تأثیر اسانس نعناع فلفلی در مقایسه با عصاره‌های الکلی آن بر برخی میکروب‌های مشکل‌ساز مواد غذایی

سید محمد احمدی*[1]، سمیه نیک‌نیا[1]

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۰ اردیبهشت ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۵ خرداد ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۲۵ تیر ۱۴۰۰

چکیده

اطمینان از سلامت و کیفیت بالای مواد غذایی در طول مراحل تولید، انبارداری و مصرف از جمله دغدغه‌های اصلی تولیدکنندگان می‌باشد. با توجه به وجود نگرانی در خصوص بی‌خطر بودن ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی و خواص سلامتی بخش آنها در صنعت غذا می‌تواند سلامت مصرف‌کننده را تضمین کند. هدف از این پژوهش، ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه دارویی نعناع فلفلی بر میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زای مواد غذایی شامل *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *لیستریامنوسایتوژنز* و *اشرشیاکلی* بود. اسانس‌گیری از گیاه نعناع فلفلی به روش تقطیر با بخار آب با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد و عصاره‌های اتانولی و متانولی نیز به روش خیساندن تهیه شدند. فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها با استفاده از روش چاهک پلیت اندازه‌گیری شد و متعاقباً حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین گردید. نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت مهارکنندگی نشان داد که میزان فعالیت ضد میکروبی گیاه نعناع فلفلی به‌طور معنی‌داری به نوع عصاره و نوع میکروب بستگی دارد ($p<۰/۰۵$). به‌طوری که بر خلاف عصاره‌های الکی گیاه نعناع فلفلی که در کلیه غلظت‌های مورد استفاده بر باکتری *لیستریامنوسایتوژنز* بی‌اثر بودند (۰ میلی‌متر)، اسانس آن بر تمامی میکروب‌های مورد بررسی اثر بازدارندگی قوی نشان داد و با ایجاد هاله عدم رشد ۳۹/۳ میلی‌متر بیشترین تأثیر ضد میکروبی معنی‌دار را نیز بر همین میکروب داشت. در بین باکتری‌های مورد بررسی *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم‌ترین باکتری نسبت به اسانس و همچنین عصاره متانولی در این بررسی بود. نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس نعناع فلفلی دارای فعالیت ضد میکروبی قوی بر میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زای مواد غذایی می‌باشد. بنابراین می‌توان اسانس نعناع فلفلی را به عنوان یک ترکیب بسیار ارزشمند و نگهدارنده ضد میکروبی در مواد غذایی پیشنهاد کرد.

واژگان کلیدی: *اسانس، عصاره اتانولی، عصاره متانولی، فعالیت ضد میکروبی، نعناع فلفلی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: smahmadi@uoz.ac.ir

مقدمه

نگهداری غذا به‌صورت سالم و با کیفیت بالا در طول مراحل تولید، انبارداری و مصرف از جمله دغدغه‌های اصلی متخصصان صنایع غذایی و تغذیه می‌باشد چرا که وجود فلور میکروبی طبیعی در مواد غذایی مختلف و همچنین آلودگی‌های ثانویه در طی مراحل تولید می‌تواند سبب مسمومیت‌های غذایی شود (۱). به عنوان مثال اگر چه فرایندهای حرارتی، اغلب میکروب‌های بیماری‌زا را نابود می‌کند اما میکروب‌های ترموفیل متعلق به گونه‌های میکروکوکوس، باسیلوس، کلستریدیوم و گاهی اوقات باکتری‌های میله‌ای‌گرم منفی ممکن است در دمای پاستوریزاسیون زنده بمانند و سبب فساد محصول شوند (۲، ۳). گونه‌های سودوموناس که جزء سایکروتروف‌ها می‌باشند، آنزیم‌های لیپولیتیک و پروتئولیتیک خارج سلولی تولید می‌کنند که فعالیت باقی‌مانده این آنزیم‌ها می‌تواند کیفیت ارگانولپتیکی و عمر ماندگاری محصولات لبنی فرآوری شده را کاهش دهند (۲). همچنین یکی از میکروب‌هایی که ممکن است به واسطه آلودگی ثانویه وارد مواد غذایی شود، باکتری اشرشیاکلی است که یک میکروب انتروپاتوژن با منشأ غذایی می‌باشد و می‌تواند سبب اسهال و در شرایط حادتر منجر به مرگ شود (۳). در مورد بروز بیماری لیستریوزیس که یک نوع بیماری ناشی از مواد غذایی می‌باشد، گزارشات متعددی وجود دارد. از عوارض این بیماری می‌توان به منتژیت، انسفالیت و عفونت خونی اشاره نمود. این بیماری دارای نرخ مرگ و میر بالا (۲۰ تا ۳۰ درصد) است. در این نوع از بیماری، محصول ممکن است در مراحل بعد از فرایند حرارتی دچار آلودگی شود (۳، ۴).

به دلیل نگرانی در خصوص بی‌خطر بودن ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی، اخیراً تحقیقات در مورد استفاده از ترکیبات با منشأ گیاهی به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در غذاها مورد توجه قرار گرفته است (۵). در واقع می‌توان با استفاده از گیاهان دارویی و خواص سلامتی بخش آنها در صنعت غذا نه تنها سلامت مصرف‌کننده را تضمین کرد، بلکه با وجود ترکیبات معطر در ترکیبات ثانویه گیاه، باعث بهبود عطر و طعم غذا و رضایتمندی مصرف‌کننده شد (۱).

گیاه دارویی نعناع فلفلی برای سالیان طولانی در سرتاسر جهان برای اهداف دارویی و درمانی مختلفی مورد استفاده قرارگرفته و بیشتر برای معطرکردن محصولات لبنی تخمیری استفاده می‌شود (۶). اسانس نعناع فلفلی که حدود ۱ درصد گیاه را تشکیل می‌دهد، کاربردهای مختلفی مانند نگهدارنده غذاهای خام و فرآوری شده، داروسازی، درمان‌های طبیعی و داروهای جایگزین دارد. ترکیبات اسانس این گیاه به ویژه منتول* که ترکیب اصلی آن را تشکیل می‌دهد، دارای فعالیت ضد میکروبی بر طیف وسیعی از میکروب‌ها از جمله باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت است (۷، ۸، ۹). همچنین مطالعات نشان داده است که به‌طور کلی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاهان دارویی، فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به سایر عصاره‌ها دارند که این ممکن‌است به حضور ترکیبات فنولیک و پلی‌فنولیک در محلول مرتبط باشد (۱۰). با توجه به اینکه میکروب‌های مختلفی در فساد و بیماری‌زایی مواد غذایی نقش دارند، بنابراین کاربرد عصاره‌های گیاهان دارویی به عنوان افزودنی‌های ضد میکروبی علاوه بر میزان فعالیت ضد میکروبی آنها مستلزم تأثیر این عصاره‌ها بر تمامی میکروب‌هایی است که در فسادشان نقش دارند. میزان فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی به فاکتورهای مختلفی نظیر نوع گیاه، نوع عصاره و نوع میکروب بستگی دارد (۱۱).

*- Menthol

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان دارویی گشنیز و بولاغ اوتی نشان داد که اگر چه عصاره‌های مذکور در برخی غلظت‌ها هاله عدم رشد علیه باکتری‌های گرم مثبت (لیستریامنوسایتوژنز و استافیلوکوکوس‌اورئوس) ایجاد کردند اما هیچ کدام از گیاهان مذکور اثر مهارکنندگی بر باکتری‌های گرم منفی نداشتند (۱۲) و یا گزارش شده است که عصاره متانولی رزماری دارای اثر ضد میکروبی بر استافیلوکوکوس‌اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد در حالی که بر باسیلوس‌سرئوس بی‌تأثیر است (۱۳).

شرایط محیطی رشد نیز عامل مهم دیگری است که با تأثیر بر کمیت و کیفیت ترکیبات ضد میکروبی گیاهان دارویی بر فعالیت میکروبی آنها مؤثر است (۱۰، ۱۴). محبوبی و همکاران (۲۰۱۴) دلیل بررسی اثر ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی بر میکروب‌های مختلف را اختلاف در ترکیبات شیمیایی اسانس این گیاه در مناطق مختلف جهان بیان کردند (۱۵). لذا هدف از این تحقیق ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه دارویی نعناع فلفلی کشت شده در مزرعه گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل بر برخی میکروب‌های مشکل‌ساز در مواد غذایی می‌باشد که نتایج آن بهترین عصاره این گیاه را از نقطه نظر داشتن پتانسیل ضد میکروبی به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی معرفی خواهد نمود.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، باسیلوس سرئوس (ATCC 11778)، لیستریا منوسایتوژنز (ATCC 19115)، میکروکوکوس لوتئوس (CIPA 270)، و اشرشیاکلی (ATCC 10536) بودند که کشت خالص آنها از کلکسیون میکروبی مؤسسه پژوهش‌های علمی و صنعتی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری تهیه شد. گیاه نعناع فلفلی از مزرعه گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه گردید. برگ‌های گیاه نعناع فلفلی (Mentha piperita) ابتدا در سایه تحت خشک کردن اولیه قرار گرفتند و پس از آن در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کاملاً خشک و سپس پودر شدند.

استخراج اسانس: برای استخراج اسانس گیاه نعناع فلفلی، ابتدا ۴۰ گرم از برگ‌های خشک شده آن در آب خیسانده شد و به‌وسیله دستگاه کلونجر به مدت ۴ ساعت اسانس آن استخراج گردید. اسانس به‌دست آمده به‌وسیله سولفات سدیم انهیدرید رطوبت‌گیری و سپس فیلتر گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۶، ۱۷).

آماده‌سازی عصاره‌های اتانولی و متانولی: برای آماده‌سازی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه فوق، ۲۰ گرم از پودر برگ‌های خشک در ۲۰۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌های متانول و اتانول به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. مایع رویی پس از استخراج به‌وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر گردید و در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. برای استفاده‌های بعدی عصاره خشک شده در آب مقطر حل گردید (۱۸، ۱۹).

اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی: به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس، عصاره‌های متانولی و اتانولی نعناع فلفلی از روش چاهک پلیت* استفاده گردید. از تمامی باکتری‌ها در محیط نوترینت براث سوسپانسیون میکروبی تهیه و این سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه

* Agar-well diffusion

سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس سوسپانسیون فوق در محیط نوترینت آگار به صورت سطحی کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به‌وسیله لوپ استریل چند کلنی از باکتری‌های رشد یافته به ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل منتقل شدند، کدورت میکروبی لوله‌ها با اضافه‌کردن سرم فیزیولوژی با کدورت شاهد مک فارلند ۰/۵ (معادل $1/5\times10^8$ کلنی در میلی‌لیتر) استاندارد شد (۲۰، ۱۱، ۷، ۲۱).

بعد از تهیه مایه میکروبی، یک سوآپ استریل در لوله حاوی مایه میکروبی فرو برده و در سه جهت روی پلیت حاوی نوترینت آگار کشت شد. سپس به‌وسیله قسمت انتهایی یک پیپت پاستور استریل، چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌لیتر روی محیط کشت ایجاد گردید. محلولی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاهان مورد آزمایش تهیه شد. به منظور حل شدن بهتر عصاره‌ها در آب مقطر استریل از توئین ۸۰ به عنوان کمک حلال استفاده شد و محلول تهیه شده به‌وسیله فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون استریل گردید. برای اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها، ۰/۱ میلی‌لیتر از اسانس (۱۷) و همچنین محلول‌های الکی تهیه شده در چاهک‌ها ریخته و پلیت‌های تلقیح شده به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا عصاره‌های مذکور به خوبی جذب محیط شوند. نهایتاً پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، در نهایت فعالیت ضد میکروبی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد تعیین گردید. در این تحقیق همچنین کلرامفنیکل به‌عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل حاوی ۱۵ درصد توئین جهت اثبات عدم تأثیر ضد میکروبی آب و توئین ۸۰ به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (۲۱، ۸، ۷، ۲۲).

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC*)، غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ازعصاره‌های الکی و برای اسانس رقت‌های ۱:۱۰، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۲۰۰) در حلال دی متیل سولفوکسید† تهیه و فعالیت ضد میکروبی آنها به روش فوق بررسی شد. پائین‌ترین غلظتی که از رشد میکروب‌ها جلوگیری کرده بود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد (۲۱، ۲۲). کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

طرح آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها برای صفات اندازه‌گیری شده بر اساس طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. میانگین صفات کمی با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند. تجزیه آماری داده ها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید (۲۳).

نتایج و بحث

نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت مهارکنندگی (جدول ۱) نشان داد که میزان فعالیت ضد میکروبی گیاه نعناع فلفلی به‌طور معنی‌داری به نوع عصاره و نوع میکروب بستگی دارد ($p<0/05$). همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود اسانس نعناع فلفلی چه از نظر طیف گستردگی فعالیت ضد میکروبی و همچنین شدت فعالیت میکروبی با عصاره‌های متانولی و اتانولی آن تفاوت معنی‌داری داشت. به‌طوری که بر خلاف عصاره‌های الکی گیاه نعناع فلفلی که در کلیه غلظت‌های مورد استفاده بر باکتری لیستریامنوسایتوژنز بی اثر بودند (۰ میلی‌متر)، اسانس آن بر تمامی میکروب‌های مورد بررسی اثر بازدارندگی نشان داد. همچنین همان طور که در

* Minimum inhibitory concentration

† Dimethylsulfoxide (DMSO)

[3] Mint timija

شکل ۱ به خوبی قابل مشاهده است، اسانس از فعالیت ضد میکروبی بسیار قوی‌تری در مقایسه با عصاره‌های الکلی مذکور برخوردار بود به‌طوری که نه تنها بر باکتری لیستریا منوسایتوژنز اثر ضد میکروبی نشان داد بلکه با ایجاد هاله عدم رشد ۳۹/۳ میلی‌متر بیشترین تاثیر ضد میکروبی را نیز بر همین میکروب اعمال نمود. ابوحسین تبری و همکاران اثر ضعیف عصاره‌های نعناع را بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش کردند (۲۴).

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) و حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اسانس و عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه نعناع فلفلی بر برخی میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زای مواد غذایی

نوع عصاره	نوع میکروب									
	لیستریامونوسایتوژنز		*میکروکوکوس‌لوتئوس*		*باسیلوس‌سرئوس*		*اشرشیاکلی*		*سودوموناس‌آئروژینوزا*	
	DGI	MIC	DGI	MIC	DGI	MIC	DGI	MIC	DGI	MIC
اسانس	۳۹/۳ a	۱/۱۰۰	۲۷/۵ c	۱/۲۰۰	۲۹b	/۲۰۰ ۱	۳۳/۵b	۱/۲۰۰	۲۱d	۱/۱۰۰
اتانولی	۰c	†۰	۱۴a	۱۰۰	۹b	۵۰	۱۴/۵a	۵۰	۱۰b	۵۰
متانولی	۰d	†۰	۱۲/۵a	۵۰	۱۳/۵a	۵۰	۱۰b	۵۰	۸c	۱۰۰
کنترل‌مثبت	۵۰		۲۸/۵		۴۰		۳۳/۵		۱۷	
کنترل‌منفی Ψ	-		-		-		-		-	
کنترل منفی*	-		-		-		-		-	

*مقادیر برای هر عصاره گیاهی با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. † فاقد اثر مهارکنندگی

کنترل‌مثبت (کلرامفنیکل ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

Ψ کنترل‌منفی (آب مقطر حاوی ۱۵ درصد توئین برای عصاره‌های الکی)

* کنترل‌منفی (دی‌متیل سولفوکسید برای اسانس)

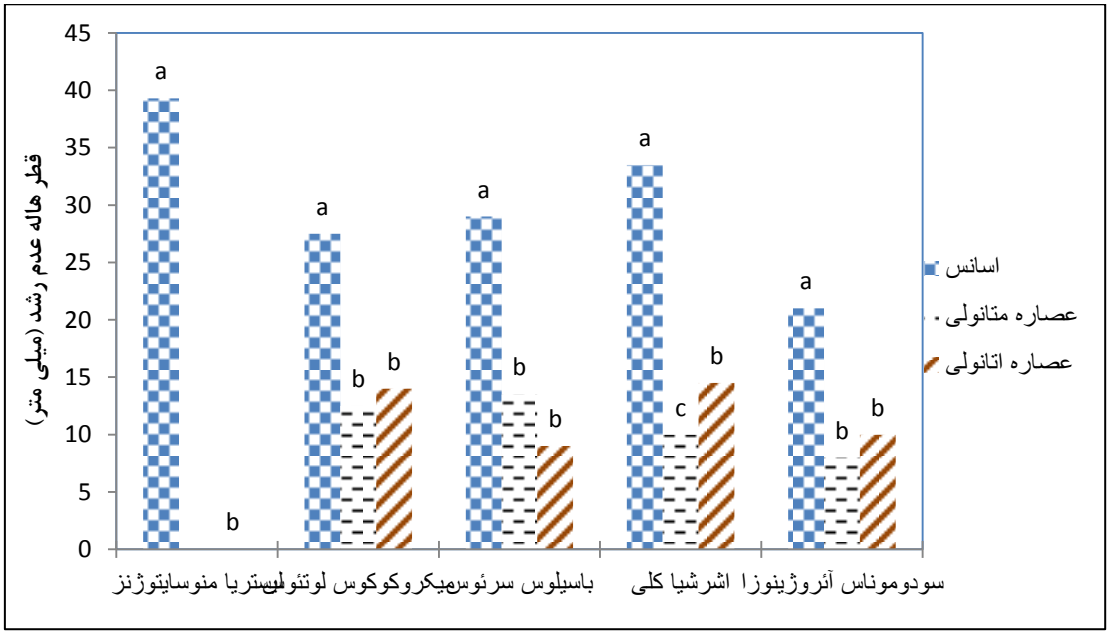
حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)، میانگین قطر هاله عدم رشد (DGI)

در مورد نحوه عمل اسانس‌ها در مرگ باکتری‌ها چنین اظهار شده که یکی از ویژگی‌های مهم این مواد و ترکیب‌های آن خاصیت آبگریزی است که سبب می‌شود در بخش‌های لیپیدی دیواره سلولی و میتوکندریایی باکتری توزیع شده و موجب تغییر و تخریب ساختمان و نفوذپذیری بیشتر آنها می‌گردد. سپس بخش زیادی از یون‌ها و دیگر محتویات حیاتی سلول به بیرون تراوش می‌نماید که در نهایت منجر به مرگ باکتری می‌شود (۲۵).

به‌طور کلی عصاره‌های گیاهان دارویی غالباً بر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی‌ها موثرترند (۲۶، ۴). در این تحقیق هم عصاره‌های الکی نعناع فلفلی به‌خصوص نوع متانولی تأثیر بهتری بر باکتری‌های گرم مثبت اعمال نمودند به‌طوری که باکتری باسیلوس سرئوس با قطر هاله عدم رشد ۱۳/۵ میلی‌متر حساس‌ترین میکروب به این عصاره بود. در مورد اسانس نعناع فلفلی نیز بیشترین فعالیت ضد میکروبی بر لیستریا منوسایتوژنز مشاهده شد (شکل ۱). همچنین در بین باکتری‌های مورد بررسی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم‌ترین باکتری نسبت به اسانس و همچنین عصاره متانولی مورد استفاده در این تحقیق بود.

دلیل مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی به عصاره‌های گیاهی می‌تواند به وجود غشای لیپوپلی‌ساکاریدی بیرونی بر دیواره سلولی آنها در مقایسه با ساختار تک لایه دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت نسبت داده شود که نفوذ ترکیبات آبگریز را به داخل سلول باکتریایی محدود می‌کند (۲۷).

اگرچه همان طور که می‌توان از شکل ۱ مشاهده نمود، مطلب فوق یک قاعده کلی نیست و نوع میکروب می‌تواند چه گرم مثبت و یا چه گرم منفی عکس‌العمل متفاوتی به عصاره‌های گیاهان دارویی داشته باشد. عدم وجود اثر ضد میکروبی عصاره‌های الکی نعناع فلفلی بر باکتری گرم مثبت لیستریا منوسایتوژنز و اثر بازدارندگی بیشتر اسانس بر باکتری اشرشیاکلی گرم منفی (با قطر هاله عدم رشد ۳۳/۵ میلی‌متر) در مقایسه با باکتری‌های باسیلوس سرئوس و میکروکوکوس لوتئوس با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۲۹ و ۲۷/۵ میلی‌متر این مطلب را تأئید می‌کند. چنین نتایجی قبلاً نیز گزارش شده است پرامیلا و همکاران در تحقیقشان پتانسیل ضد میکروبی عصاره متانولی برگ نعناع را بررسی نمودند، آنها مشاهده کردند که باکتری اشرشیاکلی حساس‌تر از باکتری استافیلوکوکوس می‌باشد (۲۸، ۲۹).



شکل ۱- فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های الکی گیاه دارویی نعناع فلفلی بر باکتری‌های مورد بررسی (عصاره‌ها با حروف مشابه برای هر میکروب اختلاف معنی‌داری با هم ندارند)

نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی که میزان حساسیت میکروب‌ها را به عصاره‌های گیاهی نشان می‌دهد، اثبات نمود که مقدار این شاخص بسته به نوع عصاره و میکروب می‌تواند متفاوت از نتایج آزمون قطر هاله عدم رشد باشد. حداقل غلظت بازدارندگی اسانس (جدول ۱) برای میکروکوکوس لوتئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی ۱/۲۰۰ (حجمی/حجمی) تعیین شد در حالی که برای لیستریا منوسایتوژنز و سودوموناس آئروژینوزا ۱/۱۰۰ (حجمی/حجمی) به دست آمد. بنابراین لیستریامنوسایتوژنز با دارا بودن بالاترین قطر هاله عدم رشد در میان باکتری‌های مورد بررسی از حداقل غلظت مهارکنندگی بالاتری در مقایسه با اشرشیاکلی و میکروکوس لوتئوس برخوردار بود. در مورد عصاره‌های الکی نعناع فلفلی (جدول ۱) مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های الکی نعناع فلفلی برای باکتری‌های مورد بررسی بین ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

نتایج این تحقیق و مطالعات قبلی اثبات می‌کند که اسانس نعناع فلفلی یک ترکیب ضد میکروبی مطمئن‌تر از عصاره‌های الکلی و آبی نعناع فلفلی بر ضد طیف گسترده‌ایی از میکروب‌ها می‌باشد. تأثیر اسانس نعناع فلفلی کشت شده در کشور اسلوواکی بر باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه[18]، استافیلوکوس اورئوس، انتروباکتر کولاسه[19]، گونه‌های سالمونلا، استرپتوکوکوس پئوژنز[20] حاکی از آن بوده که اسانس مذکور بر تمامی میکروب‌های مورد بررسی اثر کشندگی داشته است (۳۰) به طوری که بالاترین خاصیت ضد میکروبی بر باکتری‌های اشرشیاکلی، استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوس اورئوس و کمترین میزان بر کلبسیلا پنومونیه تعیین شده است (۳۰).

محبوبی و همکاران (۲۰۱۴) اثر ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی را بر طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی همچنین کپک و مخمر بررسی کردند (۱۵). آنها دریافتند که اسانس مورد بررسی بر تمامی میکروب‌های مورد بررسی نظیر سودوموناس آئروژینوزا، انتروکوکوس فیسیوم[21]، استرپتوکوکوس موتان[22]، کلبسیلا پنومونیه و باسیلوس سرئوس و همچنین مخمرها مخصوصاً کاندیدا البیکانس[23] اثر ضد میکروبی قوی دارد. آنها دلیل وجود این طیف گسترده اثر ضد میکروبی اسانس را به وجود ترکیبات منتول و منتون[24] به عنوان ترکیبات اصلی اسانس نسبت دادند. آنها باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی را حساس‌ترین و سودوموناس را مقاوم‌ترین میکروب‌ها به اسانس گزارش کردند. این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مشابهت داشت. تأثیرپذیری میکروب‌ها به اسانس نعناع فلفلی به میزان ترکیبات خاص در آن و سینرژیسم بین این ترکیبات حتی ترکیباتی که مقدارشان در حداقل است، بستگی دارد (۳۱).

بوپش و همکاران عصاره‌های الکی و آبی نعناع فلفلی را بر باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و سراتیا مارسنس[25] بررسی کردند (۳۲). اگر چه در تحقیق آنها همه عصاره‌ها دارای اثر ضد میکروبی ضعیفی بودند و در بین آنها عصاره‌های اتیل استات و آب از بالاترین تأثیرگذاری برخوردار بودند اما عکس‌العمل هر میکروب به عصاره‌ها متفاوت بود و

[18] - Klebsiella pneumoniae

[19] - Enterobacter cloacae

[20] - Streptococcus pyogenes

[21] Enterococcus faecium

[22] - Streptococcus mutans

[23] - Candida albicans

[24] - Mentone

[25] - *Serratia marcesens*

میکروب‌ها نسبت به برخی عصاره‌ها مقاومت نشان دادند. در بررسی اثر ضد میکروبی نعناع فلفلی شهرستان کنگاور استان کرمانشاه بر قارچ‌های بیماری‌زا، عصاره آبی موثرترین عصاره گزارش شده است در حالی که عصاره‌های متانولی و استونی از تأثیرگذاری کمی برخوردار بودند و حتی بر برخی قارچ‌ها بی اثر بودند (۳۳). در مطالعه‌ای که توسط معصومیان و زندی (۲۰۱۷) انجام شد عصاره هیدروالکی نعناع بر اشرشیاکلی و سودوموناس‌آئروژینوزا بی‌تأثیر بود در حالی که عصاره آبی آن بر اشرشیاکلی و سودوموناس‌آئروژینوزا به ترتیب هاله عدم رشد ۱۷و ۱۵ میلی‌متری ایجاد نمود (۳۴).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس نعناع فلفلی دارای فعالیت ضد میکروبی قوی بر کلیه باکتری‌های مورد بررسی چه گرم مثبت و چه گرم منفی مشکل‌زا در مواد غذایی از حیث ایجاد فساد و بیماری‌زایی می‌باشد. در صورتی که که عصاره‌های متانولی و اتانولی آن از فعالیت ضد میکروبی ضعیفی برخوردار می‌باشند. دلیل این اختلاف فاحش در فعالیت ضد میکروبی می‌تواند به وجود ترکیبات مختلف موجود در اسانس و عصاره‌ها نسبت داده شود. به‌طوری که اسانس نعناع فلفلی از منوترپن‌ها که عمدتاً منتول و منتون هستند، تشکیل شده است که دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی هستند در حالی که عصاره‌های الکی و آبی این گیاه از ترکیباتی نظیر آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها، استروئیدها و تانن‌ها تشکیل شده‌اند (۹) و تفاوت در میزان فعالیت ضد میکروبی این عصاره‌ها هم با اختلاف میزان این ترکیبات مرتبط می‌باشد (۹). بنابراین نتایج این بررسی اسانس نعناع فلفلی را به‌عنوان یک نگهدارنده مناسب در مواد غذایی مخصوصاً مواد غذایی لبنی پیشنهاد می‌کند.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت مالی تحت پژوهانه به شماره UOZ-GR-8232 توسط دانشگاه زابل اجرا شده است. از دانشگاه زابل بابت حمایت مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

References

1- Gharenaghadeh S, Forghani S, Gharehnaghadeh S, Sowti M. Evaluation of Antimicrobial Properties of Methanolic Extract, Essential Oil and Nanolipozom of Mentha piperita. *J food science and technology*. 2017; 68(14): 93-102 [In Persian].

2- Torkar KG, Teger SG. The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta agriculturae Slovenica*. 2008; 92(1): 61-74.

3- Valik L, Goerner F, Laukova D. Growth dynamics of Bacillus cereus and shelf-life of pasteurised milk. *Czech J Food Sciences*. 2003; 21(6): 195-202.

4- Lunden J, Tolvanen R, Korkeala H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J Dairy Science*. 2004; 87: E6-E12.

5- Owen RJ, Palombo EA. Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, Eremophila alternifolia and Eremophila duttonii, in food homogenates and milk. *J Food Control*. 2007; 18(5): 387-390.

6- Bayoub K, Baibai T, Mountassif D, Retmane A, Soukri A. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against Listeria monocytogenes and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9(27): 4251-4258.

7- Ehsan B, Vital A, Bipinraj N. Antimicrobial activity of the ethanolic extract of Bryonopsis laciniosa leaf, stem, fruit and seed. *African Journal of Biotechnology*. 2009; 8(15): 3565-3567.

8- Erturk O. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice

plants. *J Biologia*. 2006; 61(3): 275-278.

9- Sujana P, Sridhar TM, Josthna P, Naidu CV. Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of Mentha piperita L. (Peppermint)- An Important Multipurpose Medicinal Plant. *American Journal of Plant Sciences*. 2013; 4: 77-83.

10- Ashrafpour M, Rezaei h, sefidgar a, Baradaran M, Sharifi H. Survey of the Antibacterial Properties of Aqueous Ethanolic and Methanolic Extraction of Artemisia Annua Around the City of Babol. *j ilam university of medical sciences*. 2016; 23(6): 129-141 .

11- Mahesh B, Satish S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2008; 4: 839-843.

12- Farshbaf Derhami S, Ghiami Rad M, Mahmoudi R, Asadi Nadari MR. Comparative studies of antibacterial activity of extracts nasturtium officinale and coriandrum sativum against some of pathogenic bacteria. *Journal of Veterinary Microbiology*. 2017; 13(2): 47-55 [In Persian].

13- Golshani Z, Dawoodi V. In vitro study of antimicrobial effects of Rosmarinus officinalis leaf extract against some pathogens. *Arak Medical University Journal*. 2013; 16(77): 82-89 [In Persian].

14- Agaoglu S, Dostbil N, Alemdar S. Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. *J Bull Vet Inst Pulawy*. 2007; 51: 53-57.

15- Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of peppermint (Mentha piperita L.) Essential oil. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2014; 36(1): 83-87.

16- Duarte MCT, Leme Delarmelina C, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec Escherichia coli. *J Ethnopharmacol*. 2007; 111(2):197-201.

17- Badar N, Arshad M, Farooq U. Characteristics of Anethum graveolens (umbelliferae) seed oil: extraction, composition andantimicrobial activity. Int. *J. Agri. Biol*. 2008; 10: 329–32.

18- Lawrence R, Tripathi P, Jeyakumar E. Isolation, purification and evaluation of antibacterial agents from Aloe vera. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009; 40(4): 906-915.

19- Olaleye M, Bello-Michael C. Comparative antimicrobial activities of Aloe vera gel and leaf. *African Journal of Biotechnology*. 2005; 4(12): 1413-1414.

20- Alemdar S, Agaoglu S. Investigation of in vitro antimicrobial activity of aloe vera juice. *Journal of animal and veterinary advances*. 2009; 8(1): 99-102.

21- Dildar, A., Muhammad, M., Abdul, H., Muhammad, B., Nazia, B. Antibacterial activity of Ballota limbata against potential multidrug resistant human pathogens (running head: antibacterial activity of B. limbata against potential Mdr pathogens). *Journal of Applied Sciences Research*. 2009; 5(10): 1611-1614.

22- Komeilizadeh H, Hakemi vala M, Kamalinejad M, Neshat ashofteh S. Study of Antimicrobial Effects of Organic and Aqueous Extracts of Grains of Triticum sativum Lam. on Gram–positive and Gram-negative Bacteria. *J Medicinal Plants*. 2008; 7(28): 105-111 [In Persian].

23- Khusniati T, Yantyati W. Antibacterial Effects of Aromatic Materials Produced in Indonesia on the Preservation of Skimmed and Whole Milk in Storage. *International Food Research Journal*. 2008; 15(2): 109-118.

24- Takon IA, Ekei Victor I, Ochegbe O. Comparative study of the antimicrobial properties of Aloe Vera juice and gel (leaf) extracts against selected clinical isolates. *International Journal of Technical Research and Applications*. 2015; 3(6): 108-111.

25- Saharkhiz M, Sattari M, Goodarzi Gh, Omidbaigi R. Assessment of antibacterial properties of Tanacetum parthenium L. essential oil. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2008; 24(1): 47-55 [In Persian].

26- Wei LS, Musa N, Sengm CT, Wee W, Shazili NAM. Antimicrobial properties of tropical plants against 12 pathogenic bacteria isolated from aquatic organisms. *African Journal of Biotechnology*. 2008; 7(13): 2275-2278.

27- Ghalem BR, Mohamed B. Essential oil from gum of Pistacia atlantica Desf.: Screening of antimicrobial activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009; 3(3): 087-091.

28- Nandagopal S, Ranjitha Kumari BD. Phytochemical and Antibacterial Studies of Chicory (Cichorium intybus L.)-A Multipurpose Medicinal Plant. *Advances in Biological Research*. 2007; 1 (1-2): 17-21.

29- Pramila DM, Xavier R, Marimuthu K,

Kathiresan S, Khoo ML, Senthilkumar M, *et al.* Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (Mentha piperita: Lamiaceae). *J Medicinal Plants Research*. 2012; 6(2): 331-335.

30- Pluchtovaa M, Gervasib T, Benameurc Q, Pellizzerib V, Grulovaa D, Camponed L, *et al.* Antimicrobial Activity of two Mentha Species Essential Oil and its Dependence on Different Origin and Chemical Diversity. *J Natural Product Communications*. 2018; 13(8): 1051-1054.

31- Muntean D, Licker M, Alexa E, Popescu I, Jianu C, Buda V, *et al.* Evaluation of essential oil obtained from Mentha piperita L. against multidrug-resistant Strains. *J Infection and Drug Resistance*. 2019; 12: 2905-2914.

32- Bupesh G, Amutha C, Nandagopal S, Ganeshkumar A, Sureshkumar P, Saravana Murali K. Antibacterial activity of Mentha piperita L. (peppermint) from leaf extracts–a medicinal plant. *J Acta agriculturae Slovenica*. 2007; 89 (1): 73-79.

33- Abdolmaleki M, Bahraminejad S, Salari M, Abbasi S, Panjeke N. Antifungal Activity of Peppermint (Mentha piperita L.) on Phytopathogenic Fungi. *J. Med. Plants*. 2011; 10(38) :26-34 [In Persian].

34- Masoumian M, Zandi M. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plant Extracts against Multidrug Resistant Bacteria. *Zahedan J Res Med Sci*. 2017; 1 (11): e10080.

The effect of Mentha piperita L. essential oil in comparison with its alcoholic extracts against some food problematic microorganisms

Seyed Mohammad Ahmadi[1]*, Somayeh Niknia[1]

1- Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Zabol University, Zabol, Iran.

Receive: April 30, 2021; Revise: June 5, 2021; Accept: July 16, 2021

Summary

One of the main challenges for food producers is to ensure the health and high quality of food during the production, storage and consumption stages. Due to the concern about the safety of chemical antimicrobial compounds, the use of medicinal plants and their health properties in the food industry can ensure the health of consumers. So, the objective of this study was to evaluate antimicrobial activity of essential oil, ethanolic and methanolic extracts of Mentha piperita L cultivated in medicinal plants farm of agricultural research institute of the University of Zabol, against spoilage and pathogenic microorganisms in food products including *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. The essential oil was obtained by water-distillation using a Clevenger-type system and ethanolic and methanolic extracts were obtained by wet method. Antimicrobial activity of the extracts was measured by agar well diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) was subsequently determined. The results of diameter of inhibition zone and MIC values indicate that antibacterial activity of the extracts of Mentha piperita L was related to the type of extract and the type of microorganism. Unlike methanolic and ethanolic extracts of Mentha piperita L, which were ineffective in all concentrations against *Listeria monocytogenes* (0 mm), its essential oil had a strong inhibitory effect on all studied bacteria and with diameter of inhibition zone of 39.3 mm showed the highest significant antimicrobial activity on the same microorganism. In this study, Pseudomonas aeruginosa was the most resistant bacteria to the essential oil and methanolic extracts. The findings of this study indicated that *Mentha piperita L* essential oil has a strong antimicrobial activity on the spoilage and pathogenic microorganisms associated with food. Therefore, the mentioned compound can be suggested as a very valuable antimicrobial preservative in food.

Key words: *Essential oil, Ethanolic extract, methanolic extract, Antibacterial activity, Mentha piperita L.*