با محلول نرمال[۱] سالین شسته شد و سوسپانسیون میکروبی با محلول نرمال سالین رقیق گردید تا میزان جذب سوسپانسیون در طول موج ۵۳۰ نانومتر با میزان جذب محلول ۰/۵ مک فارلند برابر گردد. به عبارت دیگر سوسپانسیون تولیدی حاوی 5/1×108 cfu/gباشد(۹ .(سپس با انجام محسبات لازم مشخص گردید که برای رسیدن غلظت نهایی استافیلوکوکوس اورئوس به 5×105 cfu/gبه ٤ میلی

لیتر از سوسپانسیون فوق نیاز است.. همبرگر از یکی از کارخانه های همبرگر سازی مشهد تهیه شده و به آزمایشگاه انتقال یافت. از این همبرگر بر روی محیط B.P.Aبهمراه سوسپانسیون زرده تخم مرغ و P.C.A کشت بعمل آمد، بلافاصله مقدار ۱۲۰۰ گرم همبرگر با ٤ میلی لیتر سوسپانسیون حاوی استافیلوکوکوس اورئوس مخلوط شد. از این همبرگر نیز بمنظور کنترل غلظت استافیوکوکوس در محیط های فوق کشت بعمل آمد. در شرایط استریل ۱۰ نمونه ۲۰ گرمی از مخلوط حاصل درون ظروف پلاستیکی استریل وزن شد و بعنوان شاهد انتخاب گردید. سپس ۲٤۰ گرم ازهمبرگرآلوده توزین و به آن ۱/۲ گرم پودر خشک عصاره نوروزک اضافه شد، وسپس همبرگر بطور کامل مخلوط گردید، بعد از آن ۱۲ نمونه ۲۰ گرمی از این همبرگر در شرایط استریل درون ظروف پلاستیکی استریل توزین و به فریزر انتقال یافت. سایر تیمارها نیز به همین ترتیب توزین و به آنها به ترتیب4/2 ، 3 /6و ٤/۸ پودر عصاره اضافه و بصورت نمونه های ۲۰ گرمی در شرایط استریل توزین گردیدند و به فریزر ۱۲- درجه سانتیگراد انتقال داده شدند. در دوره های زمانی ۱۵، ۳۰ و ٤۵ روز از هر تیمار ۲ نمونه خارج گردید و بمنظور اندازه گیری رشد استافیلوکوکوس اورئوس وشمارش کلی در محیط های B.P.A و P.C.A به ترتیب کشت سطحی و پور پلیت داده شدند. سپس بمدت ۲٤ ساعت در دمای 37 و۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه گزاری شدند. بمنظور شمارش و تعیین میکرو ارگانیسم از کلنی کانترمدل Funke-Gerbe و میکروسکوپ الکترونی Olympus مدل BH2استفاده شد. تیمارهای مختلف با علائم شرح داده شده طبق جدول ۱ مشخص گردیدند. جدول ۱- تیمارها و علائم اختصاری آنها نوع تیمار علامت اختصاری همبرگر آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بدون عصاره Control همبرگر آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس mg/kg 5000 + پودرعصاره T1 همبرگر آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس mg/kg+ 10000پودرعصاره T2 همبرگر آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس mg/kg 15000 + پودرعصاره T3 همبرگر آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس mg/kg 20000 + پودرعصاره T4 آنالیز آماری بر اساس انجام ANOVA اولیه مشخص گردید بین تیمارها و فواصل زمانی اثر متقابلی وجود ندارد. بنابراین کلیه تیمارها و در تمامی زمانها یکجا تحت آنالیز آماری قرار گرفتند. بمنظور مقایسه میانگینها نیز از آزمون مقایسه میانگین LSD استفاده گردید. نتایج حاصل در جدول ۲ آورده شده است .

نتایج

نوروزک افزوده شده در کاهش تعداد استافیلوکوکوس اورئوس نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تمامی سطوح عصاره اورئوس همانطور که در شکل ۱ میکروبها تاثیر دارند. در مورد تاثیر عصاره ها بر روی تعداد استافیلوکوکوس و شمارش کلی تا ۱۵ روز افزایش یافته و پس از آن تا ٤۵ روز کاهش می T1 و شاهد مشاهده می گردد، تعداد استافیلوکوکوس در نمونه مشاهده نمی شود و تعداد آنها تقریباً ثابت باقی رشد استافیلوکوکوس اورئوس در طی ۳۰ روز T2 ,T3 یابد. اما در تیمارهای دوره های زمانی غلظت عصاره یعنی ۲۰۰۰۰میلی گرم برکیلوگرم تعداد استافیلوکوکوس در تمامی مانده بود. در بالاترین است. و همانطور که درشکل ۱ مشاهده می گردد بیشترین کاهش یافته و در فاصله زمانی بعد از ۱۵ روز این کاهش بیشتر تاثیر تمامی غلظتهای عصاره نشان می دهد.نکته قابل توجه اینست که بیشترین T1 کمترین تاثیر را تیمار و T4 تاثیر را تیمار روز است و حتی در ٤۵ روز تعداد استافیلوکوکوس شاهد نیز تقریباً مساوی در ۱۵ روز اول خیلی بیشتر از روزهای ۳۰ و ٤۵ ویژگیهای منحصر بفرد این عصاره می باشد. تیمارها می گردد و اختلاف معنی داری مشاهده نمی شود. این خود یکی از نوروزک بر استافیلوکوکوس در تیمارها در طی ٤۵ روز نگهداری در مورد تاثیر عصاره شکل ۱. نمودار روند تغییر تعداد نیز تمامی غلظتهای عصاره بر کاهش تعداد شمارش روی شمارش کلی، همانطور که در شکل ۲ مشاهده می گردد در اینجا روز مشاهده می گردد و است. در اینجا برخلاف تاثیر بر استافیلوکوکوس، بیشترین تاثیر بعد از ۳۰ کلی میکروبها تاثیر گذار نمی گردد. در مورد تاثیر عصاره بر روی کاهش بار میکروبی باز درروزهای ۱۵ و٤۵ تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده

روند مشابهی با شاهد T1 تیمار می باشد. و در مورد T1 و کمترین تاثیر مربوط به تیمار T4 مربوط به تیمار بیشترین تاثیر تغییر چندانی بر جلوگیری از افزایش تعداد کل میکروبها ندارد. شکل ۲. نمودار مشاهده می شود و این سطح از عصاره تاثیر LSD میانگین تیمارها توسط آزمون شمارش کلی میکروبها در تیمارها طی ٤٥ روز نگهداری جدول ۲.مقایسه CONTROL روز نوع تیمار ۰ ۱۵ ۳۰ ٤٥ نوع تیمار ۰ ۱۵ ۳۰ ٤٥ استافیلوکوکوس اورئوس شمارش کلی روز

5.729cde 6.734a 6.314ab 5.606cde CONTROL 6.416bcd 6.592Controlbc 7.137a 6.396cd T1 5.729cde 5.802bc 5.778cd 5.405cdef T1 6.416bcd 6.528bc 6.974ab 5.881def T2 5.729cde 5.741cde 5.582cde 5.231ef T2 6.416bcd 6.471bc 6.594abc 5.691f T3 5.729cde 5.714cde 5.831bc 5.306cdef T3 6.416bcd 6.477bc 6.564bc 5.773ef T4 5.729cde 5.622cde
5.249def 4.887f T4 6.416bcd 6.341cd 6.316cde 5.127g

طبق مطالعات پیشین انجام شده بر روی خصوصیات آنتی میکروبیالی عصاره نوروزک توسط مدرس نیز نتایج مشابهی در سوسپانسیونهای میکروبی بدست آمده بود. در آنجا نیز بیشترین تاثیر عصاره در سطح ۲۰۰۰۰ میلی گرم بر لیتر و۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اثر معنی داری از خود نشان نداد. وبین ۲ سطح ۵۰۰۰و۱۰۰۰۰ هممچنین بین سطوح ۱۵۰۰۰و۲۰۰۰۰ میلی گرم بر لیتر تفاوت معنی داری وجود نداشت اما بین خود آنها تفاوت معنی دار بود. نکته مهمی که باید در اینجا اشاره شود اینست که پیش بینی رفتار رشد استافیلوکوکوس اورئوس در فرآورده های غذایی مختلف از جمله همبرگر به دلایل متعدد از جمله طبیعت گوشت و سایر افزودنیها، اکسیژن قابل دسترس ، فعالیت آبی، حرارت، Phو تاثیر متقابل سایر ارگانیسمها بسیار دشوار است(۵). با توجه به تاکید سازمان بهداشت جهانی بر استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی(٤) و نتایج حاصل از این پژوهش می توان از پودر عصاره برگ نوروزک بعنوان یک آنتی باکتریال طبیعی در مواد غذایی استفاده نمود که علاوه بر کاهش بار میکروبی سبب افزایش پایداری اکسیداسیونی و سایر ویژگیهای تغذیه ای نیز می گردد.

منابع

آنالیز اسانسهای Artemisia khorasanica, Artesimia kopetdagh و بررسی اثرات ضد میکروبی آنها. پایان نامه دکترا .دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد مطالعه رویداد شناسی (Phenology) و برخی خصوصیات فیزیولوژی و بیوشیمیایی گیاه نوروزک پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم پایه، گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد. معصومه مدرس

Betley. M.j, T.O.Harris. 1994. Staphylococcal enterotoxins: genetic characterization and relationship between structure and emethic activity. Food microbiology .11.109-121 Burt S. Essential oils. Their antimicrobial properties and potential application foods. A review . international Journal of food microbiology 2004;94:223-253 Daly.c. and sandine, w.f1973.control of staphylococcus aureus in sausage by starter cultures and chemical acidulation. Journal of food science 38.426-430 Farhoosh, R., Purazrang, H., Khodaparast, M. H. H., Rahimizadeh, M. and Seyedi S. M. Extraction and separation of Antioxidative Compounds from Salvia leriifolia Leaves.2004.J.Agric. Sci. Technol. Vol 6:57-62 Ferna´ndez-Gine´ s, J. M., Ferna´ndez-Lo´ pez, J., Sayas-Barbera´ , E., & Pe´ rez-Alvarez, J. A. (2005). Meat products as functional foods: a review. Journal of Food Science, 70,37–43. Jalili.A,Jamzad.z 1999.Red data book of Iran-Research Institute of Forest and Rangeland No –215 Mahon CR,Manuselis G. Diagnostic Microbiology. W. B. Saunders. Company, London 1995;pp:58-96 Palmer AS,Steward J and Fyfe L 2001.The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food microbial 18:463-470 Rechincer, K.H.1982.Flora Iranica. No.150. Academishe Druck. U.Verlag Sustalt Gratz. Vernozy –rozand, mazvey ,c. 1996. Entrotoxin production by coagulase negative staphylococci isolatedfrom goats, milk and chees . international journal of food microbiology.30.271-280

Antimicrobial effect of Salvia leriifolia leaf extract against the growth of Staphylococcus aureus in meat products

Haddad Khodaparast*, Mohammad Hossein, Mahdavian Mehr, Hadi, Hosseini, Zohreh
Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Abstract:

Control of bacterial infections in food has remarkably effective since the discovery of antibacterial drugs. However, widespread drug resistance among bacteria as well as the appearance of undesirable side effects of synthetic preservatives has lead to the search for new antimicrobial agents, in particular from plants. Although a number of reports have mentioned the antimicrobial properties of the medicinal plants, little is known about the antimicrobial activity of Salvia leriifolia (Lamiaceae). This medicinal and useful species is an endemic plant of Khorasan and Semnan province with antioxidant, antifungal, antdiabetic and antinociceptive properties. This has, therefore, led to the investigation of the antimicrobial activity of Methanol extract of S.leriifolia leaves. This study was carried out to evaluate the antimicrobial activity potential of S.leriifolia extract in slowing down the microbial quality decay of hamburger and particular against Staphylococcus aureus. In this research, antimicrobial activity of extract were investigated with different concentrations of the extract (5000, 10000, 15000 and 20000 mg/L) and hamburger samples were subjected to microbiological analyses (Total count and numbers of S.aureus) at different time intervals: after treatment (day 0) and after storage for 15, 30 and 45 d at -21 c. The result showed that both of microbial total count and the number of S.aureus in all samples with different concentrations of extract, decreased during storage. This effect was significant at day 15 and 30 for S.aureus and total count, respectively. Our data also showed that the extract of Salvia leriifolia at highest concentration (20000 mg/L) caused maximum reduction and extract at lowest concentration (5000 mg/) was less effective in initial S.aureus population and microbial total count. These data indicate that S.leriifolia extract can exhibit antimicrobial activity against S.aureus; so it can be considered as an alternative natural preservative in food products. Keywords: Salvia leriifolia leaf, antimicrobial activity, Staphylococcus aureus, total count, natural preservative [1] Normal saline