DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2014.10717

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شماره ۵، صفحه ۸۱۰-۸۰۲ (۱۳۹۳)

خواص ضدلیستریایی اسانس نعناع در مقادیر مختلف دما، pH و نمک

میرحسن موسوی[1*] و نسیم شاویسی[2]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، پست الکترونیک: moosavymh@gmail.com
۲- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۱ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۲

چکیده

باکتری لیستریا مونوسیتوژنز یکی از مهمترین باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از مواد غذایی بوده و در حال حاضر کنترل آن مهمترین چالش در کارخانجات صنایع غذایی محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر اسانس نعناع در کنترل رشد لیستریا مونوسیتوژنز در سه دما (۴، ۹ و ۱۴ درجه سلسیوس)، سه pH (۵، ۶ و ۷) و چهار غلظت نمک (۰، ۱، ۲ و ۴ درصد) می‌باشد. آنالیز ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس نعناع با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) انجام گردید. تعیین میزان حساسیت باکتری به اسانس نعناع با اندازه‌گیری حداقل غلظت مهاری و به روش براث میکرودایلوشن انجام شد. ترکیب‌های اصلی تشکیل‌دهنده اسانس شامل کاروون (۷۸/۸٪)، لیمونن (۱۱/۵٪) و منتون (۱٪) بود. در این مطالعه غلظت مهاری حداقل اسانس نعناع ۱۶۰µl/ml تعیین شد. نتایج این بررسی نشان داد که با افزایش غلظت نمک و دما و کاهش میزان pH خواص ضدباکتریایی اسانس نعناع افزایش یافت. بنابراین با توجه به نتایج بدست‌آمده می‌توان گفت که از اسانس نعناع می‌توان به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی در کنترل باکتری لیستریا مونوسیتوژنز استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، اسانس نعناع، دما، pH، نمک.

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای منتقله از مواد غذایی می‌باشد که سبب بیماری لیستریوز در انسان می‌گردد. این بیماری با سقط جنین در خانم‌های باردار و منتژیت و آنسفالیت در نوزادان، کودکان و افراد بالغ دارای ضعف سیستم ایمنی همراه می‌باشد (Karina *et al*., 2011). این باکتری در طیف وسیعی از مواد غذایی مانند گوشت قرمز، سبزیجات خام مصرفی، فرآورده‌های لبنی، فرآورده‌های دریایی (ماهی دودی و خام)، انواع سالادها و غذاهای آماده مصرف یافت می‌شود (Magalhães & Nitschke, 2013). بروز بیماری لیستریوز اغلب به مصرف مواد غذایی خام به‌خصوص غذاهای آماده مصرف و همچنین پنیر و سایر فرآورده‌های لبنی نسبت داده شده‌است (Evrendilek & Balasubramaniam, 2011). در کشورهای در حال توسعه سالانه صدها مورد گزارش مرگ و میر ناشی از لیستریوز به‌دلیل مصرف مواد غذایی آلوده گزارش می‌شود (Hsieh *et al*., 2011). یکی از مهمترین روشهای جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زا و فساد، نگهداری مواد غذایی در دماهای پایین و به‌طور معمول دمای یخچال است، اما به‌دلیل توانایی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در تحمل شرایط محیطی نامناسب مانند دمای پایین (۴-۲ درجه سلسیوس) و بالا (۴۵ درجه سلسیوس)، شرایط اسیدی (pH= ۴/۴) و غلظت‌های بالای نمک (۱۰٪)، در کنترل این باکتری باید از پارامترهای چند مانعی استفاده گردد (Rasooli *et al*., 2006؛ Xi *et al*., 2011؛ Shannon *et al*., 2011).

در سال‌های اخیر کاربرد مصرف اسانس‌های گیاهی در مواد غذایی خام به‌خصوص مواد غذایی فرآوری شده به‌عنوان جایگزین مناسبی برای مواد نگهدارنده سنتتیک و افزودنی‌های شیمیایی افزایش یافته‌است (Noriega *et al*., 2010؛ Tyagi *et al*., 2012).

نعناع معروف‌ترین جنس گیاهان خانواده لامیاسه بوده که از زمان‌های قدیم، رومیان، یونانیان و مصریان از آن برای درمان بیماری‌های عفونی مختلف و همچنین در تهیه عطرها و به‌عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی استفاده می‌کرده‌اند (Kumar *et al*., 2011).

گونه‌های مختلف نعناع در سراسر جهان پراکندگی دارند ولی بیشتر در مناطقی از آمریکا، اروپا و آسیا مانند برزیل، چین و هند که دارای آب و هوای گرمسیری هستند، یافت می‌شود (Tyagi *et al*., 2012). عصاره و اسانس نعناع دارای خواص ضدمیکروبی علیه برخی از عوامل بیماری‌زای منتقله از مواد غذایی می‌باشد (Znini *et al*., 2011؛ Tyagi *et al*., 2012).

مهمترین ترکیبی که در نعناع دارای خواص ضدمیکروبی می‌باشد کاروون است (Telci *et al*., 2010). همچنین لازم به تذکر این مطلب است که میزان خواص ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهان به روش اسانس‌گیری و نوع میکروارگانیسم نیز بستگی دارد (Evrendilek & Balasubramaniam, 2011). در مطالعه خواص ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی باید تأثیر عوامل درونی و خارجی مانند pH، غلظت نمک و درجه حرارت نیز مورد بررسی قرار گیرد (Razavi Rohani *et al*., 2011). به همین دلیل هدف از این مطالعه بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس نعناع بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در سه دما (۴، ۹ و ۱۴ درجه سلسیوس)، سه pH (۵، ۶ و ۷) و چهار غلظت نمک (۰، ۱، ۲ و ۴ درصد) می‌باشد.

مواد و روشها

تهیه اسانس

اسانس استاندارد گیاه نعناع (*Mentha spicata*) از شرکت داروسازی باریج اسانس کاشان تهیه شد. اسانس‌گیری از گیاهان اغلب به روش تقطیر با آب انجام گردید (Lv *et al*., 2011).

آنالیز ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس

در این مطالعه ترکیب‌های تشکیل‌دهنده نیز مورد بررسی قرار گرفت. اسانس گیاه مورد نظر پس از آماده‌سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-) Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Mass) تزریق گردید تا نوع ترکیب‌های تشکیل‌دهنده آن مشخص شود. مشخصات دستگاه گاز کروماتوگراف Agilent 6890 شامل: ستون مویینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS با برنامه دمایی ۷۰ تا ۲۸۰ درجه سلسیوس و با افزایش تدریجی ۲۵ درجه سلسیوس در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰-۲ دقیقه بود. دمای محفظه تزریق ۲۶۵ درجه سلسیوس و سرعت گاز هلیوم (به‌عنوان حامل) ۱/۲ میلی‌لیتر در هر دقیقه بود. طیف‌سنج جرمی از نوع Agilent 5973 با انرژی یونیزاسیون (EI) ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سلسیوس بود.

آماده‌سازی اسانس نعناع

برای افزایش حلالیت و گسترش یکنواخت هر کدام از غلظت‌های مورد مطالعه اسانس نعناع در محیط کشت آبگوشت قلب و مغز از دی‌متیل سولفوکساید ۱۰٪ (DMSO) (مرک، آلمان) به‌عنوان امولسیفایر استفاده گردید. بر این اساس غلظت‌های مورد مطالعه اسانس نعناع از ۲۰µl/ml تا ۲۵۶۰µl/ml به‌صورت رقت‌های سریالی دوتایی تعیین شد (Mahboubi & Haghi, 2008).

باکتری مورد مطالعه

کشت لیوفیلیزه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز (ATCC 19115) تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران برای این بررسی مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی و تعیین مقدار دوز تلقیح باکتری

تهیه میزان تلقیح باکتری مورد آزمایش با انتقال باکتری از میکروتیوپ استریل به محیط آبگوشت قلب و مغز (مرک، آلمان) و نگهداری آن به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. مجدداً کشت دومی از کشت ۲۴ ساعته اول در محیط آبگوشت قلب و مغز دیگر (در ۳۷ درجه

سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت) تهیه شد. سپس مقادیر مختلفی از کشت آبگوشت قلب و مغز ۲۴ ساعته دوم را بر روی لوله‌های کووت مختلف برده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری لوله‌های مذکور خوانده شد. از محتویات لوله‌های کووت، با استفاده از تهیه سری رقت و کشت سطحی مقدار باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص و در نهایت به هر میلی‌لیتر محیط کشت تعداد 10^6 باکتری تلقیح گردید.

تعیین حداقل غلظت مهاری اسانس نعناع

برای تعیین حداقل غلظت مهاری اسانس نعناع از روش براث میکرودایلوشن در پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ چاهکی با حجم ۳۰۰ میکرولیتری استریل (اکستراژن، آمریکا) استفاده شد. در هر چاهک ۱۶۰ میکرولیتر محیط آبگوشت قلب و مغز استریل، ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های متوالی اسانس مورد مطالعه و ۲۰ میکرولیتر کشت باکتریایی اضافه گردید. کنترل مثبت (چاهک حاوی باکتری + محیط آبگوشت قلب و مغز بدون ترکیب ضدمیکروبی) و کنترل منفی (ترکیب ضدمیکروبی + محیط آبگوشت قلب و مغز بدون باکتری) نیز در این مرحله از آزمایش در نظر گرفته شد. پس از افزودن غلظت‌های مورد نظر از ترکیب ضدمیکروبی و باکتری مورد مطالعه، پلیت‌های میکرولیتر به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۲۵۰rpm برای مخلوط شدن در شیکر قرار داده شدند. بعد از طی شدن زمان ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور، به‌منظور تعیین حداقل غلظت مهاری، چاهک‌ها برای وجود کدورت به طریق چشمی بررسی و حداقل غلظتی که ایجاد حالت عدم رشد یا عدم کدورت مشهود با گروه کنترل کرد، به‌عنوان غلظت مهاری حداقل تعیین گردید. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از نمونه در محیط آگار قلب و مغز (مرک، آلمان) کشت داده شد و پس از طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس عدم رشد تأیید گردید (Weerakkody *et al.*, 2010؛ Rivas *et al.*, 2010).

بررسی اثر اسانس نعناع بر روی رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز

پس از تعیین حداقل غلظت مهاری اسانس نعناع، دو غلظت پایین‌تر از آن (۴۰µl/ml و ۸۰µl/ml) برای بررسی اثر اسانس بر روی رشد باکتری در pH، دما و غلظت‌های مختلف نمک مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در هر چاهک پلیت‌های میکرولیتر، ۱۶۰ میکرولیتر محیط آبگوشت قلب و مغز استریل دارای pH ۵، ۶ و ۷ و دارای نمک ۰، ۱، ۲ و ۴ درصد، ۲۰ میکرولیتر از دو غلظت مورد مطالعه اسانس و ۲۰ میکرولیتر کشت باکتریایی اضافه گردید. کنترل مثبت (چاهک حاوی باکتری + محیط آبگوشت قلب و مغز بدون ترکیب ضدمیکروبی) و کنترل منفی (ترکیب ضدمیکروبی + محیط آبگوشت قلب و مغز بدون باکتری) نیز در این مرحله از آزمایش در نظر گرفته شد. پس از افزودن غلظت‌های مورد نظر از ترکیب ضدمیکروبی و باکتری مورد مطالعه، میکروپلیت‌ها به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۲۵۰rpm در شیکر برای مخلوط شدن قرار داده شد و بعد به مدت ۲۴ ساعت در ۳ دمای ۴، ۹ و ۱۴ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. به‌منظور ارزیابی رشد باکتری‌ها پس از طی دمای گرمخانه‌گذاری شمارش کلونی به روش کشت سطحی در محیط آگار قلب و مغز انجام شد (Razavi Rohani *et al.*, 2011).

برای شمارش تعداد باکتری در هر کدام از مراحل انجام آزمایش، پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، پلیتی انتخاب شد که تعداد کلنی باکتری آن بین ۳۰۰–۳۰ باکتری بود.

در این مطالعه از شاخص به نام DP (Differences in Population) استفاده گردید که به‌صورت زیر محاسبه می‌شود (Zhou *et al.*, 2007).

$$\text{Log DP}= \log\frac{N}{N0} = \log(N) - \log(N0)$$

N_0: تعداد باکتری‌های اولیه

N: تعداد باکتری‌ها پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری

این مطالعه با سه بار تکرار انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده گردید و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار لحاظ گردید. از آزمون

آنالیز واریانس و با استفاده از ANOVA و Turkey test برای بررسی اثر متغیرهای مستقل (مقادیر اسانس و نایسین، مقادیر مختلف نمک و درجه حرارت) بر روی متغیر وابسته (لگاریتم تعداد باکتری) استفاده گردید و از همبستگی اسپیرمن برای بررسی ارتباط متغیرهای مزبور با هم استفاده شد.

نتایج

آنالیز اسانس

نتایج آنالیز ترکیب‌های اسانس نعناع مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده‌است. همان‌طور که در این جدول آمده‌است، ترکیب های اصلی تشکیل‌دهنده اسانس شامل کاروون (۷۸/۸٪)، لیمونن (۱۱/۵٪)، منتون (۱٪)، منتول (۱٪)، سیس‌دی‌هیدروکارول (۱/۴٪)، ترانس- کاریوفیلین (۱٪)، بتا-بوربونن (۱/۲٪) و ترپینین (۱٪) می‌باشند.

تعیین حداقل غلظت مهاری اسانس نعناع

به‌منظور بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس نعناع بر روی لیستریا مونوسیتوژنز، ابتدا حداقل غلظت مهاری (MIC) این ترکیب در غلظت‌های ۲۰ تا ۲۵۶۰ ماکرولیتر در هر میلی‌لیتر اسانس نعناع بررسی گردید.

غلظت مهاری حداقل اسانس نعناع ۱۶۰µl/ml تعیین شد. با توجه به این نتیجه، دو غلظت ۴۰µl/ml و ۸۰µl/ml اسانس نعناع به‌منظور بررسی اثر دما، pH و نمک بر میزان خواص ضدلیستریایی آن انتخاب گردید.

اثر ضدباکتریایی اسانس نعناع

تجزیه و تحلیل آماری واریانس بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسانس نعناع بر متغیر وابسته (لگاریتم تعداد باکتری‌ها برحسب CFU/ml) نشان داد که بین دو غلظت ۴۰µl/ml و ۸۰µl/ml اسانس نعناع تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < ۰/۰۰۱$). همچنین هر دو غلظت مذکور (غلظت ۴۰µl/ml ($p < ۰/۰۰۳$) و غلظت ۸۰µl/ml ($p < ۰/۰۰۱$)) به‌صورت معنی‌داری باعث کاهش تعداد باکتری‌ها شدند (جدول ۲، ۳ و ۴).

جدول ۱- نتایج آنالیز اسانس نعناع خوراکی

ردیف	ترکیب	درصد
۱	β-myrcene	۰/۳
۲	limonene	۱۱/۵
۳	γ-terpinene	۰/۲
۴	menthone	۱/۰
۵	menthol	۱/۰
۶	terpinen-4-ol	۱/۰
۷	α-terpinol	۰/۳
۸	dihydrocarveol	۰/۲
۹	cis-dihydrocarveol	۱/۴
۱۰	dihydrocarvone	۰/۴
۱۱	trans-carveol	۰/۳
۱۲	carvone	۷۸/۸
۱۳	cihydrocarvyl acetate	۰/۶
۱۴	l-carveol	۰/۳
۱۵	β-bourbonene	۱/۲
۱۶	E-caryophyllene	۱/۰
۱۷	γ-amorphene	۰/۲
۱۸	α-amorphene	۰/۲
۱۹	سایر ترکیبات	۰/۱
	جمع	۱۰۰

اثر درجه حرارت بر روی میزان رشد باکتری

مطالعه اثر درجه حرارت های مختلف گرمخانه‌گذاری (۴، ۹ و ۱۴ درجه سلسیوس) بر متغیر وابسته (لگاریتم تعداد باکتری‌ها برحسب CFU/ml) توسط آنالیز واریانس نشان داد که بین درجه حرارت های مختلف در کاهش رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < ۰/۰۰۱$). آزمون t-test نیز نشان داد که دمای ۱۴ درجه در مقایسه با دمای ۴ و ۹ درجه باعث کاهش بیشتر لگاریتم باکتری‌ها می‌شود ($p < ۰/۰۱۶$).

جدول ۲- اثر اسانس نعناع بر روی شاخص DP لیستریا مونوسیتوژنز در دمای ۱۴°C

تیمار	نمک	غلظت اسانس (µl/ml)	
pH	(g/۱۰۰)	۴۰	۸۰
۵	۰	۰/۳۰ ± ۰/۱۸۳	-۰/۰۰۵ ± ۰/۳۳۲
	۱	-۰/۱۷ ± ۰/۴۴۵	-۰/۵۶ ± ۰/۱۸۳
	۲	-۱/۲۸ ± ۰/۲۱۹	-۱/۱۹ ± ۰/۵۸۶
	۴	-۱/۷ ± ۰/۱۷۶	-۱/۷ ± ۱/۰۵
۶	۰	۱/۳۲ ± ۰/۷۴۲	۰/۶۷ ± ۰/۰۶۳
	۱	۰/۱۷ ± ۰/۲۸۹	-۰/۱۳ ± ۰/۰۹۱
	۲	-۰/۸۱ ± ۰/۶۹۲	-۰/۸۱ ± ۰/۶۹۲
	۴	-۱/۲۰ ± ۰/۳۰۴	-۱/۹۶ ± ۰/۰۴۹
۷	۰	۱/۳۰ ± ۰/۶۲۲	۰/۸۹ ± ۰/۱۴۸
	۱	۰/۴۹ ± ۰/۰۳۵	۰/۳۸ ± ۰/۷۴۲
	۲	-۰/۲۱ ± ۰/۱۲۰	-۰/۴۳ ± ۰/۰۰۰
	۴	-۱/۰۳ ± ۰/۳۸۱	-۱/۲۶ ± ۰/۳۶۷

جدول ۳- اثر اسانس نعناع بر روی شاخص DP لیستریا مونوسیتوژنز در دمای ۹°C

تیمار	نمک	غلظت اسانس (µl/ml)	
pH	(g/۱۰۰)	۴۰	۸۰
۵	۰	۱/۵۸ ± ۰/۱۴۱	۰/۵±۰/۰۹۸
	۱	-۰/۳۱ ± ۰/۰۰۰	-۰/۳۷±۰/۰۴۹
	۲	-۰/۴۵ ± ۰/۰۴۲	-۰/۸۳±۰/۰۲۸
	۴	-۱/۴۱ ± ۰/۰۴۲	-۲/۰۶±۰/۰۸۴
۶	۰	۱/۴۹ ± ۰/۵۷۹	۰/۹۱±۰/۰۳۵
	۱	۰/۶۸ ± ۰/۰۰۰	۰/۲۷±۰/۳۸۱
	۲	-۰/۲۳ ± ۰/۱۲۷	-۰/۴۲±۰/۱۲۷
	۴	-۱/۱۴ ± ۰/۰۲۸	-۱/۴۶±۰/۴۵۹
۷	۰	۱/۹۶±۰/۰۳۵	۱/۱۹±۰/۱۶۹
	۱	۰/۷۸±۰/۰۸۴	۰/۶۶±۰/۲۹۶
	۲	-۰/۱۵±۰/۰۴۲	-۰/۱۹±۰/۰۰۷
	۴	-۰/۰۵±۱/۳۶	-۱/۰۸±۰/۱۲۰

جدول ۴- اثر اسانس نعناع بر روی شاخص DP لیستریا مونوسیتوژنز در دمای ۴°C

تیمار	نمک	غلظت اسانس µl/ml	
pH	(g/۱۰۰)	۴۰	۸۰
۵	۰	۱/۸۲ ± ۰/۱۲۷	۰/۷۸ ± ۰/۱۰۶
	۱	۰/۶۷ ± ۰/۲۱۲	-۰/۲۳ ± ۰/۰۸۴
	۲	۰/۱۹ ± ۰/۰۲۱	-۰/۰۶ ± ۰/۰۵۶
	۴	-۰/۶۶ ± ۰/۰۷۷	-۱/۱۳ ± ۰/۱۵۵
۶	۰	۱/۹۰ ± ۰/۱۱۳	۱/۳۷ ± ۰/۲۶۸
	۱	۰/۹۴ ± ۰/۰۸۴	۰/۶۴ ± ۰/۴۷۳
	۲	۰/۴۰ ± ۰/۰۲۸	۰/۲۶ ± ۰/۲۰۵
	۴	-۰/۱۰ ± ۰/۰۲۸	-۰/۳۸ ± ۰/۲۸۹
۷	۰	۱/۹۴ ± ۰/۰۹۱	۱/۶۳ ± ۰/۰۷
	۱	۰/۹۰ ± ۰/۳۱۱	۰/۶۹ ± ۰/۵۲۳
	۲	۰/۱۶ ± ۰/۲۲۶	۰/۰۷ ± ۰/۱۵۵
	۴	-۰/۰۱ ± ۰/۰۰۷	-۰/۱۰ ± ۰/۰۰۷

اثر pH بر روی میزان رشد باکتری

بررسی اثر pH مختلف (۵، ۶، ۷) بر متغیر وابسته (لگاریتم تعداد باکتری برحسب CFU/ml) با استفاده از آنالیز واریانس نشان داد که بین pHهای مختلف در کاهش تعداد باکتری‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < ۰/۰۰۱$). به‌عبارت دیگر این نتیجه نشان می‌دهد که با کاهش میزان pH لگاریتم تعداد باکتری‌ها کاهش می‌یابد. آزمون t-test نیز نشان داد که اثر pH= ۵ بیشتر از سایر pHها می‌باشد ($p < ۰/۰۰۱$).

اثر مقادیر نمک بر روی میزان رشد باکتری

مطالعه اثر درصدهای نمک (۰، ۱، ۲ و ۴ درصد) بر متغیر وابسته (لگاریتم تعداد باکتری برحسب CFU/ml) توسط آنالیز واریانش نشان داد که بین غلظت‌های مختلف نمک ۰، ۱، ۲ و ۴ درصد تفاوت معنی‌داری در کاهش تعداد باکتری‌ها وجود دارد ($p < ۰/۰۰۱$). آزمون t-test نیز نشان داد که نمک باعث کاهش تعداد باکتری‌ها می‌گردد. به‌طوری که کاهش تعداد باکتری‌ها در دو غلظت نمک ۲٪ ($p < ۰/۰۰۲$) و ۴٪ ($p < ۰/۰۰۱$) معنی‌دار بود.

بحث

به‌دلیل اهمیت فوق‌العاده زیاد لیستریا مونوسیتوژنز به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای منتقله از مواد غذایی مطالعات زیادی به‌منظور کنترل این باکتری با استفاده از مواد ضدمیکروبی در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های غذایی انجام شده است. همچنین با توجه به مقاومت سویه‌های مختلف باکتری لیستریا و به‌ویژه لیستریا مونوسیتوژنز به آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد نگهدارنده سنتتیک، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی و همچنین ترکیب عواملی از قبیل درجه حرارت پایین، pH، اسید و نمک در کنترل این باکتری افزایش یافته‌است (Yoon *et al.*, 2011؛ Boziaris & Nychas, 2006). در این مطالعه خواص ضدلیستریایی اسانس نعناع با استفاده از روش براث میکرودایلوشن در حالت‌های مختلف دما (۴، ۹ و ۱۴ درجه سلسیوس)، pH (۵، ۶ و ۷) و نمک (۰، ۱، ۲، ۴) مورد مطالعه قرار گرفت.

در آنالیز اسانس نعناع با استفاده از GC-MS مشخص شد که بیشترین ترکیب‌های موجود در آن کاروون (۷۸/۷۶٪) و لیمونن (۱۱/۵٪) می‌باشد. نتایج آنالیز اسانس با سایر مطالعاتی که ترکیب اسانس نعناع را بررسی کرده‌اند همخوانی دارد (Chauhan *et al.*, 2009؛ Telci *et al.*, 2010؛ Znini *et al.*, 2011؛ Govindarajan *et al.*, 2012). تفاوت‌هایی که در میزان این ترکیب‌ها در اسانس نعناع و حتی سایر اسانس‌های گیاهی وجود دارد به‌دلیل تفاوت در مرحله رشد گیاه و شرایط جغرافیایی مانند درجه حرارت، رطوبت نسبی و میزان تابش نور خورشید می‌باشد (Telci *et al.*, 2010).

در این بررسی حداقل غلظت مهاری اسانس نعناع ۱۶۰µl/ml تعیین شد. مطالعات کمی خواص ضدباکتریایی اسانس گونه‌های مختلف نعناع را مورد بررسی قرار داده‌اند. از این مطالعات می‌توان به بررسی Mahboubi و Haghi (۲۰۰۸) اشاره کرد که حداقل غلظت مهاری اسانس نعناع بر روی لیستریا مونوسیتوژنز را ۱µl/ml گزارش نمودند. تفاوت‌هایی که در میزان گزارش این شاخص بر روی باکتری وجود دارد می‌تواند به‌دلیل تفاوت در نوع سویه، دوز تلقیح و نوع محیط کشت باشد (Tajkarimi & Ibrahim, 2011).

در این مطالعه صرف‌نظر از تأثیر غلظت‌های مختلف نمک و درجه حرارت، با افزایش شرایط اسیدی تعداد باکتری‌ها کاهش یافت. Boziaris و Nychas (۲۰۰۶) و Razavi Rohani و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش کردند که pH اسیدی فاکتور تأثیرگذاری در کاهش تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. به‌طوری که نتایج این مطالعات و سایر مطالعات با بررسی ما همخوانی دارد (Bouttefroy *et al*., 2000؛ Le Marc *et al*., 2002؛ Koutsoumanis *et al*., 2004).

در این مطالعه مشخص گردید که غلظت‌های نمک ۲٪ و ۴٪ به‌صورت معنی‌داری باعث افزایش اثر اسانس نعناع در کاهش تعداد باکتری‌ها می‌شوند. همچنین استفاده از pHهای پایین و غلظت‌های نمک بالا سبب افزایش خواص ضدلیستریایی اسانس نعناع گردید. در واقع با افزایش غلظت نمک خاصیت آب‌گریزی غشای خارجی باکتری‌ها افزایش و نیز حلالیت پروتیئن‌های آن کاهش می‌یابد که این امر نفوذ اسانس نعناع به داخل غشای باکتری و به تبع آن خواص ضدمیکروبی آن را تسهیل می‌کند (Canillac & Mourey, 2004). تأثیر نمک در افزایش اثر اسانس نعناع در کاهش تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز با بسیاری از مطالعات که در این زمینه انجام شده است، همخوانی دارد (Canillac *et al.*, 2004؛ Boziaris & Nychas, 2006؛ Karina *et al.*, 2011؛ Razavi Rohani *et al.*, 2011).

همچنین افزایش دما نیز تأثیر معنی‌داری در کاهش تعداد باکتری‌ها داشت، به‌طوری که دمای ۱۴ درجه در مقایسه با دمای ۹ و ۴ درجه سلسیوس سبب کاهش بیشتر لگاریتم باکتری‌ها شد ($p < ۰/۰۱۶$). محققان در مطالعه اثر ضدلیستریایی هویج در درجه حرارت‌های مختلف نشان دادند که اثر این ماده در دمای ۱۰ و ۱۵ درجه سلسیوس در مقایسه با دمای ۴ درجه بیشتر می‌باشد (Tyagi *et al*., 2012). در بررسی تأثیر دما بر روی خواص ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی و مدل غذایی (شکلات) بر علیه لیستریا مونوسیتوژنز گزارش شده‌است که دمای ۲۰ درجه در مقایسه با دمای ۷ درجه سلسیوس تأثیر بیشتری در کاهش تعداد این باکتری دارد (Kotzekidou *et al*., 2008) که نتایج این مطالعات با نتایج ما همخوانی دارد. عدم تأثیر دماهای پایین در کاهش تعداد لیستریا مونوسیتوژنز برخلاف بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا به علت تفاوت در اسیدهای چرب موجود در غشای خارجی این باکتری می‌باشد که سبب شده‌است این باکتری در گروه باکتری‌های سرمادوست طبقه‌بندی شود (Mastronicolisa *et al*., 2006).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که احتمالاً از اسانس نعناع می‌توان به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در کارخانجات صنایع غذایی استفاده نمود، زیرا این ماده دارای خواص ضدمیکروبی علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد. به‌منظور کاربردی نمودن استفاده از این اسانس باید تحقیقات بیشتری بر روی خواص ضدمیکروبی آن در مدل‌های غذایی صورت گیرد. همچنین به‌منظور افزایش حساسیت باکتری‌های بیماری‌زا و کاهش غلظت استفاده از اسانس نعناع، مطالعه اثرات سینرژیست سایر اسانس‌های گیاهی با اسانس نعناع پیشنهاد می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Boziaris, I.S. and Nychas, G.J.E., 2006. Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. Food Microbiology, 23(8): 779-784.
- Bouttefroy, A., Mansour, M., Linder, M. and Milliere, J.B., 2000. Inhibitory combination of nisin, sodium chloride and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. International Journal of Food Microbiology, 54(1-2): 109-115.
- Canillac, N. and Mourey, A., 2004. Effects of several environmental factors on the anti-*Listeria monocytogenes* activity of an essential oil of *Picea excelsa*. International Journal of Food Microbiology, 92(1): 95-103.
- Chauhan, R.S., Kaul, M.K., Shahi, A.K., Kumar, A., Ram, G. and Tawa, A., 2009. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India. Industrial Crops and Products, 29(2-3): 654-656.
- Evrendilek, G.A. and Balasubramaniam, V.M., 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. Food Control, 22(8): 1435-1441.

International Journal of Infectious Diseases, 10(3): 236-241.
- Razavi Rohani, S.M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S. and Griffiths, M.W., 2011. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. LWT-Food Science and Technology, 44(10): 2260-2265.
- Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C.M., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S. and Duffy, G., 2010. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. International Journal of Food Microbiology, 139(1-2): 70-78.
- Shannon, E.M., Milillo, S.R., Johnson, M.G. and Ricke, S.C., 2011. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by exposure to a combination of nisin and cold-pressed terpeneless valencia oil. Journal of Food Science, 76(9): M600-604.
- Tajkarimi, M. and Ibrahim, S.A., 2011. Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. Food Control, 22(6): 801-804.
- Telci, I., Demirtas, I., Bayram, E., Arabaci, O. and Kacar, O., 2010. Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). Industrial Crops and Products, 32(3): 558-592.
- Tyagi, A.K., Malik, A., Gottardi, D. and Guerzoni, M.E., 2012. Essential oil vapour and negative air ions: A novel tool for food preservation. Trends in Food Science and Technology, 26(2): 99-113.
- Weerakkody, N.S., Caffin, N., Turner, M.S. and Dykes, G.A., 2010. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. Food Control, 21(10): 1408-1414.
- Xi, Y., Sullivan, G.A., Jackson, A.L., Zhou, G.H. and Sebranek, J.G., 2011. Use of natural antimicrobials to improve the control of *Listeria monocytogenes* in a cured cooked meat model system. Meat Science, 88(3): 503-511.
- Yoon, J.I., Bajpai, V.K. and Kang, S.C., 2011. Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. Food and Chemical Toxicology, 49(1): 109-114.
- Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z. Li, J., Li, J. and Yan, W., 2007. The antibacterial effects of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*. Journal of Food safety, 27(2): 124-133.
- Znini, M., Bouklah, M., Majidi, L., Kharchouf, S., Aouniti, A., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Costa, J. and Al-Deyab, S.S., 2011. Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. International Journal of Electrochemical Science, 6(1): 691-704.
- Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswari, M. and Yogalakshmi, K., 2012. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. Parasitology Research, 110(5): 2023-2032.
- Hsieh, Y.H., Yan, M., Liu, J.G. and Hwang, J.C., 2011. The synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria* spp. in soymilk. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42(4): 576-579.
- Karina, P., Julio, C., Leda, G. and Noemi, Z., 2011. Behavior of *Listeria monocytogenes* type1 355/98 (85) in meat emulsions as affected by temperature, pH, water activity, fat and microbial preservatives. Food Control, 22(10): 1573-1581.
- Kotzekidou, P., Giannakidis, P. and Boulamatsis, A. 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. LWT-Food Science and Technology, 41(1): 119-127.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A. and Sofos, J.N., 2004. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. Food Microbiology, 21(4): 415-422.
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A. and Satya, S., 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. Industrial Crops and Products, 34(1): 802-817.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P. and Thuault, D., 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. International Journal of Food Microbiology, 73(2-3): 219-237.
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q. and Li, C., 2011. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. Food Research International, 44(9): 3057-3064.
- Magalhães, L. and Nitschke, M., 2013. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. Food Control, 29(1): 138-142.
- Mahboubi, M. and Haghi, Gh., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology, 119(2): 325-327.
- Mastronicolisa, S.K., Bouraa, A., Karaliota, A., Magiatisc, P., Arvanitisa, N., Litos, C., Tsakirakis, A., Paraskevas, P., Moustaka, H. and Heropoulos, G., 2006. Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*: focus on neutral lipids. Food Microbiology, 23(2): 184-194.
- Noriega, E., Newman, J., Saggers, E., Robertson, J., Laca, A., Díaz, M. and Brocklehurst, T.F., 2010. Antilisterial activity of carrots: effect of temperature and properties of different carrot fractions. Food Research International, 43(10): 2425-2431.
- Rasooli, I., Rezaei, M.B. and Allameh, A., 2006. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*.

Antilisterial effect of *Mentha spicata* in the presence of temperature, pH and NaCl

M.H. Moosavy[1*] and N. Shavisi[2]

1*- Corresponding author, Department of Food Hygiene and Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran, E-mail: moosavymh@gmail.com

2- Veterinary Medicine Graduate Student, Department of Food Hygiene and Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: January 2013 Revised: May 2013 Accepted: May 2013

Abstract

Listeria monocytogenes is an important food-borne pathogen and its control in foods is a significant challenge. This study evaluated the effectiveness of *Mentha spicata* essential oil on limiting *L. monocytogenes* growth at different temperatures (4, 9 and 14°C), pH (5, 6 and 7) and NaCl concentrations (0, 1, 2 and 4 g/100mL). Chemical constituents of the *M. spicata* essential oil were identified by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The susceptibility of bacterium was performed by the minimal inhibitory concentration (MIC) using the micro-broth dilution technique. The major detected components were carvone (78.76%), limonene (11.50%) and menthol (1%). The MIC value of essential oil was 160µl/mL. The results obtained showed that the effectiveness of *M. spicata* was pronounced by increasing of salt and temperature and decreasing pH. In conclusion, the encouraging results indicated that the essential oil of *M. spicata* might be exploited as natural preservative for the control of *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Mentha spicata*, temperature, pH, NaCl.