

اثر ضد باکتریایی عصاره برگ به‌لیمو علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در بستنی سنتی

حسینعلی طبرسا^۱، هادی کوهساری^{۲*} و ابوالفضل فدوی^۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۲۵

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

^۲ استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

^۳ استادیار مرکز تحقیقات صنایع غذایی شرق گلستان، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

* مسئول مکاتبه: hadikoohsari@yahoo.com Email:

چکیده

در ایران تولید بستنی غیرپاستوریزه تحت عنوان بستنی سنتی بسیار رایج است. با توجه به تحقیقات گسترده در خصوص امکان استفاده از ترکیبات گیاهی به‌عنوان بازدارنده رشد باکتری‌ها، این مطالعه به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره برگ به‌لیمو علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* در بستنی سنتی انجام شد. به این منظور با رعایت اصول استاندارد، بستنی‌های سنتی حاوی غلظت‌های ۳، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی برگ‌های به‌لیمو تهیه شده و سپس نمونه‌ها با سوسپانسیون باکتریایی حاوی 10^6 CFU/ml از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* آلوده گردید و در نهایت اثرات ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره در طی زمان در فریزر 20°C در کنار نمونه‌های شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق در مورد باکتری *اشریشیاکلی* نشان داد که در تمامی غلظت‌ها، بین تعداد باکتری‌ها با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.01$) و بیشترین تاثیرگذاری در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ مشاهده گردید. در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* فقط در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P < 0.01$) و در روز بیست و یکم بیشترین کاهش جمعیت میکروبی دیده شد. بطور کلی نتایج این تحقیق حاکی از اثرات ضد باکتریایی عصاره برگ به‌لیمو بر باکتری *اشریشیاکلی* در بافت بستنی می‌باشد و این عصاره برای تاثیرگذاری بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به زمان طولانی‌تری نیاز دارد.

واژگان کلیدی: به‌لیمو، بستنی سنتی، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*

مقدمه

روزافزون در بهداشت عمومی اهمیت می‌یابد. تخمین زده‌شده است که ۳۰ درصد از مردم در کشورهای صنعتی، یک بار در سال از بیماری‌های غذایی رنج

علیرغم پیشرفت‌های نوین در روش‌های تهیه و تولید مواد غذایی، سلامت و ایمنی مصرف‌کننده به‌طور

می‌برند؛ بنابراین هنوز هم نیاز به کاهش یا حذف میکروارگانیزم‌های پاتوژن غذا با استفاده از روش‌های مختلف احساس می‌شود (اولتی و همکاران، ۲۰۰۴).

علیرغم پیشرفت تکنولوژی و استفاده از تجهیزات نوین در تهیه و تولید صنعتی بستنی، مصرف نوع سنتی آن جایگاه خاص خود را در بین مردم حفظ نموده است و این فرآورده به دلیل ماهیت رئولوژیکی خاص، طبع سرد و شیرینی دلپذیر، طرفداران کثیری را خصوصاً در فصول گرم سال به خود جلب نموده است.

باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* در زمره عوامل بیماری‌زای حائز اهمیت در صنعت شیر می‌باشند و کنترل رشد آنها در غذا ضروری است. *اشریشیا کلی* یک باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه بوده و در ردیف مهمترین باکتری‌های پاتوژن در مواد غذایی مسبب بیماری‌هایی نظیر گاستروآنتریت، مسمومیت غذایی، عفونت خونی و عفونت سایر اندام‌ها می‌باشد. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی از مهمترین مسمومیت‌های غذایی به شمار می‌آید بطوری‌که از مجموع حدود ۲۴ میلیون مورد کل مسمومیت‌های غذایی گزارش شده در کشور ایالات متحده امریکا ۹/۸ میلیون مورد آن مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده که بیش از یک سوم موارد کل مسمومیت‌های غذایی در این کشور است (جی ۲۰۰۵، نورمانو ۲۰۰۵).

بنابراین تلاش برای یافتن نگهدارنده مناسب جهت جلوگیری از رشد این باکتری‌ها دارای اهمیت خواهد بود. امروزه مصرف‌کنندگان با توجه به اثرات مضر نگهدارنده‌های غذایی شیمیایی و سنتتیک خواهان استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مشتق از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی هستند تا علاوه بر افزایش زمان ماندگاری غذا از اثرات مضر نگهدارنده‌های غذایی شیمیایی مصون باشند (رولر، ۱۹۹۵).

به‌لیمو (*Lemon verbena*)، برگ خشک شده گیاهی با نام علمی *Lippia citriodora* از خانواده شاه‌پسند

Verbenaceae است. نام دیگر آن *Aloysia triphylla* می‌باشد و دارای حداقل ۰/۵ درصد روغن فرار است. پودر برگ گیاه به‌لیمو به رنگ سبز مات و دارای بوی معطر، طعم تند و کمی تلخ است. برگ‌ها بخش اصلی دارویی این گیاه و دارای بویی شبیه لیمو هستند. این گیاه بومی آمریکای جنوبی بوده و به‌طور طبیعی رویش آن در آرژانتین، شیلی و پرو گزارش شده است و از آنجا به سایر نقاط جهان از جمله ایران رفته است و کشت می‌شود. در ایران این گیاه در استان‌های شمالی و باغ‌ها کشت می‌شود. مواد عمده موجود در عصاره به‌لیمو شامل، لیمونن، سیترال، ژرانیول، نرال می‌باشند و ۱۳ فلاونوئید از گروه متوکسی‌فلاون‌ها مانند سالویجین، اوپاتورین، لوتئولین و دیوزمتین هم از برگ به‌لیمو گزارش شده است. سایر ترکیبات طبیعی موجود در برگ این گیاه را تری ترپن‌ها، موسیلاژ و تانن تشکیل می‌دهند (آزادبخت و همکاران ۱۳۹۰).

اغلب تحقیقات در زمینه اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در محیط آزمایشگاهی انجام گرفته و مطالب کمی پیرامون تاثیر آنها در مدل‌های غذایی، گزارش شده است. گیاهان معطر می‌توانند به عنوان یک منبع مهم علاوه بر ایجاد طعم در مواد غذایی اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی نیز نشان دهند.

این تحقیق با هدف بررسی عصاره اتانولی برگ‌های به‌لیمو بر باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در بستنی و امکان کاهش بار میکروبی و افزایش ماندگاری بستنی سنتی انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

جمع آوری برگ‌های به‌لیمو

برگ‌های تازه، سالم، بدون لکه و فاقد آفت‌زدگی گیاه به‌لیمو از مزارع پرورش به‌لیمو واقع در شهرستان مینودشت در ۱۱۵ کیلومتری گرگان در اواخر شهریورماه جمع‌آوری شد و توسط هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، شناسایی و مورد تایید قرار

تهیه شده در مجاورت سوسپانسیون میکروبی معادل $10^5 \times \text{CFU/ml}$ از هریک از باکتری‌های مورد آزمون به مدت ۲۴ ساعت و در دمای 37°C قرار گرفتند. در کنار این لوله‌ها لوله کنترل مثبت (سوسپانسیون باکتری معادل $10^5 \times \text{CFU/ml}$) و لوله کنترل منفی (مولر هینتون برات بدون باکتری) نیز قرار داده شد. پس از این مدت نتایج به صورت کدورت میکروبی قابل مشاهده و ثبت گردید. آخرین رقتی که در آن کدورت میکروبی مشاهده نشد به عنوان کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شد. به منظور تعیین کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) از هریک از لوله فوق در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و آخرین رقتی که در آن کلنی مشاهده نشد به عنوان کمترین غلظت باکتری کشی تعیین شد (کوکريل و همکاران ۲۰۱۲).

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره در بستنی

شیر حرارت داده شد و به مقدار مناسب افزودنی‌های مورد نظر برای تهیه بستنی به این شیر اضافه گردید. سوسپانسیون میکروبی به طور مجزا به این مایع بستنی آماده شده طوری افزوده شد که به غلظت 10^5 CFU/ml از باکتریها برسد. همچنین عصاره اتانولی برگ‌های به‌لیمو به نمونه‌های بستنی اضافه گردید تا بستنی‌هایی حاوی غلظت‌های ۳، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر از این عصاره به‌دست آید. این نمونه‌ها را در کنار نمونه‌های فاقد عصاره و فاقد باکتری به عنوان شاهد در فریزر 20°C قرار داده و در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز با استفاده از استاندارد ۲۴۰۶ و کشت بر روی محیط‌های کشت اختصاصی (محیط ویولت رد بایل لاکتوز آگار برای *اشریشیاکلی* و محیط کشت برد پارکر آگار برای *استافیلوکوکوس اورئوس*) هر یک از باکتری‌های تعداد کلنی‌های باکتری‌های مورد مطالعه شمارش گردید و نتایج (میانگین سه تکرار) به صورت واحدهای تشکیل

گرفت. برگ‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه درسایه خشک گردید. سپس برگ‌های خشک شده با دستگاه آسیاب کاملاً پودر کرده و تا زمان تهیه عصاره در دمای یخچال و دور از نورنگهداری گردید.

استخراج عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو

تهیه عصاره اتانولی با روش خیساندن (غوطه‌وری) در حلال اتانول ۷۰٪ انجام گرفت (مجنونی و همکاران ۱۳۸۸؛ علیزاده بهبهانی و همکاران ۲۰۱۳). به این منظور ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال به ۱۰ گرم پودر برگ به‌لیمو افزوده و مخلوط حاصل به مدت ۱۰ ساعت و در دمای محیط با همزن زده شد. پس از این مرحله محلول حاصل را در ارلن درب سمباده‌ای ریخته و در روتاری تحت خلاء چرخان در دمای 40°C منتقل گردید تا اتانولی که در محلول وجود دارد کاملاً جدا شود. بعد از پایان این عملیات عصاره تغلیظ شده حاصل در یخچال قرار داده شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

باکتری‌های مورد استفاده یعنی *اشریشیاکلی* (PTCC 1338) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1112) به صورت آمپول لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. جهت تهیه کشت تازه و فعال سازی سویه‌های میکروبی از محیط‌های کشت نوترینت آگار و نوترینت برات (ساخت شرکت هایمدیا) استفاده شد. پس از فعال‌سازی سویه‌های میکروبی از کشت جوان ۲۴ ساعته هر یک از باکتری‌ها ۲-۳ کلنی در سه میلی‌لیتر محیط کشت مایع نوترینت برات تلقیح نموده و در انکوباتور 37°C قرار داده شد تا کدورت آن به نیم مک‌فارلند ($10^8 \times 1/5 \text{ CFU/ml}$) برسد.

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین

غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره استخراج شده بر اساس کدورت سنجی و با استفاده از روش ماکرودایلوشن انجام شد. به این منظور رقت‌های مختلف از عصاره که در محیط کشت مولر هینتون برات

اورئوس به ترتیب ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و برای باکتری *اشریشیا کلی* MIC و MBC یکسان به دست آمد و معادل ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

نتایج بررسی اثرات غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ‌های به لیمو بر کاهش تعداد باکتری *اشریشیا کلی* در بستنی سنتی و در طول زمان ماندگاری در فریزر 20°C - نشان می‌دهد که هرچه بر غلظت عصاره در زمانهای مختلف افزوده می‌شود اثر عصاره بر کاهش تعداد باکتری بیشتر می‌شود و این کاهش با افزایش زمان بیشتر می‌شود. کلیه غلظت‌ها در مقایسه با نمونه شاهد کاهش معنی‌داری نشان دادند ($P < 0/01$) و روند کاهش در لگاریتم تعداد باکتری در تمامی غلظت‌ها در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده شد و بیشترین تأثیر در روزهای سوم، هفتم، چهاردهم و بیست و یکم در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر صورت پذیرفته است یعنی از روز سوم به بعد تعداد باکتری‌ها رو به کاهش است (جدول ۱).

همانطور که در جدول ۱ دیده می‌شود روند کاهش در تعداد باکتری‌ها با افزایش زمان بیشتر می‌شود به عنوان مثال در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محض افزودن عصاره کاهش ۲۸ درصدی تعداد باکتری مشاهده می‌گردد ولی این کاهش در روز بیست و یکم به بیش از ۹۶ درصد می‌رسد. در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز تقریباً همین شرایط حکمفرما است ولی وقتی غلظت به ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌رسد در روز هفتم تمام باکتری‌های موجود در بستنی سنتی کشته می‌شوند و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مرگ تمامی باکتری‌ها در روز سوم دیده می‌شود و این مطلب حاکی از اثرات ضد باکتریایی قابل توجه غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این عصاره بر باکتری *اشریشیا کلی* در بافت بستنی می‌باشد.

دهنده کلنی Colony forming units (CFU) در هر میلی‌لیتر از نمونه گزارش شد.

ارزیابی حسی

ارزیابی حسی ناشی از افزودن عصاره به لیمو به بستنی فاقد باکتری شامل آزمون‌های رنگ محصول، طعم و مزه، پس مزه‌های نامطلوب و احساس دهانی (بافتی) انجام شد. برای این منظور بستنی فاقد باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، تهیه شده با غلظت‌های مختلف عصاره به لیمو مورد ارزیابی حسی هفت نفر از داوران قرار گرفت. این ارزیابی به وسیله یک گروه هفت نفره که از کارکنان آزمایشگاه کنترل مواد خوراکی و آشامیدنی دانشگاه علوم پزشکی استان گلستان بودند، انجام شد. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی بستنی حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ‌های به لیمو را با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره‌ای مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتاً خوب، نمره ۵ نه خوب و نه بد، نمره ۴ نسبتاً بد نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و نهایتاً نمره ۱ فوق العاده بد لحاظ گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش نمونه‌های بستنی مورد آزمون قرار گرفت و داده‌های حاصل بر اساس طرح کاملاً تصادفی و به کمک ANOVA آنالیز و هر آزمون حداقل در سه تکرار انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ($P < 0/01$) صورت گرفت و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت گرفت.

نتایج

بر اساس یافته‌های این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) عصاره اتانولی برگ‌های به لیمو برای باکتری *استافیلوکوکوس*

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ‌های به لیمو بر کاهش تعداد باکتری اشریشیاکلی در بستنی سنتی در دمای ۲۰°C-

زمان نگهداری	کنترل	۱۰ میلی‌گرم درصد	۲۰ میلی‌گرم درصد	۵۰ میلی‌گرم درصد	۱۰۰ میلی‌گرم درصد
	کاهش	کاهش	کاهش	کاهش	کاهش
زمان صفر	۶/۴×۱۰ ^۲	۴/۶×۱۰ ^۲	۲۸/۱۲	۴/۵×۱۰ ^۲	۲۹/۶۸
روز ۱	۱×۱۰ ^۴	۵/۷×۱۰ ^۲	۴۳	۵/۳×۱۰ ^۲	۴۷
روز ۲	۹/۵×۱۰ ^۲	۶/۱×۱۰ ^۲	۳۵/۷۸	۴/۶×۱۰ ^۲	۵۱/۵۷
روز ۳	۴/۱×۱۰ ^۲	۳/۸×۱۰ ^۲	۷/۳	۳/۳×۱۰ ^۲	۱۹/۵۱
روز هفتم	۳/۳×۱۰ ^۲	۱×۱۰ ^۲	۶۹/۶۹	۶/۳×۱۰ ^۲	۸۰/۹
روز چهاردهم	۳/۳×۱۰ ^۲	۵×۱۰ ^۲	۸۴/۸۴	۵×۱۰ ^۲	۸۴/۸۴
روزیست	۳/۱×۱۰ ^۲	۱×۱۰ ^۲	۹۶/۷۷	.	۱۰۰
ویکم					

است (جدول ۲).

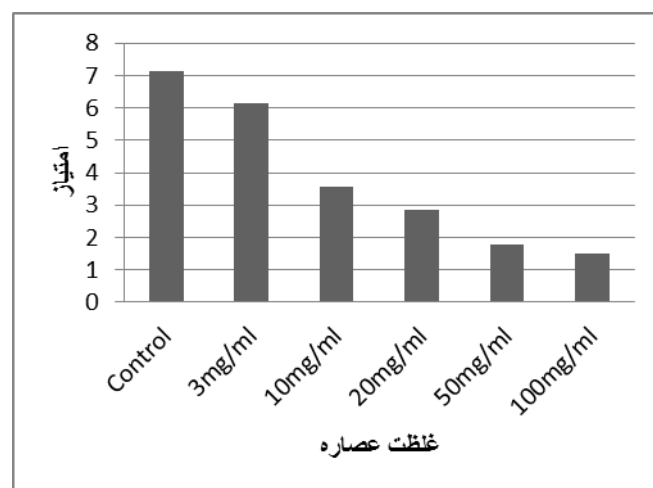
در غلظت‌های ۳، ۱۰، و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در لگاریتم تعداد باکتری‌ها در مقایسه با نمونه کنترل کاهش معنی‌داری در روزهای مختلف دیده نشده اما در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش معنی‌دار بود ($P < 0.01$). همچنین کمترین تعداد باکتری‌ها در روز بیست و یکم و در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید به عبارت دیگر در بالاترین غلظت بیشترین میزان کاهش لگاریتم تعداد باکتری مشاهده می‌گردد، به عبارت دیگر هرچه به غلظت عصاره در زمان‌های مختلف افزوده می‌شود تعداد باکتری‌ها کاهش می‌یابد این کاهش با افزایش زمان بیشتر می‌شود (جدول ۲). نتایج حاصل از ارزیابی حسی در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که مقادیر ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بیشتر عصاره به لیمو بر طعم بستنی اثر سوء دارد و شکایت داوران به طعم تلخ بستنی بود.

اثرات غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ‌های به لیمو بر کاهش تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در بستنی را می‌توان در جدول ۲ مشاهده کرد. همانطور که مشاهده می‌شود هرچه به غلظت عصاره در زمان‌های مختلف افزوده می‌شود تعداد باکتری‌ها کاهش می‌یابد و این کاهش با افزایش زمان بیشتر می‌شود به طوریکه در زمان اضافه کردن عصاره حتی در بیشترین غلظت (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) فقط ۵۴ درصد از باکتری‌ها کشته می‌شوند ولی در روز بیست و یکم در مقایسه با نمونه شاهد بیش از ۹۹ درصد از باکتری‌ها از بین می‌روند و این عصاره برای تاثیرگذاری بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به زمان طولانی تری نیاز دارد (جدول ۲).

بررسی روند تغییرات استافیلوکوکوس اورئوس در بستنی‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی به لیمو در طول زمان نشان داد که در زمان‌های صفر، روز اول و دوم روند کاهشی قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد ولی از روز سوم به بعد روند کاهشی لگاریتم تعداد باکتری‌ها مشاهده گردیده است. همچنین بیشترین تأثیر کاهشی بر روی تعداد باکتری‌ها در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در روز بیست و یکم اتفاق افتاده

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ‌های به لیمو بر کاهش تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در بستنی سنتی در دمای -20°C

زمان نگهداری	کنترل	۳ میلی‌گرم درصد کاهش بر میلی‌لیتر	۱۰ میلی‌گرم درصد کاهش بر میلی‌لیتر	۲۰ میلی‌گرم درصد کاهش بر میلی‌لیتر	۵۰ میلی‌گرم درصد کاهش بر میلی‌لیتر
زمان صفر	$7/7 \times 10^4$	$5/7 \times 10^4$	$4/1 \times 10^4$	$46/75$	$3/8 \times 10^4$
روز ۱	$7/1 \times 10^4$	$4/2 \times 10^4$	$3/3 \times 10^4$	$53/52$	$2/9 \times 10^4$
روز ۲	$3/5 \times 10^4$	$2/4 \times 10^4$	$1/9 \times 10^4$	$45/71$	$1/8 \times 10^4$
روز ۳	$2/9 \times 10^4$	$1/9 \times 10^4$	$1/4 \times 10^4$	$51/72$	$2/8 \times 10^3$
روز هفتم	$7/5 \times 10^2$	$4/5 \times 10^2$	$2/8 \times 10^2$	$62/66$	$1/1 \times 10^2$
روز چهاردهم	$5/8 \times 10^2$	$2/8 \times 10^2$	$1/3 \times 10^2$	$77/58$	$2/7 \times 10^2$
روزیست و یکم	$2/8 \times 10^2$	$2/2 \times 10^2$	$2/3 \times 10^4$	$78/57$	۲۲



شکل ۱- ارزیابی حسی بستنی‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره به لیمو

بحث

نتایج این تحقیق در مورد باکتری *اشریشیاکلی* نشان داد که در تمامی غلظت‌ها، بین تعداد باکتری‌ها با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/01$). در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* فقط در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. روند کاهشی در تعداد باکتری‌ها با افزایش زمان بیشتر می‌شود ($P < 0/01$). بطور کلی نتایج این تحقیق حاکی از اثرات ضد باکتریایی عصاره برگ به لیمو بر باکتری *اشریشیاکلی* در بافت بستنی می‌باشد و این عصاره

برای تاثیرگذاری بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به زمان طولانی‌تری نیاز دارد. اثرات ضدباکتریایی اسانس و عصاره برگ گیاه به لیمو در مطالعات متعددی در آزمایشگاه به اثبات رسیده است. در مطالعه کوهساری و همکاران (۲۰۱۳) نشان داده شد که عصاره اتانولی برگ‌های به لیمو می‌تواند از رشد بسیاری از باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های گرم مثبت همچون *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*، *باسیلوس سرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* جلوگیری کند در حالیکه باکتری‌های گرم منفی

علاوه بر تحقیقات ذکر شده، به‌منظور بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی در بافت مواد غذایی نیز در دستور کار محققین قرار گرفته است ولی در بستنی به عنوان یک فرآورده پرطرفدار مطالعات محدودی انجام شده است. مرادی و محمدی ثانی (۲۰۱۲) با استخراج عصاره آبی گیاه تیموس و لگاریس به بررسی اثرات ضدباکتریایی آن علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا* در سه غلظت ۳۵، ۱۰ و ۲۰ درصد در بستنی پرداختند. نتایج آنها حاکی از اثرات ضد میکروبی غلظت ۲۰٪ عصاره مذکور بود. تاثیر زمان در افزایش تاثیر عصاره بر باکتری در دمای فریزر علاوه بر مطالعه حاضر در مطالعات دیگری نیز مشاهده شده است.

ال باسیونی و همکارانش (۲۰۱۲) به بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی بره‌موم علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در بستنی تهیه شده در آزمایشگاه پرداختند. آن‌ها در سه غلظت ۱۰۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره را مورد بررسی قرار دادند یافته‌های پژوهش آن‌ها نشان داد که بیشترین تأثیر ضد باکتریایی در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در روز سوم مشاهده شد به عبارت دیگر هرچه به غلظت عصاره در زمانهای مختلف افزوده می‌شود تعداد باکتری‌ها کاهش می‌یابد این کاهش با افزایش زمان بیشتر می‌شود که با نتایج پژوهش حاضر منطبق است. نوری و همکاران (۱۳۹۱) نیز به منظور بررسی اثر آویشن شیرازی بر باکتری *اشریشیا کلی* در مدت چهارده روز در گوشت چرخ‌کرده نشان دادند که هر چه مدت زمان نگهداری بیشتر می‌شود میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد.

محمدی و همکاران (۱۳۹۰) در مطالعه ای به ارزیابی تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر رشد و بقای *اشریشیا کلی* در طی مرحله تولید و نگهداری پنیر سفید آب نمکی پرداختند. از نتایج آنها که

نسبت به عصاره مذکور مقاومت نشان دادند. همچنین فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی این گیاه از عصاره اتانولی آن کمتر است.

ال بلتاگی و همکاران (۲۰۱۱) اثرات اسانس این گیاه را بر علیه باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* نشان دادند. نتایج این محققین توسط انصاری و همکاران (۲۰۱۲) نیز تایید شده است و کمترین غلظت مهار کنندگی (MIC) اسانس گیاه مزبور برای *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

در مطالعه اوسکای و همکاران (۲۰۰۵) کمترین غلظت مهار کنندگی (MIC) عصاره اتانولی برگ‌های به‌لیمو علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه*، *پروتئوس ولگاریس* و *کاندیدا آلبیکانس* به ترتیب ۱۰، ۳۰، ۲۲ و ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) در محدوده ۱۰ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

مطلب با اهمیتی که در مطالعات ذکر شده در بالا وجود دارد این است که کمترین غلظت مهار کنندگی و کمترین غلظت باکتری کشی عصاره برگ به لیمو در مطالعات انجام شده در آزمایشگاه (خارج از بافت مواد غذایی) بسیار کم و در حد میکروگرم بر میلی‌لیتر است. در حالیکه در مطالعه حاضر مقادیر بسیار بیشتری از عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر) توانسته است باعث مهار رشد باکتری‌های مورد آزمون شود. جهت توجیه این مطلب می‌توان به گزارشات محققینی اشاره کرد که بر این عقیده‌اند که بخشی از اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها در مواد غذایی از دست می‌رود. این پدیده می‌تواند به دلایل مختلفی اتفاق بیافتد. در این ارتباط محققان بسیاری بر این نظرند که محتوای بالای چربی در مواد غذایی اثر حفاظتی بر میکروارگانیسم‌ها دارد (پاندیت و شلف ۱۹۹۴؛ اسماعیل و پیرسون ۱۹۹۰)

¹Minimum Inhibitory Concentration

²Minimum Bactericidal Concentration

مولکولی ۱۵۴، ترکیبی مونوترپنی اکسیژناز حلقوی با طعم تند است. موارد استعمال سینوئل با اثر میکروبوکشی درمانی مشابه ترکیب لیمون است با این تفاوت که بر خلاف آن، کمتر مخاط را تحریک می‌کند. ترکیب لیمون نیز یک مونوترپن تکحلقه ای با جرم مولکولی ۱۳۶ و با بویی شبیه لیمو است این ترکیب ماده تلخ مرکبات و لیمو است و دارای اثر سمی و تحریک کننده پوست است (آزادبخت و همکاران ۱۳۹۰).

بیشترین شکایت داوران در آزمون حسی بستنی حاوی عصاره برگ به لیمو نسبت به تلخی بود که این تلخی را می‌توان به لیمون نسبت داد که ماده عمده موجود در برگ‌های این گیاه دانست. به منظور شناسایی ترکیبات موثره ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ‌های گیاه به لیمو آنالیز ترکیبات شیمیایی آن توصیه می‌شود.

نتیجه گیری کلی

با مشاهده نتایج آزمایشات می‌توان به این نتیجه رسید که عصاره اتانولی به لیمو خاصیت ضد باکتریایی علیه دو باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در بافت بستنی سنتی دارد با این تفاوت که برای تأثیرگذاری بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* احتیاج به زمان طولانی‌تری دارد ولی در مورد باکتری *اشریشیا کلی* در زمان کوتاه‌تری خاصیت ضد میکروبی عصاره به لیمو نمایان می‌شود، این موضوع بیانگر این مطلب است که عصاره به لیمو تأثیر بیشتری در زمان کوتاه‌تر بر باکتری *اشریشیا کلی* دارد.

با مطالعه حاضر منطبق است این بود که مدت زمان نگهداری بر لگاریتم تعداد باکتری *اشریشیا کلی* تأثیر آماری معناداری داشت ($P < 0/05$).

درجه حرارت‌های پایین از جمله دمای فریزر باعث غیر فعال شدن و افزایش ماندگاری باکتری می‌شود ولی با افزایش زمان میزان نفوذ عصاره به پوشش سلولی باکتری افزایش یافته و تأثیرگذاری آن بیشتر می‌شود و با توجه به تعدد لایه‌های پپتیدوگلیکان در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یک باکتری گرم مثبت قدرت نفوذ عصاره کمتر بوده و عصاره برای تأثیر گذاری بر این باکتری گرم مثبت به زمان بیشتری نیازمند است. ولی تعداد لایه‌های پپتیدوگلیکان در باکتری‌های گرم منفی کمتر است و نفوذ و تأثیرگذاری عصاره در باکتری *اشریشیا کلی* به عنوان یک باکتری گرم منفی بیشتر است.

مقاومت بیشتر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر عصاره مورد آزمون را می‌توان به مقاومت این باکتری در برابر انجماد مربوط دانست (داگلاس ۲۰۰۴).

اثرات ضد میکروبی عصاره برگ به لیمو را می‌توان به ترکیبات موجود در آن نسبت داد. از مهمترین این ترکیبات می‌توان به لیمون، سیترال، ژرانیول^۱، او^۱-۸- سینوئل^۲، نرال^۳، اکتان-۳-ال^۴ و آلفا کورکومن^۵ اشاره کرد. ۱۳ فلاونوئید از گروه متوکسیفلاون‌ها مانند سالویجین^۶، اوپاتورین^۷، لوتئولین^۸ و دیوزمین^۹ هم از برگ به لیمو گزارش شده است. سایر ترکیبات طبیعی موجود در برگ این گیاه را تری ترپن‌ها، موسیلاژ و تانن تشکیل می‌دهند. ترکیب او^۱-۸- سینوئل با جرم

¹Geraniol

²1,8 -Cineol

³Neral

⁴octan 3-ol

⁵ α - Curcumene

⁶Salvigenin

⁷Eupatorin

⁸Luteolin

⁹Diosmetin

منابع مورد استفاده

- آزادبخت ن، خسروی ک، نظری ح، ۱۳۹۰، گیاه شناسی و کاربرد گیاه دارویی به‌لیمو، فصلنامه زیتون ۳۱، ۲۲۲، صفحه ۳۸.
- سازمان ملی استاندارد، ۱۳۷۲، حد مجاز آلودگی‌های میکروبی در فرآورده‌های شیر، شماره ۲۴۰۶.
- سازمان ملی استاندارد، ۱۳۶۷، روش شناسایی و شمارش اش‌ریشیا در مواد غذایی. شماره ۲۹۴۶.
- مجنونی م ب، عبیری ر، ملک خطایی پ و ادیبی ه، ۱۳۸۸، اثرات ضد میکروبی عصاره آبی الکی برگ و دانه گیاه شنبلیله بر روی سویه های مختلف میکروبی، مجله علوم آزمایشگاهی، ۳، ۱، ۳۵-۳۱.
- نوری ن، آخوندزاده بستنی الف، میثاقی ع، دباغ مقدم الف، رعیت ی ر، قنبری سقرلو ن، ۱۳۹۱، اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی E.coli O157:H7 در گوشت چرخ کرده گوساله در طی نگهداری در دمای یخچالی به منظور جایگزینی با نگهدارنده‌های شیمیایی و تامین سلامت مصرف کنندگان، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، ۳، ۱۹۷-۱۹۲.
- Ali HFM, El-Beltagi HS and Nasr NF, 2011. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysiatriphylla*. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and food Chemistry 10(8): 2689-2699.
- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM and Vasiee A, 2013. Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms "in vitro". Journal of Paramedical Sciences 4(3): 89-99.
- Ansari M, Larijani K, Tehrani MS, 2012. Antibacterial activity of *Lippacitriodora* herb essence against MRSA *Staphylococcus aureus*. African Journal of Microbiology Research 6(1): 16-19.
- Cockerill FR, Wikler MA, Alder J, Dudley MN, Eliopoulos GM, Ferraro MJ, Hardy DJ, Hecht DW, Hindler JA,
- Patel JB, Powell M, Swenson JM, Thomson RB, Traczewski MM, Turnidge JD, Weinstein MP and Zimmer BL, 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute M07-A9 32(2).
- Douglas LA, 2004. Freezing: an underutilized food safety technology. International Journal of Food Microbiology 90: 127-138.
- Dulger B and Gonuz A, 2004. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. Asian Journal of plant Sciences 3(1):104-107.
- El-Bassiony TA, Saad NM and El-Zamkan MA, 2012. Study on the antimicrobial activity of ethanol extract of Propolis against enterotoxigenic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in lab prepared Ice-cream, Vet. World 5(3):155-159.
- Ismail AA and Pierson MD, 1990 a. Effect of sodium nitrite and origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. Journal Food safety 6: 129-139.
- Isamel AA and Pierson MD, 1990 b. Inhibition of germination outgrowth and vegetative growth of *Clostridium baturinum* by spice oils. Journal of Feed Protection 53(9): 755-758.
- Koohsari H, Ghaemi EA, Sadegh Sheshpoli M, Sadegh A, 2013. Evaluation of antibacterial activity of *Lemon verbena* (*Lippiacitriodora*) leaves. Annals of Biological Research 4 (10): 52-55.
- Moradi E and Mohamadi Sani A, 2012. The investigation of antimicrobial effect of *Thymus vulgaris* on ice-cream. Research in Pharmaceutical Sciences 7(5): 772.
- Normanno G, 2005. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology 98: 73-79.
- Oskay M, Tamer A U, Ay G, Sari D and Akta K, 2005. Antimicrobial activity of the leaves of *Lippiatriphylla* (L'Her) O. Kuntze (*Verbenaceae*) against on bacteria and yeasts. Journal of Biological Sciences 5(5): 620-622.

- Pandit VA, Shelef LA, 1994. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Food Microbiol 11: 57- 63.
- Roler S, 1995. The Quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: Status Reports on a European Research Project. Int. Biodeterioration and Biodegradation 333- 345.

Antibacterial effect of *lemon verbena* leaf extract against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in traditional ice cream

HA Tabarsa¹, H Koohsari^{2*} and A Fadavi³

Received: July 25, 2015

Accepted: May 14, 2016

¹Graduated Student, Department of Food Science and technology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Golestan province, Iran

²Assistant Professor, Department of Microbiology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Golestan province, Iran

³Assistant Professor, Food Science and technology Research Centre of East Golestan, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Iran

*Corresponding author: E mail: hadikoohsari@yahoo.com

Abstract

Unpasteurized ice cream production in Iran is very common as traditional ice cream. Based on extensive researches on the use of herbal compounds for inhibiting the growth of bacteria, this study investigated the antibacterial effects of lemon verbena leaves extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in traditional ice cream. In order to with the standard principles, traditional ice cream samples containing concentrations of 3, 10, 20, 50 and 100 mg/ml ethanol extract of the leaves of the lemon verbena were prepared. And then samples by bacterial suspension containing 10⁵CFU/ml of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were inoculated. And finally antibacterial effects of different concentrations of extract of over time in the freezer -20 °C in addition to control samples were evaluated. In the case of *Escherichia coli* the results showed that at all concentrations, between the number of bacteria there is a significant difference compared to control samples (P<0.01). And the most effective at a concentration of 100 mg/ml and on days 3, 7 and 14 were observed. In the case of *Staphylococcus aureus* only at a concentration of 50 mg/ml, significant difference was observed (P<0.01) and the maximum reduction in microbial population was observed on day 21. Overall, the results of this research showed antibacterial effects of *lemon verbena* extract on *Escherichia coli* in ice cream and this extract needs more time (longer time) to influence on the *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Lemon verbena*, Traditional ice cream, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*