نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۳ شماره ۳/ سال ۱۳۹۲

اثر ترکیبی اسانس نعناع و نایسین بر روی رشد *اشریشیا کلی* O157:H7

میرحسن موسوی[۱*] و نسیم شاویسی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/٦/۲٤

[۱] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان دانشگاه تبریز

[۲] دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان دانشگاه تبریز

[*] مسئول مکاتبه: Email: moosavymh@gmail.com

چکیده

بیماری‌های منتقله از مواد غذایی یکی از مهمترین مشکلات بهداشت عمومی در سراسر جهان می‌باشند. باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 مهمترین و شایع‌ترین باکتری گروه انتروهموراژیک می‌باشد. این باکتری از طریق مصرف مواد غذایی و آب آلوده سبب اسهال، کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولیتیک در انسان می‌شود. نشان داده شده است که اسانس‌های روغنی گیاهان و همچنین نایسین دارای خواص ضد میکروبی هستند و از این مواد می‌توان در کنترل باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زای منتقله از مواد غذایی بهره جست. در این مطالعه، خواص ضد باکتریایی اسانس نعناع و نایسین به صورت توأم بر روی *اشریشیا کلی* O157:H7 و با استفاده از حداقل غلظت مهارکنندگی مورد بررسی قرار گرفت. در آنالیز اسانس نعناع بیشترین ترکیب آن Carvone بود. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس ٤۰µl/ml تعیین شد. اثرات سینرژیستی اسانس نعناع و نایسین در کاهش تعداد باکتری متاثر از سایر پارامترهای مورد مطالعه مانند دما، غلظت نمک و pH بود. در این مطالعه نشان داده شد که تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های مورد مطالعه (گروه۱: ٥IU/ml +۲۰µl/ml، گروه۲: ۲/٥IU/ml +۲۰µl/ml، گروه ۳: ۲/٥IU/ml +۱۰µl/ml و ٥IU/ml +۱۰µl/ml) وجود دارد (P<۰/۰٥). با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که از اسانس نعناع و نایسین می‌توان به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در کنترل باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اسانس نعناع، نایسین، *اشریشیا کلی* O157:H7

The combined effect of *Mentha spicata* essential oil and nisin on the growth of *Escherichia coli* O157:H7

MH Moosavy[1*] and N Shavisi[2]

[1]Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Graduated student of Doctor Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: E-mail: moosavymh@gmail.com

Abstract

Food borne diseases are the most important public health concerns worldwide. *Escherichia coli* O157:H7 is the most common member of a group of entropathogenic *E. coli* strains that is food and water borne pathogen and cause diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in humans. Plant essential oils and Nisin have been known as antimicrobial agents that could be used to control food spoilage and food borne pathogenic bacteria. In this study the antimicrobial activity of combination of Nisin and *Mentha spicata* essential oil (EO) against *Escherichia coli* O157:H7 was determined by Minimal Inhibitory Concentration (MIC). The MIC value of EO was 40µl/ml. The synergism effects of *Mentha spicat*a essential oil and Nisin depended on the parameters such as temperature storage, NaCl concentration and pH. Our results revealed that the numbers of surviving *E. coli* O157:H7 following exposure to *Mentha spicata* oil and Nisin was differed significantly ($P<0.05$) with group 1: 20µl/ml EO + 5IU/ml Nisin; group 2: 20µl/ml EO + 2.5IU/ml Nisin and group 3: 10µl/ml EO + 5IU/ml Nisin, 10µl/ml EO + 2.5IU/ml Nisin. The encouraging results indicate the essential oil of *M. Spicata* might be used as natural preservative for the control of *E. coli* O157:H7.

Keywords: *Mentha spicata* essential oil, Nisin, *Escherichia coli* O157:H7

مقدمه

بیماری‌های منتقله از مواد غذایی یکی از مهمترین مشکلات بهداشت عمومی در سراسر جهان می‌باشند. علیرغم تکنولوژی‌های نوین امروزی از قبیل تولید مناسب با کیفیت بالا، بهداشت و کنترل کیفی، وجود سیستم تجزیه و تحلیل خطر و کنترل نقاط بحرانی (HACCP)، تعداد موارد بیماری‌های منتقله از مواد غذایی نسبت به دهه گذشته افزایش یافته است. جهانی‌شدن عرضه فروش مواد غذایی، معرفی غذاهای جدید، فرآوری‌های نوین مواد غذایی و افزایش تقاضای مردم در سراسر جهان برای مصرف مواد غذایی که کمتر تحت روش‌های فرآوری مختلف قرار گرفته‌اند و مواد غذایی آماده مصرف، میزان آلودگی میکروبی مواد غذایی را افزایش داده است (گارسیا و همکاران ۲۰۱۰). از مهمترین عوامل بیماری‌زایی که در اثر مصرف این نوع محصولات به انسان منتقل می‌شود می‌توان به *لیستریا، اشریشیا کلی، سالمونلا* و *کمپیلوباکتر* اشاره نمود. به همین دلیل باید تکنولوژی‌های نوین و نگهدارنده‌های جدید مواد غذایی مورد بررسی قرار گیرد (گارسیا و همکاران ۲۰۱۰).

در این راستا محققین تحقیقات زیادی را برای استفاده از افزودنی‌های طبیعی در مواد غذایی بررسی کرده‌اند، از این مواد می‌توان به ادویه‌جات و اسانس‌های روغنی گیاهان و باکتریوسین‌ها اشاره نمود (دولیگر و همکاران ۲۰۰٤ و تاج کریمی و ابراهیم ۲۰۱۰).

نعناع یکی از رایج‌ترین گیاهانی می‌باشد که از زمان باستان به دلیل خواص درمانی آن و همچنین

ویژگی‌های آروماتیک مورد استفاده قرار گرفته شده است. جنس نعناع یکی از اعضای خانواده لامیاسه بوده که دارای ۱۹ گونه و ۱۳ هیبرید طبیعی است. گونه‌های مختلف این گیاه در قسمت‌های مختلف جهان پراکنده می‌باشند. مهمترین و مشهورترین گونه‌های نعناع، *منتا پیپریتا* (نعناع فلفلی) و *منتا اسپیکاتا* (نعناع خوراکی) است. در کنار ویژگی‌های درمانی، عصاره این گیاه دارای خواص ضد باکتریایی و همچنین ضد قارچی و ضد سرطانی می‌باشد (کومار و همکاران ۲۰۱۱).

همچنین باکتریوسین‌ها به عنوان ابزارهای بیولوژیکی ارزشمندی در ایمنی مواد غذایی و کاهش میزان بیماری‌های منتقله از مواد غذایی مطرح می‌باشند. نایسین از مشهورترین باکتریوسین‌هایی می‌باشد که در گروه لانتی بیوتیک‌ها قرار گرفته است. این لانتی بیوتیک تنها باکتریوسینی می‌باشد که استفاده از آن در مواد غذایی توسط سازمان‌های بهداشتی مجاز اعلام شده است (بوزاریس و همکاران ۲۰۰٦ و گالو و همکاران ۲۰۰۷). مهمترین علت استفاده از نایسین به عنوان نگهدارنده طبیعی این است که این ماده کاملاً بی‌ضرر است، توسط پروتئازهای دستگاه گوارش به اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده آن تجزیه می‌شود و تغییری در خواص ارگانولپتیک مواد غذایی ایجاد نمی‌کند (گیرا و همکاران ۲۰۰۷).

برای کاربردی‌کردن مصرف اسانس نعناع و نایسین به عنوان نگهدارنده مواد غذایی، مطالعه اثرات ضد میکروبی آن‌ها بر روی رشد میکروارگانیسم‌های مهم منتقله از مواد غذایی در مدل های آزمایشگاهی و غذایی ضروری می‌باشد. به همین دلیل هدف از این مطالعه بررسی توأم خواص ضد باکتریایی اسانس نعناع خوراکی و نایسین بر روی باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 در سه دما (٤، ۹ و ١٤ درجه سانتی گراد)، سه pH (٥، ٦ و ٧) و سه غلظت نمک (١، ٢ و ٤ درصد) در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس

اسانس استاندارد گیاه نعناع (*Mentha spicata*) از شرکت داروسازی باریج اسانس کاشان تهیه شد. اسانس گیری از گیاه نعناع به روش تقطیر با بخار آب انجام گردیده بود (لو و همکاران ۲۰۱۱). برای افزایش حلالیت و گسترش یکنواخت هر کدام از غلظت‌های مورد مطالعه اسانس نعناع در محیط کشت آبگوشت قلب و مغز از دی متیل سولفوکساید ۱۰درصد (DMSO) (مرک، آلمان) به عنوان امولسیفایر استفاده گردید. بر این اساس غلظت‌های مورد مطالعه اسانس نعناع از ۲۰µl/ml تا ۲٥٦۰µl/ml به صورت رقت‌های سریالی دوتایی تعیین شد (محبوبی و حقی ۲۰۰۸).

آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس

ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس گیاه مورد مطالعه با همکاری دانشکده شیمی دانشگاه تبریز شناسایی شدند. اسانس گیاه مورد نظر پس از آماده سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی تزریق گردید تا نوع ترکیب‌های تشکیل‌دهنده آن مشخص شود. مشخصات دستگاه گاز کروماتوگراف Agilent 6890 شامل: ستون مویینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲٥۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲٥ میکرومتر از نوع HP-5MS با برنامه دمایی ۷۰ تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد و با افزایش تدریجی ۲٥ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۰-۲ دقیقه بود. دمای محفظه تزریق ٢٦٥ درجه سانتی‌گراد و سرعت گاز هلیوم (به عنوان حامل) ۱/۲ میلی‌لیتر در هر دقیقه بود. طیف سنج جرمی از نوع Agilent 5973 با انرژی یونیزاسیون (EI) ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲٥۰ درجه سانتی‌گراد بود.

آماده سازی نایسین

نایسین خالص از شرکت سیگما کشور انگلستان خریداری گردید. برای آماده سازی 10^4 واحد بین‌المللی نایسین، ابتدا ۰/۰۲ گرم نایسین خالص را در ۱۰۰۰µl

اسید کلریدریک ۲٪ (۰/۰۲M) در میکروتیوپ‌های استریل حل نموده (موسوی و همکاران ۲۰۰۸)، در مرحله بعد آن را در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه در بن‌ماری حرارت داده و پس از سانتریفوژ و فیلتراسیون مایه‌رویی با فیلتر ۰/۲۲ میکرون، آن را تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمودیم. بر این اساس هر ۰/۱µl از محلول نایسین و اسید کلریدریک ۲٪ حاوی ۲ واحد بین‌المللی نایسین بود (آل-هالی و همکاران ۲۰۱۲). غلظت‌های مورد مطالعه نایسین نیز بر اساس واحد بین‌المللی و از ۲/۵ تا ۲۵۶۰ به صورت رقت‌های سریالی دوتایی تعیین گردید.

باکتری مورد مطالعه و تعیین دوز تلقیح

باکتری مورد مطالعه *اشریشیا کلی* O157:H7 (ATCC 10536) بود که بصورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید. آماده سازی باکتری برای تلقیح با انتقال باکتری از میکروتیوپ استریل به محیط آبگوشت قلب و مغز (مرک، آلمان) و نگهداری آن به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. مجدداً کشت دومی از کشت ۲٤ ساعته اول در محیط آبگوشت قلب و مغز دیگر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت تهیه شد و با استفاده از تهیه سری رقت و کشت سطحی مقدار باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص گردید. با انجام محاسبات ریاضی دوز تلقیح تعیین شد. نهایتاً به هر میلی‌لیتر محیط کشت تعداد 10^6 باکتری تلقیح گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع و نایسین

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع و نایسین از روش براث میکرودایلوشن در پلیت‌های میکروتیتر ۹٦ چاهکی استریل (اکستراژن، آمریکا) استفاده شد. بطور خلاصه در هر چاهک ۱٦۰ 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 ضد میکروبی) و کنترل منفی (ترکیب ضد میکروبی+ 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 ضد میکروبی و باکتری مورد مطالعه، پلیت‌های میکروتیتر به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۲۵۰rpm برای مخلوط شدن در شیکر قرار داده شدند. بعد از طی شدن زمان ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده، چاهک‌ها از نظر وجود کدورت به طریق چشمی بررسی و حداقل غلظتی که مانع رشد باکتری یا عدم کدورت مشهود با گروه کنترل بود، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین گردید. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از نمونه در محیط آگار قلب و مغز (مرک، آلمان) کشت داده شد و پس از طی ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد عدم رشد تایید گردید (ویراکدی و همکاران ۲۰۱۰ و ریواس و همکاران ۲۰۱۱). تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نایسین نیز مشابه با اسانس نعناع صورت گرفت.

بررسی اثر ترکیبی اسانس نعناع و نایسین بر روی رشد باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7

برای تعیین اثر متقابل اسانس مورد مطالعه و نایسین، دو غلظت پایین تر از حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس (۱۰µl/ml و ۲۰µl/ml) و نایسین (۲/۵IU/ml و ۵IU/ml) در نظر گرفته شد. به عبارت دیگر در حالت ترکیبی چهار حالت (۱: ۲/۵IU/ml+۱۰µl/ml، ۲: ۲/۵ IU/ml+۲۰µl/ml، ۳: ۵IU/ml+۱۰µl/ml، ۴: ۵IU/ml+۲۰µl/ml) مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله از آزمایش در هر چاهک پلیت‌های میکروتیتر، ۱٦۰ میکرولیتر محیط آبگوشت قلب و مغز استریل دارای pH ۵، ٦ و ۷ و دارای غلظت نمک ۱، ۲ و ٤ درصد، ۲۰ میکرولیتر از دو غلظت مورد مطالعه اسانس و نایسین و ۲۰ میکرولیتر کشت باکتریایی اضافه گردید. کنترل مثبت (چاهک حاوی باکتری+ محیط آبگوشت قلب و مغز

بدون ترکیب ضد میکروبی) و کنترل منفی (ترکیب ضد میکروبی+ محیط آبگوشت قلب و مغز بدون باکتری) در این مرحله از آزمایش در نظر گرفته شد. پس از افزودن غلظت‌های مورد نظر از اسانس، نایسین و باکتری مورد مطالعه، پلیت‌های میکروتیتر به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۲۵۰rpm در شیکر برای مخلوط شدن قرار داده شد و سپس به مدت ٢٤ ساعت در ۳ دمای ٤، ۹ و ١٤ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. لازم به ذکر است که تنظیم pH قبل از شروع انجام مراحل کار صورت گرفت، بدین صورت که pH محیط‌های کشت مورد نیاز، با استفاده از اسید سیتریک (مرک، آلمان) و به وسیله دستگاه pH متر مدل Metrohm 826 تنظیم شد. مقادیر نمک مورد نیاز نیز قبل از انجام آزمایش به محیط‌های کشت اضافه گردید. به منظور ارزیابی رشد باکتری پس از طی دمای گرمخانه‌گذاری شمارش پرگنه به روش کشت سطحی در محیط آگار قلب و مغز صورت گرفت (رضوی روحانی و همکاران ۲۰۱۱). برای شمارش تعداد باکتری در هر کدام از مراحل انجام آزمایش، پس از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیتی انتخاب شد که تعداد پرگنه باکتری آن بین ۳۰۰-۳۰ بود.

در این مطالعه از شاخصی به نام DP (Differences in Population) استفاده گردید که به صورت زیر محاسبه می‌شود (ژو و همکاران ۲۰۰۷).

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

N_0: تعداد باکتری اولیه

N: تعداد باکتری پس از ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری

این مطالعه با سه بار تکرار انجام گرفت.

آنالیز آماری

قبل از آنالیز آماری داده‌ها، ابتدا نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها با استفاده از KS test مورد بررسی قرار گرفت و پس از آنکه مشخص گردید که داده‌ها نرمال می‌باشند و در واریانس‌ها همگنی وجود دارد (P>۰/۰۵)، از آزمون آنالیز واریانس و با استفاده از ANOVA و Turkey test جهت بررسی اثر متغیرهای مستقل (مقادیر اسانس و نایسین، مقادیر مختلف نمک و درجه حرارت) بر روی متغیر وابسته (کاهش لگاریتم تعداد باکتری) استفاده گردید و از همبستگی اسپیرمن برای بررسی ارتباط متغیرهای مزبور با هم استفاده شد. نسخه نرم افزار SPSS مورد استفاده ۱۹ بود و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار لحاظ گردید.

نتایج و بحث

آنالیز اسانس

نتایج آنالیز ترکیبات اسانس نعناع مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از GC-MS در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که در این جدول آمده است، ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس شامل Carvone (٪۷۸/۷٦)، Limonene (٪۱۱/۵)، Menthone (٪۱/۰۱)، Menthol (٪۱)، Cis-Dihydrocarveol (٪۱/٤۳)، Trans-Caryophyllene (٪۱/۰٤)، Beta-Bourbonene (٪۱/۲۳) و Terpinen-4-ol (٪۰/۹۹) می‌باشند. آزمایشات مختلف نشان داده است که گونه‌های مختلف اسانس نعناع از لحاظ ترکیب با یکدیگر تفاوت بسیار زیادی دارند، برای مثال بیشترین ترکیب *منتا پیپریتا*، Piperitone و Pulegone می‌باشد که میزان این دو ترکیب با توجه به روش اسانس‌گیری متفاوت است (محبوبی و حقی ۲۰۰۸). بطور کلی مقایسه نتایج بدست آمده در مورد خواص ضد باکتریایی اسانس‌های مختلف بسیار مشکل می‌باشد. از دلایل آن می‌توان به تفاوت در روش‌های مختلف بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس‌ها، منابع تهیه آن‌ها و سویه‌های باکتریایی بکار برده شده، روش عصاره‌گیری، فاز رشد و میزان باکتری، نوع محیط کشت مورد استفاده، عوامل خارجی و داخلی مواد غذایی نظیر pH، چربی، پروتئین، آب، آنتی اکسیدان‌ها، مدت زمان و دمای گرمخانه‌گذاری، روش بسته‌بندی و ساختار فیزیکی مواد غذایی اشاره کرد. مدل‌های

مختلفی در مطالعات متعدد به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی و نگهدارندگی اسانس‌های گیاهی استفاده شده است. در برخی از این روش‌ها از محیط کشت و در برخی دیگر از مدل‌های غذایی برای بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها استفاده شده است (آخوندزاده و همکاران ۱۳۸٤، لیس-بالچین و همکاران ۲۰۰۳، بورت و همکاران ۲۰۰٤، برندی و همکاران ۲۰۰٦). در مطالعه نیریز نقدهی و همکاران که در سال ۱۳۸۸ خواص ضد باکتریایی اسانس نعناع و پونه کوهی را بر روی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلی* O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند، بیشترین ترکیبات موجود در اسانس Carvone (۵۵/۷۸ درصد)، Limonene (۲۳/۸۸ درصد) و Menthol (۳/۳۸ درصد) گزارش گردید که نتایج این مطالعه با مطالعه ما همخوانی دارد. بنابراین با توجه به مطالب گفته شده، نتایج بدست آمده در مطالعات مختلف بعضاً با یکدیگر متفاوت است. اما در بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس نعناع خوراکی در یونان، محققین گزارش کردند که Piperitenone oxide (۳٦٪) و 1,8-cineole (۱٤٪) بیشترین ترکیبات آن بوده است. میزان Carvone در اسانس نعناع جمع‌آوری شده در این کشور بسیار ناچیز بود (کولیپولوس و همکاران ۲۰۱۰).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع و نایسین

در این آزمایش حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع ٤۰µl/ml تعیین شد، اما با توجه به اینکه نایسین، بر روی باکتری‌های گرم منفی تاثیر کمی دارد، تا غلظت ۲۵٦۰IU/ml نایسین رشد باکتری بصورت کامل مهار نگردید.

بطور کلی مطالعات بسیار کمی اثر اسانس نعناع خوراکی را بر روی باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی و حتی مدل‌های غذایی مورد بررسی قرار داده‌اند. برخی از محققین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع را بر روی باکتری *اشریشیا کلی* به روش دیسک دیفیوژن و براث میکرودایلوشن مورد بررسی قرار دادند، اما در مطالعه آنان اسانس نعناع نتواست رشد باکتری را به صورت کامل مهار نماید (لو و همکاران ۲۰۱۱). در مطالعه نیریز نقدهی و همکاران در سال ۱۳۸۸، حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع بر روی این باکتری ۱۰۰۰۰ µl/ml تعیین گردید. طی مطالعه‌ای که اثر ضد باکتریایی اسانس نعناع را بر روی باکتری‌های *اشریشیا کلی* O157:H7 و *استافیلوکوکوس اورئوس* CECT 4459 در شرایط آزمایشگاهی و گوشت مورد بررسی قرار دادند، مشخص گردید که غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع برای باکتری *اشریشیا کلی* ۰/۵۰µl/ml بوده و در گوشت نیز باعث کاهش رشد باکتری می‌شود (دیگان و همکاران ۲۰۱۰). تفاوت حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع و همچنین عدم تاثیر بر روی رشد باکتری در مطالعه فوق‌الذکر و بررسی‌های دیگر می‌تواند به دلیل تفاوت در سویه باکتری، دوز تلقیح، نوع محیط کشت، شرایط رشد و فصل برداشت گیاه باشد (تاج کریمی و همکاران ۲۰۱۰).

نتایج آزمون آنالیز واریانس نشان داد که در بین گروه‌های مورد مطالعه (گروه۱: ۲۰µl/ml + ۵IU/ml، گروه ۲: ۲۰µl/ml + ۲/۵IU/ml، گروه ۳: ۱۰µl/ml + ۲/۵IU/ml و ۱۰µl/ml + ۵IU/ml) تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵). ضریب همبستگی اسپیرمن بر روی غلظت اسانس نعناع و نایسین با کاهش لگاریتم تعداد باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 به ترتیب برابر ۰/۸٤- و ۰/۱۷- بود (P<۰/۰۰۱). این بدین معنی است که با افزایش غلظت این مواد نگهدارنده، تعداد باکتری مذکور به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد.

جدول ۱- نتایج آنالیز اسانس نعناع خوراکی با استفاده از GC-MS

ترکیب	اندیس بازدارنده	درصد	ترکیب	اندیس بازدارنده	درصد
Beta- Myrcene	٤٥٠	۰/۲٥	Trans-Carveol	۷۷۳	۰/۳
Limonene	٥۰۹	۱۱/٥۰	Carvone	۸۱۹	۷۸/۷٦
Gamma-Terpinene	٥٥۳	۰/۱٦	Dihydrocarvyl acetate	۹۰٦	۰/٥۷
Menthone	۷۰۳	۱/۰۱	L-carveol	۹٤٦	۰/۳۲
Menthol	۷۱۳	۱	Beta-Bourbonene	۹۸۱	۱/۲۳
Terpinen-4-ol	۷۲۰	۰/۹۹	Trans-Caryophyllene	۱۰۲۱	۱/۰٤
Alpha-Terpinol	۷۳۷	۰/۳۱	Gamma-Amorphene	۱۰٤۸	۰/۲۱
Dihydrocarveol	۷٤۲	۰/۲۲	Alpha-Amorphene	۱۰٥۸	۰/۱٦
Cis-Dihydrocarveol	۷٤٦	۱/٤۳	سایر ترکیبات	-	۰/۱۱
Dihydrocarvone	۷٥٦	۰/٤۳			

مطالعات متعددی افزایش خواص ضدمیکروبی مواد نگهدارنده طبیعی مختلف را بصورت توأم در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های غذایی گزارش نموده‌اند (لو و همکاران ۲۰۱۱، رضوی روحانی و همکاران ۲۰۱۱، موسوی و همکاران ۲۰۰۸، لیس-بالچین و همکاران ۲۰۰۳)، علت افزایش تاثیر مواد ضد میکروبی به هنگام استفاده هم‌زمان، افزایش تعداد منافذ تشکیل شده در غشای سلولی عوامل بیماری‌زا و متعاقبا نشت ترکیبات داخل سلولی به خارج از سلول و همچنین مهار پروتئین‌های آنزیمی موجود در غشا می‌باشد که این پروتئین‌ها در حفظ ویژگی‌های عملکردی و ذخیره هیدروکربن‌ها در غشای سلولی نقش اساسی بر عهده دارند (لو و همکاران ۲۰۱۱، موسوی و همکاران ۲۰۰۸).

مطالعه اثر درجه حرارت‌های مختلف گرمخانه گذاری (٤، ۹ و ١٤ درجه سانتی گراد) بر متغیر وابسته (لگاریتم تعداد باکتری برحسب CFU/ml) توسط آنالیز واریانس نشان داد که دمای ١٤ درجه در مقایسه با دمای ٤ و ۹ درجه باعث کاهش بیشتر لگاریتم باکتری می‌شود (P<۰/۰٥) (جدول ۲). ضریب همبستگی اسپیرمن بر روی درجه حرارت با تعداد باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 برابر ۰/۱۸- بود (P<۰/۰۰۱). این بدین معنی است که با افزایش درجه حرارت نگهداری، تعداد باکتری مذکور به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. نتیجه این مطالعه با سایر مطالعات متفاوت می‌باشد. به عنوان مثال در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰ که اثر تیمول و کارواکرول را بر روی باکتری *اشریشیا کلی* در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند با افزایش شرایط اسیدی و کاهش دما، رشد باکتری کاهش یافت. علت تاثیر بیشتر خواص ضد باکتریایی ترکیبات مذکور به دلیل محیط کشت آگار مورد استفاده در این مطالعه بوده است که این محیط کشت در دماهای پایین باعث افزایش خواص ضد باکتریایی ترکیبات گردید (ریواس و همکاران ۲۰۱۰).

جدول ۲- اثر ترکیبی اسانس نعناع و نایسین در دماهای مختلف بر روی رشد باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7

دما / غلظت	٤°C	۹°C	١٤°C
۲/٥IU/ml +۱۰µl/ml	ns	ns	ns
٥IU/ml +۱۰µl/ml	ns	ns	P<۰/۰٥
۲/٥IU/ml +۲۰µl/ml	ns	ns	P<۰/۰۰۱
٥IU/ml +۲۰µl/ml	P<۰/۰٥	P<۰/۰٥	P<۰/۰۰۱

ns: در سطح ٥٪ معنی دار نبوده است.

بررسی اثر pHهای مختلف (۵، ٦ و ۷) بر متغیر وابسته (کاهش لگاریتم تعداد باکتری بر حسب CFU/ml) با استفاده از آنالیز واریانس نشان داد که با افزایش میزان pH لگاریتم تعداد باکتری کاهش می‌یابد. آزمون t-test نیز نشان داد که اثر pH=۷ بیشتر از سایر pHها می باشد (P<۰/۰۰۱) (جدول ۳). ضریب همبستگی اسپیرمن بر روی میزان pH با تعداد باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 برابر ۰/۱۷- بود (P<۰/۰۰۱) که نشان می‌دهد با افزایش pH (کاهش شرایط اسیدی) رشد باکتری فوق‌الذکر کاهش می‌یابد. در واقع باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 برخلاف بسیاری از باکتری‌ها یک باکتری مقاوم به اسید است. مطالعات مختلف نشان داده است که حساسیت این باکتری به pH کم بوده، به طوری که گزارش شده است این باکتری در pH کمتر از ۳/٤ نیز می‌تواند بقای خود را حفظ کند و همین مسئله باعث بروز چندین شیوع بیماری به دلیل مصرف آب میوه و میوه‌های اسیدی آلوده به این باکتری شده است (هان و لینتون ۲۰۰٤). محققین در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که شرایط اسیدی (pH حدود ٤/٥) تاثیر معنی‌داری در کاهش تعداد *اشریشیا کلی* O157:H7 ندارد (تاج کریمی و ابراهیم ۲۰۱۱).

مطالعه اثر درصدهای نمک (۱، ۲ و ٤ درصد) بر متغیر وابسته (کاهش لگاریتم تعداد باکتری بر حسب CFU/ml) توسط آنالیز واریانش نشان داد که کاهش تعداد باکتری در هر سه غلظت نمک ۱درصد (P<۰/۰٥)، ۲درصد (P<۰/۰۰۱) و ٤درصد (P<۰/۰۰۱) معنی‌دار بود. ضریب همبستگی اسپیرمن بر روی میزان درصد نمک با تعداد باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 برابر ۰/۳۹- بود (P<۰/۰۰۱). این ضریب نشان می‌دهد که با افزایش درصد نمک رشد باکتری فوق‌الذکر کاهش می‌یابد (جدول ٤).

جدول ۳- اثر ترکیبی اسانس نعناع و نایسین در pH های مختلف بر روی رشد باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7

pH / غلظت	٥	٦	۷
۲/٥IU/ml +۱۰µl/ml	ns	ns	ns
٥IU/ml +۱۰µl/ml	ns	ns	P<۰/۰٥
۲/٥IU/ml +۲۰µl/ml	ns	ns	P<۰/۰۰۱
٥IU/ml +۲۰µl/ml	P<۰/۰٥	P<۰/۰٥	P<۰/۰۰۱

ns: در سطح ٥٪ معنی دار نبوده است.

در واقع با افزایش غلظت نمک خاصیت آب گریزی غشای خارجی باکتری افرایش و حلالیت پروتئین‌های آن کاهش می یابد که این امر نفوذ اسانس نعناع و نایسین را به داخل غشای باکتری افزایش می‌دهد.

جدول ۴- اثر ترکیبی اسانس نعناع و نایسین در نمک های مختلف بر روی رشد باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7

نمک / غلظت	۱ درصد	۲ درصد	٤ درصد
۲/٥IU/ml +۱۰ µl/ml	ns	ns	P<۰/۰٥
٥IU/ml +۱۰ µl/ml	ns	ns	P<۰/۰۰۱
۲/٥IU/ml +۲۰ µl/ml	ns	ns	P<۰/۰۰۱
٥IU/ml +۲۰ µl/ml	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱

ns: در سطح ٥٪ معنی دار نبوده است.

این نتیجه که افزایش درصد نمک سبب افزایش میزان اثر اسانس‌های مختلف و همچنین نایسین می‌گردد با سایر مطالعات مطابقت دارد (التی و اسمید ۲۰۰۱ و ریواس و همکاران ۲۰۱۰).

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب عوامل محیطی مختلف (دما، pH و نمک) به همراه اسانس نعناع و نایسین موجب افزایش تاثیر این ترکیبات می‌شود. از طرف دیگر، با توجه به اینکه این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت، پیشنهاد می‌گردد که به منظور کاربردی‌تر کردن هرچه بیشتر نتایج این مطالعه، اثر اسانس نعناع و نایسین بر روی مدل‌های غذایی مختلف به خصوص گوشت و فرآورده‌های گوشتی (مهمترین مواد غذایی ناقل باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7) مورد بررسی قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

آخوندزاده بستی ا، میثاقی ع و غیبی س، ۱۳۸٤. اثر روغن فرار آویشن شیرازی شیرازی بر روی احتمال رشد باسیلوس سرئوس در محیط آبگوشت قلب و مغز. فصلنامه گیاهان دارویی، جلد چهارم شماره‌های ۱٦ صفحه‌های ۹۲-۸۵.

نیریز نقدهی م، رضوی روحانی س م، کریم گ، رضویلر و، زینالی ا و دلشاد ر، ۱۳۸۸. مطالعه اثرات توام مونولورین و اسانس‌های پونه و نعناع روی باسیلوس سرئوس و *اشریشیا کلی* O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، جلد سوم شماره‌های ٤ صفحه‌های ٦٦٦-٦٥٧.

Al-Holy M A, Al-Nabulsi A, Osaili T M, Ayyash M M and Shaker R R, 2012. Inactivation of *Listeria innocua* in brined white cheese by a combination of nisin and heat. Food Control, 1: 48-53.

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, 8: 779–784.

Brandi G, Amagliani G, Schiavano G F, De Santi M and Sisti M, 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on food borne pathogenic bacteria. Journal of Food Protection, 9: 2274–2279.

Burt S, 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. International Journal of Food Microbiology, 3: 223–253.

Deegan L H, Cotter P D, Hill C and Ross P, 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. International Dairy Journal, 9: 1058-1071.

Devlieghere F, Vermeiren L and Debevere J, 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. International Dairy Journal, 4: 273-285.

Gallo L I, Pilosof A M R and Jagus R J, 2007. Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey. Food Control, 9: 1086-1092.

Garcia P, Rodriguez L, Rodriguez A and Martinez B, 2010. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. Trends in Food Science & Technology, 8: 373-382.

Guerra N P, Agrasar A T, Macias C L, Bernardez P F and Castro L P, 2007. Dynamic mathematical models to describe the growth and nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CECT 539 in both batch and re-alkalized fed-batch cultures. Journal of Food Engineering, 2: 103-113.

Han Y and Linton R, 2004. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in strawberry juice and acidified media at different pH values and temperatures. Journal of Food Protection, 11: 2443-2449.

Koliopoulos G, Pitarokili D, Kioulos E, Michaelakis A and Tzakou O, 2010. Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha, Salvia*, and *Melissa* essential oils against the West Nile virus mosquito Culex pipiens. Parasitology Research, 2: 327–335.

Kumar P, Mishra S, Malik A and Satya S, 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. Industrial Crops and Products, 4: 802–817.

Lis-Balchin M, Steyrl H and Krenn E, 2003. The comparative effect of novel Pelargonium essential oils and their corresponding hydrosols as antimicrobial agents in a model food system. Phytotherapy Research, 1: 60–65.

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, 9: 3057–3064.

Mahboubi M and Haghi G, 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology, 2: 325–327.

Moosavy M H, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Zahraei Salehi T, Abbasifar R, Ebrahimzadeh Mousavi H L, Alipour M, Emami Razavi N, Gandomi H and Noori N, 2008. Effect of *Zataria multiflora Boiss*. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. Food Research International, 10: 1050–1057.

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, 10: 2260-2265.

Rivas L, McDonnell M J, Burgess C, 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, 1-2: 70–78.

Tajkarimi M 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: 801-804.

Tajkarimi M M, Ibrahim S S and Cliver D O, 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 9: 1199–1218.

Ultee A and Smid E J, 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology, 3: 373–378.

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, 10: 1408–1414.

Zhou F, Ji B, Zhang H, Jiang H, Yang Y and Li J, 2007. The antibacterial effects of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*. Journal of Food safety, 2: 124-133.