اثر عصاره متانولی نعناع و چوچاق بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر سویا در دمای ۱۵درجه سانتیگراد

فاطمه امینی[۱]، حمدالله مشتاقی*[۲]، مریم عباس والی[۲]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد.

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد.

* **نویسنده مسئول:** *moshtaghi@vet.sku.ac.ir*

تاریخ پذیرش : ۱۳۹۵/۷/۲ تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۱۲/۱۶

چکیده

در این بررسی که از نوع مطالعات مداخله ای بود، اثر عصاره متانولی چوچاق (*Eryngium Caeruleum*) و نعناع *Mentha Spicata*) در غلظت‌های ۵٪ و۱۰٪ بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیرسویا (توفو) که به هرگرم آن^{۶}۱۰ سلول باکتری اضافه شده بود، در دمای۱۵درجه سانتی‌گراد و در یک دوره زمانی ۱۵ روزه مطالعه شد. عصاره متانولی از خیساندن گیاهان خشک شده در متانول ۸۵ درصد تهیه شد و پنیر سویا از انعقاد شیرسویا توسط سولفات کلسیم تهیه گردید. نتایج حاصل از این ارزیابی توسط روش واریانس یک طرفه آنالیز گردید. در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد، *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از ۱۵ روز در هردو غلظت به کار برده شده (۵ و۱۰ درصد) از عصاره متانولی چوچاق، کاهش ۱ و ۲ لگاریتمی و در هردو غلظت به کار برده شده (۵ و۱۰ درصد) از عصاره متانولی نعناع، کاهش ۲ و ۴ لگاریتمی را در پی داشت. به طور کلی نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که هر دو گیاه نعناع و چوچاق دارای خاصیت ضدباکتریایی روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند و این خاصیت در گیاه نعناع بیشتراز گیاه چوچاق بود.

واژگان کلیدی: چوچاق (*Eryngium Caeruleum*)، نعناع (*Mentha Spicata*)، *استافیلوکوکوس اورئوس*، عصاره متانولی، پنیرسویا.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک کوکسی گرم مثبت و فاقد تحرک با قطر تقریبی ۰/۸ تا ۱ میکرون می‌باشد که تجمعات نامنظم از سلول ها شبیه به خوشه انگور را به وجود می آورد.*استافیلوکوکوس اورئوس* از علل عمده عفونت‌های بیمارستانی است و موجب طیف گسترده ای از بیماری‌های انسان شامل اندوکاردیت، مسمومیت غذایی، سندرم شوک سمی، سپتی سمی، عفونت پوست، عفونت‌های بافت نرم و عفونت‌های استخوان می شود. (El-Jakee et al., 2008; Khudor et al., 2012) همچنین این باکتری یکی از قابل توجه ترین پاتوژن‌های مسبب عفونت های داخل پستانی در گاوهای شیری جهان است (El-Jakee et al., 2008). *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیل تولید ترکیبی از فاکتورهای ایجادکننده حدت، توکسین، تهاجم و مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها به عنوان یک پاتوژن مهم محسوب می‌شود (Tasci et al., 2011). امروزه گرایش عمومی به استفاده از داروهای گیاهی و به طور کلی فرآورده‌های طبیعی در جهان رو به افزایش است. مهمترین علل این گرایش را می‌توان اثرات داروهای شیمیایی و مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک در باکتری‌ها از یک طرف و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی از سوی دیگر دانست (قاسمی، ۱۳۸۹ ; عباس والی و همکاران، ۱۳۹۴). بنابراین کاربرد یک روش کمکی و طبیعی برای مقابله با میکروارگانیسم ها اهمیت ویژه ای یافته است. یکی از این روش‌ها استفاده از عصاره‌های گیاهی است که توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف کرده است. نعناع گیاهی از تیره ی دو لپه ای هاست که سردسته ی تیره نعناعیان می باشد و جزو سبزی های خوراکی است. این گیاه گل‌های ریز و آبی رنگ دارد و قسمت

های مورد استفاده آن گل، برگ و ساقه ی آن است (پورفخاران و همکاران، ۱۳۹۰). نعناع گیاهی است با

ریشه هوایی و ساقه های مستقیم و چهارگوش، و برگ های آن به طول ۳ تا ۵ سانتی متر، متقابل، نیزه ای یا دوکی است، حاشیه‌ی آن دارای بریدگی‌های عمیقی است، بریدگی‌های کناره آن نوک تیز است. کرک برگ های نعناع کم است (زرگری، ۱۳۹۱; نظری، ۱۳۷۵). به خوبی اثبات شده است که اسانس یا عصاره از برخی از گونه های نعناع دارای خواص آنتی اکسیدانی است (صمصام شریعت، ۱۳۸۵). مطابق بعضی گزارش‌ها، عصاره این گیاه، دارای خواص ضدقارچی و ضدسرطانی است. برخی از پژوهشگران، خواص ضدانگلی و آنتی-اکسیدانی این گونه نعناع را اثبات نموده اند و استفاده از آن را برای پیشگیری از بیماری‌های قلبی ـ عروقی و سرطان پیشنهاد می کنند (زارع بیدکی و همکاران، ۱۳۹۳). گیاه چوچاق با نام علمی *Eryngium caeruleum* از گونه‌های متعلق به تیره چتریان می-باشد که به صورت نسبتا وسیعی در مناطق شمالی ایران یافت می‌شود و برگ برخی از گونه‌های آن در سالاد یا غذا و در طب سنتی استفاده می‌شود (مرتضی سمنانی و همکاران، ۱۳۸۲ ,.Khoshbakht et al ; 2007). چوچاق یک گیاه خاردار است که خارهای آن اغلب به رنگ آبی آسمانی یافت می‌شود. گونه هایی از این جنس دارای اثر مدر، اشتها آور، ملین، قاعده آور، معالج نفخ، خلط آور، ضدالتهاب، درمان کننده ناراحتی-های پوستی و بیماری‌های کبدی موثر در رفع اختلالات کلیوی و اندام‌های جنسی می باشند (مرتضی سمنانی و همکاران، ۱۳۸۲). ترکیبات عمده موجود در گیاه چوچاق شامل لیمونن ۵۲/۱٪ ، بتا- سزکوئی فلاندرن ۸/۱٪ ، آلفاـ پینن ۵/۵٪ ، دلتا-۲-کارن ۵/۳٪ می باشد (مرتضی سمنانی و همکاران، ۱۳۸۲). محصولات سویا منابع مهم ایزو فلاون‌ها محسوب می‌شوند. این ترکیبات اثر مفیدی روی سلامتی انسان دارند و به ویژه باعث جلوگیری از بروز سرطان و بیماری های قلبی- عروقی می‌شوند و نشانه‌های یائسگی نظیر گرگرفتگی و تحلیل استخوان را کاهش می‌دهند (Dwyer et al., 1994).

پنیر سویا (توفو) یک محصول گیاهی است و سال‌ها است که در کشورهای جنوب شرقی آسیا تولید می‌شود و از ارزش غذایی بالایی برخوردار است (قنبرزاده و همکاران، ۱۳۸۹). حاوی مواد معدنی از جمله سدیم، پتاسیم، آهن و فسفر است و دارای ویتامین‌های B و E می باشد. این محصول به علت نسبت بالای پروتئین به چربی دارای کالری نسبتا کمی در مقایسه با پنیر حاصل از شیر گاو می‌باشد (قنبرزاده و همکاران، ۱۳۸۹ ; Lim et al., 1990). پنیر سویا فاقد کلسترول و لاکتوز است، بنابراین برای افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز و افرادی با کلسترول بالا جایگزینی مناسب است (اسپرن و همکاران، ۱۳۹۰ ,.Lim et al ; 1990). با توجه به موارد ذکر شده و از آنجایی که در حال حاضر استفاده از عصاره‌های گیاهی جهت حفظ مـواد غذایی در برابر فساد توسط عوامل بیماری‌زا مورد توجه قرار گرفته است، اثر این عصاره گیاهی بر این دو باکتری در یک ماده غذایی مثل پنیرسویا مورد بررسی آزمایـشگاهی قـرار گرفت.

مواد و روش کار

برای انجام این مطالعه مداخله ای از عصاره متانولی نعناع و چوچاق استفاده شد. گیاه نعناع از بازار اصفهان خریداری و چوچاق مورد نیاز از ارتفاعات جواهرده در شهرستان رامسر جمع آوری شد و به وسیله گروه گیاه شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه شهرکرد مورد تایید قرار گرفت. بعد از تمیز شدن به دور از نور خورشید خشک شدند. گیاهان خشک شده در متانول ۸۵٪ خیسانده شدند و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند. پس از این مدت مخلوط حاصل توسط کاغذ صافی واتمن (۰/۲ میکرون) دو بار فیلترشد. عصاره‌های فیلتر شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا متانول آن به صورت کامل حذف گردد. در نهایت عصاره گیاهان پس از خشک شدن جمع آوری و در یخچال نگهداری شد. برای تهیه پنیر سویا از شیر سویای تولید شده به روش خیساندن

استفاده شد. برای این منظور میزان ۱۳۹ گرم لوبیای سویا در آب به میزان ۶ برابر وزن سویا خیسانده شد و به مدت ۹ ساعت در دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس لوبیای خیس شده با ۶۲۵ سی سی آب به مدت ۴ دقیقه ساییده شد. در نهایت محلول آبکی از پارچه چیت عبور داده شد تا شیر سویای صاف شده به دست آید. پنیر سویای مورد نیاز از انعقاد شیر سویای جوشانده شده و مخلوط کردن آن با میزان ۲ درصد وزن خشک سویا از سولفات کلسیم تهیه گردید (Cai et al., 1997). سپس در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه شد. پنیر تهیه شده هموژن شد و میزان ۲۰ سی سی از آن درون بشرهای استریل ریخته شد. سپس 10^7 CFU/g از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* که سوش استاندارد ATCC 6538 بود و از موسسه واکسن وسرم سازی رازی تهیه گردیده بود را به هر کدام از بشرهای مورد آزمایش اضافه گردید تا تعداد باکتری به ازای هر سی سی از پنیر سویا به 10^6CFU/gعدد برسد. عصاره متانولی نعناع و چوچاق پس از رقیق شدن با آب مقطر استریل، در دو غلظت ۵٪ و ۱۰٪ به نمونه‌های مورد مطالعه اضافه گردید. همچنین جهت جلوگیری از رشد کپک به نمونه‌های تیمار شده و همچنین به گروه‌های کنترل میزان ۶٪ نمک افزوده شد. برای هرگروه از غلظت‌ها ۲ کنترل درنظرگرفته شد. یک گروه از کنترل‌ها شامل پنیرسویا و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بدون عصاره بود و گروه دیگر شامل آب مقطر و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و عصاره مورد نظر بود. بشرهای مورد مطالعه دردمای ۱۵درجه سانتیگراد قرارگرفتند و شمارش باکتری‌ها در روزهای ۱۵،۱۲،۹،۶،۰۳ و روی محیط کشت پلیت کانت آگار (Plate Count Agar)ساخت شرکت QUELAB انجام گرفت. برای هرگروه سه تکرار در نظرگرفته شد. میانگین نتایج حاصل از ۳ تکرار هر گروه با استفاده از نرم افزار Sigma stat 2.1 و روش آنالیز واریانس یک طرفه و دو روش Tukey و Dunnett در سطح احتمال($P<0/05$) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

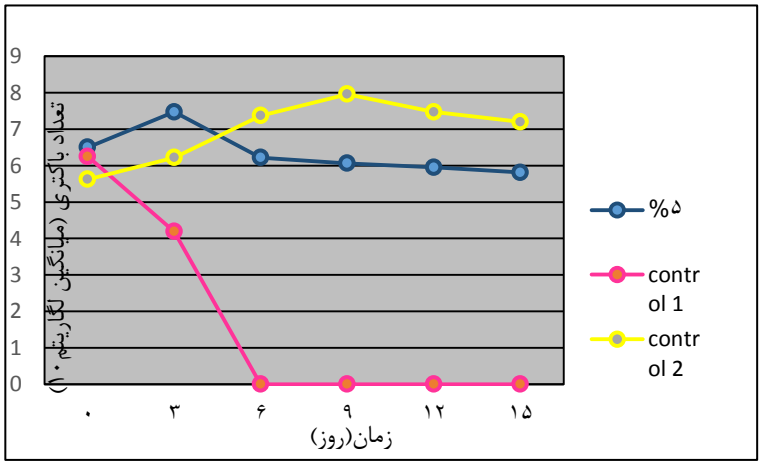
تاثیر عصاره چوچاق در غلظت های ۵٪ و۱۰٪ بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد در جدول ۱ و نمودارهای های ۱،۲ و۳ قابل مشاهده است. در نمونه‌ی تیمار شده با عصاره ۵ درصد تعداد باکتری از روز صفر تا روز ۳ به میزان ۱ لگاریتم افزایش داشت و بعد از آن از روز ۳ تا روز۹ به میزان ۲ لگاریتم کاهش یافت. سپس از روز ۹ تا روز ۱۲ دوباره ۱ لگاریتم افزایش یافت و مجددا از روز ۱۲ تا روز ۱۵ تعداد باکتری به میزان ۱ لگاریتم کاهش یافت. در نمونه کنترل ۱ که شامل آب نمک + عصاره ۵ درصد چوچاق+ *استافیلوکوکوس اورئوس*) تعداد باکتری از روز صفر تا روز ۳ تقریبا ثابت ماند و سپس از روز ۳ تا روز ۶ نتوانستیم باکتری جدا کنیم. در نمونه کنترل۳ (پنیر و *استافیلوکوکوس اورئوس*) تعداد باکتری از روز صفر تا روز ۶ با افزایش ۲ لگاریتم همراه بود و پس از آن تا روز ۱۵ تقریبا ثابت باقی ماند. آنالیز داده‌ها نشان داد که بین نمونه مورد بررسی و کنترل۳ (پنیر و *استافیلوکوکوس اورئوس*) از لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود نداشت ($P>0.05$) ولی بین دو گروه کنترل ۱ و۳ از لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود داشت. ($P<0.05$) (نمودار۱). در نمونه ی تیمارشده با عصاره ۱۰ درصد چوچاق تعداد باکتری از روز صفرتا روز۳ ثابت باقی ماند و بعدار آن تا روز ۶ به میزان ۱ لگاریتم کاهش یافت و تا روز ۹ تقریبا ثابت باقی ماند. سپس از روز ۹ تا ۱۲ به میزان ۱ لگاریتم کاهش داشت و تا روز ۱۵ ثابت باقی ماند. در نمونه کنترل ۲ (آب نمک+ عصاره ۱۰درصد چوچاق+ *استافیلوکوکوس اورئوس*) تعداد باکتری از روز صفر تا روز ۳ تقریبا ثابت با کاهش کمی همراه بود و پس از آن تا روز ۶ باکتری جدا نگردید. آنالیز داده‌ها مشخص کرد که بین نمونه

تیمارشده با عصاره ۱۰ درصد و گروه کنترل۳ از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P<0.05$). همچنین بین دو گروه شاهد۲ و ۳ نیز تفاوت معنی داری وجود داشت ($P<0.05$) (نمودار ۲). بین نمونه های تمار شده با عصاره ۵ و ۱۰درصد چوچاق از لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود داشت ($P<0.05$).

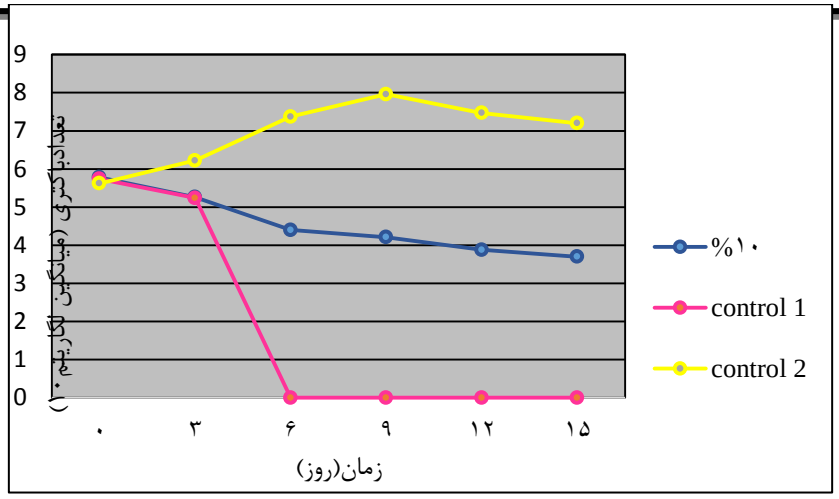
جدول۱- اثرغلظت های ۵ و۱۰٪ عصاره ی چوچاق بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد (تعداد باکتری برحسب CFU/gو زمان برحسب روز)

نمونه	پنیر+عصاره چوچاق۵٪ +*استافیلوکوکوس اورئوس*	کنترل۱	پنیر+عصاره چوچاق۱۰٪ +*استافیلوکوکوس اورئوس*	کنترل۲	کنترل۳
روز	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA
۰	$۳/۱۴۳\times۱۰^{۶}$	$۱/۷۸\times۱۰^{۵}$	۶×۱۰^{۵}	$۵/۵۱\times۱۰^{۵}$	$۴/۲۰\times۱۰^{۵}$
۳	$۲/۹۲\times۱۰^{۷}$	$۱/۵۵\times۱۰^{۵}$	$۱/۸۲\times۱۰^{۵}$	$۱/۷۵\times۱۰^{۵}$	$۱/۶۷\times۱۰^{۶}$
۶	$۱/۶۵\times۱۰^{۶}$	۰	$۲/۵۳\times۱۰^{۴}$	۰	$۲/۳۶\times۱۰^{۷}$
۹	$۸/۸۴\times۱۰^{۵}$	۰	$۱/۶۲\times۱۰^{۴}$	۰	$۹/۲۰\times۱۰^{۷}$
۱۲	$۱/۱۵\times۱۰^{۶}$	۰	$۷/۷۳\times۱۰^{۳}$	۰	$۱/۶۰\times۱۰^{۷}$
۱۵	$۶/۴۰\times۱۰^{۵}$	۰	$۴/۹۳\times۱۰^{۳}$	۰	۳×۱۰^{۷}

کنترل۱: آب+عصاره چوچاق ۵٪+*استافیلوکوکوس اورئوس*، کنترل۲ : آب+عصاره چوچاق ۱۰٪+*استافیلوکوکوس اورئوس*، کنترل۳ : پنیر+*استافیلوکوکوس اورئوس*



نمودار۱- اثرغلظت ۵٪ عصاره متانولی چوچاق بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر سویا در ۱۵درجه سانتیگراد
کنترل ۱: آب + عصاره چوچاق ۵٪ +*استافیلوکوکوس اورئوس* کنترل۲: پنیر+*استافیلوکوکوس اورئوس*



نمودار۲- اثرغلظت ۱۰٪ عصاره متانولی چوچاق بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر سویا در۱۵درجه سانتیگراد

کنترل ۱: آب+ عصاره چوچاق ۱۰٪+*استافیلوکوکوس اورئوس*، کنترل۲: پنیر+*استافلوکوکوس اورئوس*

جدول۲- اثرغلظت های ۵ و ۱۰٪ عصاره ی نعناع بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد (تعداد باکتری بر حسب CFU/gو زمان برحسب روز)

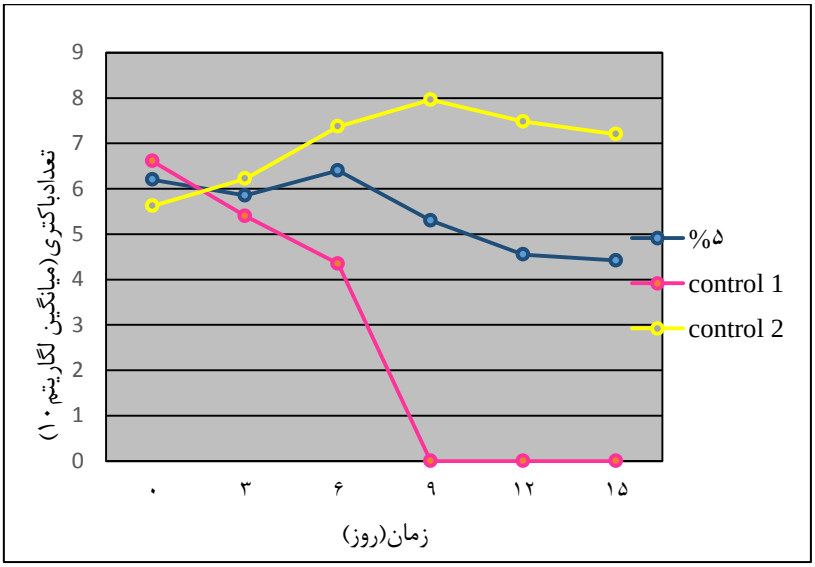
نمونه	پنیر+ عصاره نعناع۵٪ +*استافیلوکوکوس اورئوس*	کنترل۱	پنیر+ عصاره نعناع۱۰٪ +*استافیلوکوکوس اورئوس*	کنترل۲	کنترل۳
روز	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA
۰	۱/۵۷×۱۰^{۶}	۴/۰۳×۱۰^{۶}	۳/۰۷×۱۰^{۶}	۱/۰۱۱×۱۰^{۶}	۳/۳۶×۱۰^{۵}
۳	۷/۰۶×۱۰^{۵}	۰	۲/۸۳×۱۰^{۵}	۴/۰×۱۰^{۳}	۹/۵۸×۱۰^{۶}
۶	۱/۰۹×۱۰^{۶}	۰	۲/۸۰×۱۰^{۴}	۰	۳/۳۵×۱۰^{۷}
۹	۲/۰۰۳×۱۰^{۵}	۰	۲/۲۳×۱۰^{۳}	۰	۸/۲۵×۱۰^{۷}
۱۲	۳/۵۷×۱۰^{۴}	۰	۱/۲۳×۱۰^{۲}	۰	۲/۸۵×۱۰^{۷}
۱۵	۲/۶۱×۱۰^{۴}	۰	۴/۷۰×۱۰^{۲}	۰	۶/۳۵×۱۰^{۷}

کنترل۱ : آب نمک+عصاره نعناع۵٪+*استافیلوکوکوس اورئوس*. کنترل۲: آب نمک+عصاره نعناع ۱۰٪+*استافیلوکوکوس اورئوس*. کنترل۳: پنیر+ *استافیلوکوکوس اورئوس*

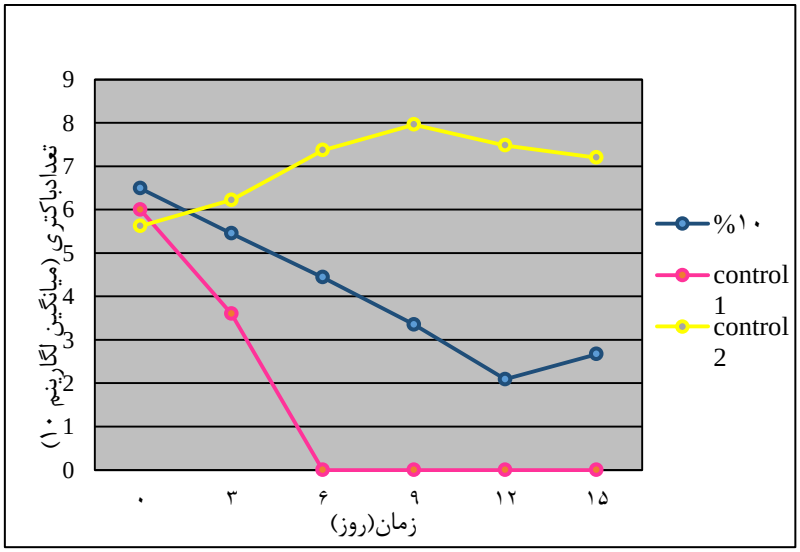
اثر ضد باکتریایی غلظت ۵ و ۱۰٪ عصاره نعناع بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر سویا در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد:همانطور که جدول زیر نشان می دهد عصاره ۵ درصد نعناع از روز صفر تا روز ۳ باعث کاهش ۱ لگاریتم در تعداد باکتری شد و سپس از روز ۳ تا ۶ تعداد باکتری ۱ لگاریتم افزایش یافت. سپس از روز ۶ تا ۱۲ تعداد باکتری ۲ لگاریتم کاهش یافت و از روز ۱۲ تا ۱۵ تقریبا ثابت باقی ماند. در گروه کنترل۱ (آب نمک+ عصاره ۵درصد نعناع+ *استافیلوکوکوس اورئوس*) از روز صفر تا ۳ نتوانستیم باکتری جداکنیم. در گروه تیمارشده با غلظت ۱۰درصد نعناع تعداد باکتری از روز صفر تا روز ۱۵ بصورت متوالی ۴ لگاریتم کاهش یافت. در گروه کنترل ۲ (آب نمک+ عصاره ۱۰درصد نعناع+ *استافیلوکوکوس اورئوس*) تعداد باکتری از روز صفرتا ۳ به میزان ۳ لگاریتم کاهش یافت و بعد از آن نتوانستیم باکتری جدا کنیم. در گروه کنترل۳ (پنیر+ *استافیلوکوکوس اورئوس*) تعداد باکتری از روز صفر تا ۶ به میزان ۲ لگاریتم افزایش یافت و پس از آن تا روز ۱۵ تقریبا ثابت ماند. آنالیز صورت گرفته نشان داد که بین گروه تیمارشده و کنترل۳ از لحاظ آماری تفاوت معنی

داری وجود داشت ($p<0.05$). همچنین بین دو گروه کنترل۱ و۳ نیز تفاوت معنی داری وجود داشت ($p<0.05$) (نمودار ۴).همچنین آنالیز انجام گرفته بین گروه تیمارشده با عصاره ۱۰ درصد نعناع و کنترل۲ از لحاظ آماری تفاوت معنی داری را نشان داد ($p<0.05$).

همچنین بین هر دو گروه کنترل نیز تفاوت معنی داری وجود داشت($p<0.05$). (نمودار ۵). مقایسه بین دوگروه تیمارشده با یکدیگر (غلظت۵ و۱۰ درصد) از لحاظ آماری تفاوت معنی داری نشان نداد ($p>0.05$).



نمودار۴-اثرغلظت ۵٪ عصاره متانولی نعناع بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر سویا در۱۵ درجه سانتیگراد.
کنترل ۱ : آب نمک +عصاره نعناع ۵٪+*استافیلوکوکوس اورئوس*. کنترل۲ : پنیر+*استافیلوکوکوس اورئوس*



نمودار۵- اثرغلظت ۱۰٪ عصاره متانولی نعناع بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر سویا در۱۵درجه سانتیگراد
کنترل ۱ : آب نمک +عصاره نعناع ۱۰٪+*استافیلوکوکوس اورئوس*. کنترل۲: پنیر+*استافیلوکوکوس اورئوس*

بحث

امروزه روش های متنوعی برای کنترل عوامل بیماری زای غذازاد به کار گرفته شده است. یکی از این روش ها افزودن برخی از افزودنی‌هاست اما با توجه به تنوع ژنتیکی ایجاد شده در عوامل بیماری زای میکروبی و پیدایش سویه های مقاوم و همچنین عوارض جانبی ناشی از مصرف بسیاری از این افزودنی‌ها، جایگزین کردن آن ها توسط مواد و روش‌های دیگر از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و سبب انجام تحقیقات زیادی در زمینه یافتن مواد افزودنی گیاهی بدون عوارض جانبی شده است. فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی به دلیل وجود ترکیبات فنولیک یا دیگر ترکیبات هیدروفیلیک در آن ها می‌باشد .(Dorman and Deans, 2000). بطور کلی ترکیبات فعال ضد-میکروبی اسانس ها، ترپنها نظیر اوژنول، تیمول و کارواکرول می باشند که ماهیت فنولی دارند. به‌ویژه خاصیت ضدمیکروبی اسانس گیاه نعناع که در محیط براث و مدل سیستم‌های غذایی توسط(Sivropoulou et al.,1995; Tassou et al., 1995) بررسی شد و نشان داده شد که این خاصیت بعلت وجود منتول (menthol)و کتون‌ها نظیر پولگون (pulegone)، ایزومنتون (isomenthone)، پیپریتون (piperitone)، کاروون (carvone) و دهیدروکاروون (dehydrocarvone) می باشد. بررسی‌های پیشین نشان داده اند که در مورد بسیاری از اسانس های گیاهان تیره نعناع، تیمول، منتول ،کارواکرول،در مواردی پاراسیمن مهمترین اجزاء موثر در فعالیت ضد-میکروبی اسانس می‌باشند و همچنین مشخص شده است که با افزایش درصد این ترکیبات در اسانس، میزان فعالیت ضدمیکروبی نیز افزایش می‌یابد (Beuchat et al., 1998). با توجه به نتایج به دست آمده از ارزیابی اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی گیاه نعناع بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر سویا می‌توان نتیجه گرفت که عصاره متانولی گیاه نعناع دارای اثر ضدباکتریایی روی باکتری مورد آزمایش بود. در ضمن این اثر در غلظت ۱۰ درصد عصاره مورد بررسی بیشتر از غلظت ۵ درصد عصاره بود ولی از لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود نداشت ($p>0.05$). همچنین اثر ضدباکتریایی عصاره نعناع بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به اثر گیاه چوچاق بیشتر بود. طباطبائی یزدی و همکاران (۱۳۹۳) تحقیقی در رابطه با اثر عصاره گیاهان تیره نعناع (آویشن، نعناع و کاکوتی) در جلوگیری از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ژئوتریکوم کاندیدوم* انجام دادند. این بررسی در نمونه‌های دوغ صنعتی استان خراسان رضوی با استفاده از روش سطح پاسخ انجام گرفت. برای این منظور ۳ سطح غلظت از هر عصاره (۰، ۰/۱۵ و۰/۰۷۵ v/v) مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی و مقایسه نتایج اثر عصاره در جلوگیری از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ژئوتریکوم کاندیدوم* در نمونه‌های دوغ مشخص کرد که عصاره گیاهان تیره نعناع به میزان بیشتری بر کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس* تأثیر داشت، فرمول بهینه عصاره‌ها برای کاهش یا کینتیک مرگ باکتری پاتوژن با غلظت عصاره آویشن (v/v) ٪۰/۱۴ و عصاره نعناع(v/v) ٪۰/۱۱ و عصاره کاکوتی(v/v) ٪۰ میزان تلقیح بدست آمده که در این شرایط بیشترین میزان کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۲۴ ساعت ۲/۸۴ عدد لگاریتمی گزارش شده و در ۱۴ روز ۱/۶۳ عددلگاریتمی می‌باشد (طباطبایی یزدی و همکاران، ۱۳۹۴).Tassou و همکاران (۱۹۹۵) مطالعه ای روی اثر نعناع بر باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریتیدیس* در دو دمای ۴ و۱۰ درجه سانتیگراد انجام دادند. طبق این مطالعه *سالمونلا* در ماده غذایی موردنظر (tzatziki) در غلظت‌های ۱٪، ۱/۵٪ و ۲٪ (v/w) از عصاره نعناع به میزان ۳،۴۰۶ d از بین رفت. *لیستریا مونوسیتوژنز* در تمام طول مدت آزمایش زنده باقی ماندند و کاهش خیلی کمی مشاهده شد (Tassou et al., 1995). در مطالعه ای که در سال

۱۹۹۵روی اسانس روغنی نعناع گرفت، از دو گونه نعناع (*M.Spicata*) و (*M.Pulegium*) *استفاده* شد. این بررسی روی هشت گونه از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی انجام گرفت. اسانس این دو گونه از نعناع در بالاترین *غلظت*(۰/۰۱) *اثر باکتری* کشی بیشتری نشان داد و غلظت های پایین تر (۰/۰۰۱) باعث کاهش وابسته به دوز در میزان رشد باکتریایی می‌شود (Sivropoulou et al., 1995). در مطالعه انجام گرفته توسط ما نیز مشخص شد که هر دو عصاره در غلظت بیشتر (۱۰٪) اثر ضدباکتریایی بیشتری نسبت به غلظت ۵٪ داشتند. موسوی و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی به بررسی اثر ضدمیکروبی نعناع بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر لیقوان پرداختند. در این مطالعه از دو غلظت ۲ و ۲/۵٪ عصاره ی نعناع در شیر خام میش استفاده شد. نمونه برداری پس از ۶۰ روز انجام گرفت و نتایج نشان داد که عصاره ی نعناع در تمامی غلظت‌ها در برابر لیستریا موثر است و تغییر معناداری بین غلظت ۲ و ۲/۵٪ عصاره وجود ندارد. همچنین مطالعات نشان داد که تاثیر عصاره روی لیستریا در دمای ۱۴ درجه سانتیگراد بیشتر از ۴ درجه بود. (Moosavy et al., 2013). زارع بیدکی و همکاران (۱۳۹۳) طی مطالعه‌ای به بررسی اثر ضد-باکتریایی نعناع سبز بر هشت گونه باکتری بیماری‌زای دستگاه گوارش پرداخته شد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس این گونه خاص نعناع، بر روی ۸ سویه استاندارد باکتریایی شامل: *اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آیروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا فلکسینری* و دو گونه *سالمونلا* بود. بر اساس نتایج به دست آمده، میانگین MIC اسانس نعناع در بین باکتری های مورد آزمایش، تفاوت معنی داری داشت ($P<0.05$). به طوریکه بیشترین حساسیت نسبت به این اسانس، در *باسیلوس سرئوس* و کمترین حساسیت در *کلبسیلا پنومونیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود داشت. اما از لحاظ آماری، اختلاف معنی داری بین میانگین MBC این اسانس در بین باکتری‌ها مشاهده نشد ($P>0.05$) (زارع بیدکی و همکاران، ۱۳۹۳) مطالعات اندکی روی گیاه چوچاق انجام گرفته است که ممکن است به دلیل بومی و ناشناخته بودن این گیاه باشد. اکثر مطالعات انجام شده روی این گیاه و همچنین سایر گونه های مختلف ارینجیوم شامل آنالیز ترکیبات موجود در اسانس این گیاهان می‌باشد. مرتضی سمنانی و همکاران(۱۳۸۲) طی مطالعه ای به بررسی و آنالیز ترکیبات گیاه چوچاق پرداختند. نتایج حاصل از این تحقیق منجر به شناسایی ۱۲ ترکیب در گیاه چوچاق شد. از بین این ترکیبات لیمونن (۵۲/۱٪)، بتا-سزکوئی فلاندرن(۸/۱٪)، آلفا- پینن (۵/۵٪) و دلتا-۲-کارن (۵/۳٪) ترکیبات عمده گیاه چوچاق را تشکیل می‌دهد. (مرتضی سمنانی و همکاران ،۱۳۸۲). صفری و همکاران (۱۳۹۴) طی مطالعه ای به بررسی اثر ضد-باکتریایی اسانس چند گونه از گیاهان بومی کشور علیه باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* پرداختند. این مطالعه روی اسانس گیاهان آویشن شیرازی، زیره سیاه، اناریجه، سیر وزولنگ انجام شد. زولنگ(*Eryngium campestre*) یک گونه از خانواده Eryngium می باشد. نتایج اندازه گیری قطر هاله مهاری نشان داد که قطر هاله مهاری استرپتومایسین ۰/۴±۱۶/۹ میلی متر و اسانس زولنگ، ۰/۷ ± ۱۸/۵میلی متر تعیین شد. در واقع اندازه هاله ی عدم رشد این باکتری تحت تاثیر اسانس زولنگ در سطح نزدیک به استرپتومایسین بود و اختلاف معناداری بین آنها مشاهده نشد($p> 0.05$). در مطالعه حاضر مقادیر MIC اسانس زولنگ برای *استرپتوکوکوس اینیایی* ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد (صفری و همکاران، ۱۳۹۴). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷ انجام شد به بررسی و آنالیز ترکیبات دو گونه از جنس Eryngium پرداختند. این دو گونه شامل *E.serbicum* و *E palmatum* بودند. ترکیبات اصلی *E.serbicum* شامل (۱۹/۷٪) germacrene D

، (۶/۹٪) spathulenol و (۱۰٪) β-elemene می باشند. ترکیبات اصلی *E.palmatum* شامل (۲۱/۳٪) sesquicineole ، (۱۶٪) spathulenol، (۱۶٪) caryophyllene oxide و (۵/۵٪) sabinene بود.(Capetanos et al., 2007).

کاپلی و همکاران (۲۰۰۰) پژوهشی انجام دادند که فعالیت ضدالتهابی و ضددردی گونه‌های *Eryngium* را نشان داد. عصاره به دست آمده از هر دو قسمت‌های هوایی و یا ریشه های هشت گونه در حال رشد Eryngium درترکیه (*E. Eryngium Campestre* ، *E. Creticum*، *E. Davisii*، *E. Falcatum*، *E. Isauricum*، E.Maritimum و *E. Kotschyi*، *E. Trisectum*) فعالیت ضد التهابی و ضد دردی را نشان داد. (Kupeli et al., 2000). در سال ۱۹۹۷ تحقیق دیگری خواص ضدالتهابی و ضددرد برگ گیاه *Eryngium Foetidum L.* نشان داد. (Saenz et al., 1997). در این مطالعه انجام شده توسط ما به بررسی اثر ضد باکتریایی گیاه چوچاق پرداخته شد. با توجه به نتایج به دست آمده از ارزیابی اثر ضدباکتریایی عصاره الکلی گیاه چوچاق بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر سویا در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد می‌توان نتیجه گرفت که عصاره الکلی چوچاق دارای اثر ضد باکتریایی روی باکتری مورد آزمایش بود که این اثر در غلظت۱۰درصد عصاره مورد بررسی بیشتر از غلظت ۵ درصد عصاره بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری داشت .($P<0.05$) هر چند طعم و مزه پنیر تولید شده با غلظت ۱۰ درصد چوچاق شاید مطلوب ذائقه همه نباشد اما در ناحیه شمال کشور با شناختی که مردم ناحیه از این گیاه دارند و در مواد غذایی مختلف از آن استفاده می کنند، قابل مصرف است. در آنالیز ترکیبات گیاه چوچاق که توسط مرتضی سمنانی و همکاران (۱۳۸۲) انجام گرفت، مشخص شد که حدود ۷۱ درصد ترکیبات چوچاق را مونوترپنوئیدها، ۱۲/۶ درصد را سزکوئی ترپنوئیدها و ۰/۶ درصد را دی ترپنوئیدها تشکیل می‌دهند که با توجه به این مطلب می‌توان احتمال داد که اثر ضدمیکروبی این گیاه به دلیل وجود این ترکیبات بخصوص سزکوئی ترپنوئید ها می‌باشد بنابراین با توجه به این نکته که مطالعه‌ی چندانی در رابطه با اثر ضد باکتریایی این گیاه انجام نگرفته است پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری دراین باره و در جهت تایید و یا رد نتایج حاصل توسط ما انجام گیرد.

منابع

۱. اسپرن، ویدا.، قنبرزاده، بابک.، حسینی، سیدابراهیم. (۱۳۹۰). مطالعه اثر هیدروکلوئید کاراگینان و منعقدکننده‌های گلوکونودلتالاکتون و کلرید کلسیم بر ویژگی‌های رئولوژیکی فیزیکی و حسی پنیر سویا. علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال ششم، شماره ۱، صفحه ۹۰-۸۱.

۲. پورفخاران، محمد.، نوری آق قلعه، مرضیه. (۱۳۹۰). راهنمای جامع گیاهان دارویی. جلد دوم، چاپ اول، انتشارات ابتکار دانش، صفحه ۱۴۳.

۳. زارع بیدکی، مجید.، عرب، مینا.، خزاعی، محترمه.، افکار، احسان. (۱۳۹۳). اثر ضد باکتریایی اسانس نعناع سبز بر هشت گونه باکتری بیماری‌زای مهم دستگاه گوارش. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، دوره ۲۱، شماره۳، صفحه ۲۸۲-۲۷۴.

۴. زرگری، علی. (۱۳۹۱). گیاهان دارویی. چاپ اول، انتشارات تلاش، صفحه ۵۶۷.

۵. صفری، رضا.، عادل، میلاد.، منجی، هادی.، ریاحی چلیچه، حسین.، نعمت الهی، امین. (۱۳۹۴). بررسی اثرات ضد باکتریایی برخی از اسانس‌های گیاهان بومی کشور علیه باکتری *Streptococcus iniae* در شرایط آزمایشگاهی. بوم شناسی آبزیان، دوره ۱۴، شماره۴، ۱۳۹۴؛ ۴۰-۳۳.

۶. صمصام شریعت، هادی. (۱۳۸۵). گیاهان دارویی. چاپ اول، انتشارات چهارباغ، صفحه ۴۶.

۷. طباطبایی یزدی، فریده.، علیزاده بهبهانی، بهروز.، مرتضوی، سید علی. (۱۳۹۴). بررسی اثر عصاره گیاهان تیره نعناع (آویشن، نعناع وکاکوتی) در جلوگیری از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ژئوتریکوم کاندیدوم* در نمونه‌های دوغ صنعتی استان خراسان رضوی با استفاده از روش سطح پاسخ. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. دوره ۱۳. شماره ۵۱. صفحه ۲۸-۱۵.

۸. عباس والی، مریم.، اسماعیلی کوتمهر، محمود. ، مشتاقی، حمدالله.، اسکندری، محمدهادی. (۱۳۹۴). بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی برگ چهار رقم زیتون ایرانی بر اشریشیا کلی. مجله میکروب شناسی مواد غذایی. سال دوم. شماره ۵. صفحه۷۷- ۶۷.

۹. قاسمی، عبدالله. (۱۳۸۹). گیاهان دارویی و معطر. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، صفحات ۲۱۴-۲۰۲ ، ۲۱۵-۲۰۳، ۱۵.

۱۰. قنبرزاده، بابک.، اسپرن، ویدا.، حسینی، سید ابراهیم. (۱۳۸۹). تاثیر پکتین بر برخی ویژگی‌های فیزیکی و حسی تافوی (پنیر سویا) تولید شده توسط منعقد کننده‌های کلرید کلسیم و گلوکونودلتالاکتون. نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، جلد۶، شماره۲، صفحه ۱۴۴-۱۳۶.

۱۱. مرتضی سمنانی، کتایون.، آزادبخت، محمد.، هوشمند، علی. (۱۳۸۲). بررسی مواد متشکله اسانس اندام‌های هوایی گیاهان *Eryngium Caeruleum* و *Bungei Boiss*. مجله علوم دارویی، سال اول، شماره ۱، صفحه ۴۸-۴۳.

۱۲. نظری، مرتضی. (۱۳۷۵). خواص سبزی‌های خوراکی. چاپ سوم، انتشارات پیام آزادی، صفحه ۱۹۹.

13. Beuchat, L.R., and Golden, D. A. 1998. Antimicrobials naturally in foods. Food technol. 11:134 -142.
14. Cai, T.D., Chang, K.C., Shih, M.C., Hou, H.J., and Ji, M. 1997. Comparison of bench and production scale methods for making soymilk and tofu from 13 soybean varieties. Food Res Int. 30: 659-668.
15. Capetanos, C., Saraglou, V., Marin, P., Simic, A., and Skaltsa, H.D. 2007. Essential oil analysis of two endemic *Eryngium* species from Serbia. J. Serb. Chem. Soc. 72 (10): 961–965.
16. Dorman, H.J., and Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activities of plant volatile oils. J Appl Microbiol. 88: 308-316.
17. Dwyer, J.T., Goldin, B.R., Saul, N. Gualtieri, L., Barakat, S., and Adlercreutz, H. 1994. Tofu and soy drinks contain phytoestrogens. J Am Diet Assoc. 94:7: 739-743.
18. El-Jakee, J., Nagwa, A.S., Bakry, M., Zouelfakar, S.A, Elgabry, E., and Gad El-Said, W.A. 2008. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and animal Sources**.** Am Eurasian J Agric Environ Sci**.** 4: 221-229.
19. Khoshbakht, K., Hammer, K., and Pistrick, K. 2007. Eryngium caucasicum Trautv cultivated as a vegetable in the Elburz Mountains (Northern Iran). Genet Resour Crop Evol. 54: 445- 448.
20. Khudor, M.H., Abbas, B.A., and Idbeis, H.I. 2012. Detection of enterotoxin genes of *staphylococcus aureus* isolates from raw milk. Bas.J.Vet.Res. 11: 254-264.
21. Kupeli, E., Kartal, M., Aslan, S., and Yesilada, E. 2000. Comparative evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish Eryngium species. J Ethnopharmacol. 107: 32-37.
22. Lim, B.T., Deman, L., and Buzzell, R.I. 1990. Yield and Quality of Tofu as Affected by Soybean and Soymilk Characteristics Calcium Sulfate Coagulant. J. Food Sci. 55: 4: 1088–1092.
23. Moosavy, M., Esmaeili, S., and Mostafavi, E. 2013. Antibacterial effect of Mentha Spicata essential oil on *Listeria Monocytogenes* in traditional Lighvan cheese. J. Food. Safety. 33: 509-514.
24. Saenz, M.T, Fernandez, M.A. and Garcia M.D. Anti-inflammatory and analgesic properties from laves of Eryngium foetidum

mint (Mentha piperita) on Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 40 and 10°C. J Appl Bacteriol. 78: 593-600.

L. (Apiaceae). Int J Phytother Res. 1997; 11: 5: 380-383.

25. Sivropoulou, A.F., Kokkini, S., Lanaras, T., and Arsenakis, M. 1995. Antimicrobial activity of Mint essential oils. J Agric Food Chem. 43: 2384 -2388.
26. Tasci, F., Sahindokuyucu, F., and Ozturk, D. 2011. Detection of *Staphylococcus* species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province. Afr J Agr Res. 6: 937-942.
27. Tassou. C.C., Drosinos, E.H., and Nychas. G.J.E. 1995. Effects of essential oil from

Antibacterial effect of methanolic extract of *Eryngium Caeruleum* and *Mentha Spicata* on *Staphylococcus aureus* in a food model at 15˚C

Amini F [1], Moshtaghi H [2]*, Abbasvali M [2]

1. M.sc Graduated Student of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

*__Corresponding Author:__ *moshtaghi@vet.sku.ac.ir*

Received: 6 March 2016 Accepted: 23 September 2016

Abstract

In this interventional investigation, the effect of methanol extract of *Eryngium Caeruleum* and *Mentha Spicata* (5% and 10% v/w) on *Staphylococcus aureus* in soy cheese at 10^6 cfu/ml at 15˚C for a period of 15 days was studied. Methanol extract of *Eryngium caeruleum* and Mentha Spicata was prepared by soaking dried plants in 85% methanol. Soy cheese was made through coagulating of soy milk by calcium sulfate. Results were analyzed by one-way variance, ANOVA. In 15˚C, *Staphylococcus aureus* was faced with reduction in both concentrations (5% and 10% v/w) of methanol extract of *E. caeruleum* i.e. 1 and 2 log, and in both concentrations (5% and 10% v/w) of methanol extract of *M. Spicata* i.e. 2 and 4 log, respectively. The antibacterial effect of 10% extract of both of the plants on *Staphylococcus aureus* was more than 5% extract. Generally, results suggested that *Eryngium caeruleum* and *Mentha Spicata* have antibacterial effect, on *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Eryngium Caeruleum*, *Mentha Spicata*, *Staphylococcus aureus*, methanolic extract, soy cheese.