

اثر عصاره متانولی نعناع و چوچاق بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سویا در دمای

۱۵ درجه 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 دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۲

چکیده

در این بررسی که از نوع مطالعات مداخله ای بود، اثر عصاره متانولی چوچاق (*Eryngium Caeruleum*) و نعناع (*Mentha Spicata*) در غلظت‌های ۵٪ و ۱۰٪ بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سویا (توفو) که به هر گرم آن ۱۰^۶ سلول باکتری اضافه شده بود، در دمای ۱۵ درجه 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 شیر سویا 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 هر دو غلظت به کار برده شده (۵ و ۱۰ درصد) از عصاره متانولی چوچاق، کاهش ۱ و ۲ لگاریتمی و در هر دو غلظت به کار برده شده (۵ و ۱۰ 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 بیشتر از گیاه چوچاق بود.

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

مقدمه

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 میکروارگانیسم‌ها 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

استافیلوکوکوس اورئوس یک کوکسی گرم مثبت و فاقد تحرک با قطر تقریبی ۰/۸ تا ۱ میکرون می‌باشد که تجمعات نامنظم از سلول‌ها شبیه به خوشه انگور را به وجود می‌آورد. 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 می‌شود. (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

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

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 می‌باشد. این محصول به علت نسبت بالای پروتئین به چربی دارای کالری نسبتاً 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 مواد 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 پنیر سویا مورد بررسی آزمایشگاهی قرار 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 (۲/۰ میکرون) دو بار فیلتر شد. 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

ریشه هوایی و ساقه‌های مستقیم و چهارگوش، و برگ‌های 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 برگ‌های نعناع کم است (زرگری، ۱۳۹۱; نظری، ۱۳۷۵). به خوبی اثبات شده است که اسانس یا عصاره از برخی از گونه‌های 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 - عروقی و سرطان پیشنهاد می‌کنند (زارع بیدکی و همکاران، ۱۳۹۳). گیاه چوچاق با نام علمی *Eryngium caeruleum* از گونه‌های متعلق به تیره چتریان می‌باشد که به صورت نسبتاً 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. گونه‌هایی از این جنس دارای اثر مدر، اشتها آور، ملین، قاعده آور، معالج نفخ، خلط آور، ضدالتهاب، درمان کننده ناراحتی‌های پوستی و بیماری‌های کبدی موثر در رفع اختلالات کلیوی و اندام‌های جنسی می‌باشند (مرتضی سمنانی و همکاران، ۱۳۸۲). ترکیبات عمده موجود در گیاه چوچاق شامل لیمونن ۵۲/۱٪، بتا-سزکوئی فلاندرن ۸/۱٪، آلفا-پینن ۵/۵٪، دلتا-۲-کارن ۵/۳٪ می‌باشد (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 بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شوند و نشانه‌های یائسگی نظیر گرگرفتگی و تحلیل استخوان را کاهش می‌دهند (Dwyer et al., 1994).

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 ۰.۵٪ و ۱.۰٪ بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد در جدول ۱ و نمودارهای های ۱۰۲ و ۳ 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 روز ۹ به میزان ۲ لگاریتم کاهش یافت. سپس از روز ۹ تا روز ۱۲ دوباره ۱ لگاریتم افزایش یافت و مجدداً 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 تقریباً ثابت ماند و سپس از روز ۳ تا روز ۶ نتوانستیم باکتری جدا کنیم. در نمونه کنترل ۳ (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 تقریباً ثابت باقی ماند. آنالیز داده‌ها نشان داد که بین نمونه مورد بررسی و کنترل ۳ (پنیر و *استافیلوکوکوس اورئوس*) از لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود نداشت ($P > 0.05$) ولی بین دو گروه کنترل ۱ و ۳ از لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود داشت. ($P < 0.05$) (نمودار ۱). در نمونه‌ی تیمار شده با عصاره ۱۰ درصد چوچاق تعداد باکتری از روز صفر تا روز ۳ ثابت باقی ماند و بعد از آن تا روز ۶ به میزان ۱ لگاریتم کاهش یافت و تا روز ۹ تقریباً 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 ۱۰ درصد چوچاق + *استافیلوکوکوس اورئوس*) تعداد باکتری از روز صفر تا روز ۳ تقریباً ثابت با کاهش کمی همراه بود و پس از آن تا روز ۶ باکتری جدا نگردید. آنالیز داده‌ها مشخص کرد که بین نمونه

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 هموزن 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 واکنس و سرم 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 10^6 CFU/g عدد برسد. عصاره متانولی نعناع و چوچاق پس از رقیق شدن با آب مقطر استریل، در دو غلظت ۰.۵٪ و ۱.۰٪ به نمونه‌های مورد مطالعه اضافه گردید. همچنین جهت جلوگیری از رشد کپک به نمونه‌های تیمار شده و همچنین به گروه‌های کنترل میزان ۰.۶٪ نمک افزوده شد. برای هر گروه از غلظت‌ها ۲ کنترل در نظر گرفته شد. یک گروه از کنترل‌ها شامل پنیر سویا 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 در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و شمارش باکتری‌ها در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و روی محیط کشت پلیت کانت آگار (Plate Count Agar) ساخت شرکت QUELAB انجام گرفت. برای هر گروه سه تکرار در نظر گرفته شد. میانگین نتایج حاصل از ۳ تکرار هر گروه با استفاده از نرم افزار Sigma stat 2.1 و روش آنالیز واریانس یک

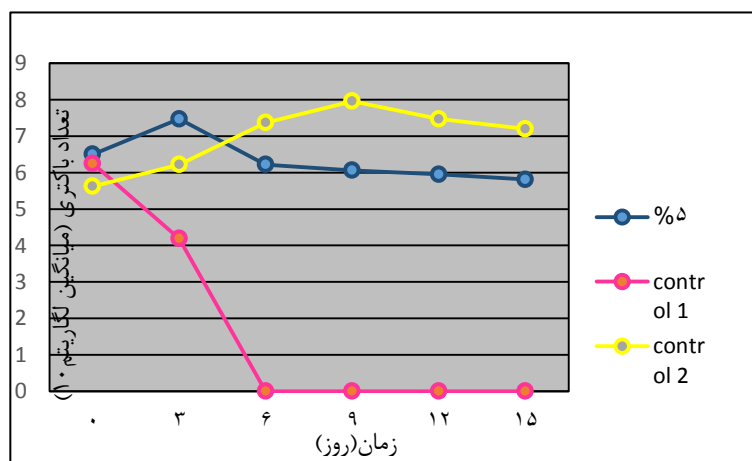
های تمار شده با عصاره ۵ و ۱۰ درصد چوچاق از لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود داشت ($P < 0.05$).

تیمارشده با عصاره ۱۰ درصد و گروه کنترل ۳ از لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود داشت ($P < 0.05$). همچنین بین دو گروه شاهد ۲ و ۳ نیز تفاوت معنی داری وجود داشت ($P < 0.05$) (نمودار ۲). بین نمونه

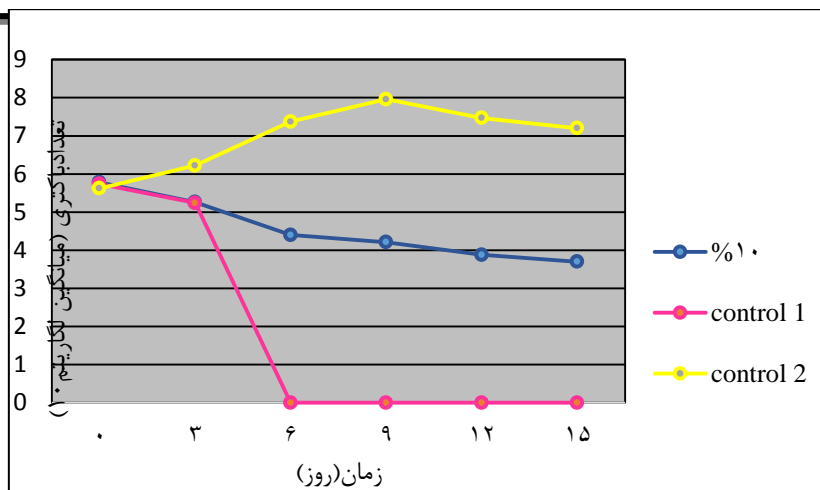
جدول ۱- اثر غلظت های ۵ و ۱۰٪ عصاره ی چوچاق بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد (تعداد باکتری بر حسب CFU/g و زمان بر حسب روز)

نمونه	پنیر+عصاره چوچاق ۵٪ +استافیلوکوکوس اورئوس	کنترل ۱	پنیر+عصاره چوچاق ۱۰٪ +استافیلوکوکوس اورئوس	کنترل ۲	کنترل ۳
روز	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA
۰	$3/143 \times 10^6$	$1/78 \times 10^5$	6×10^5	$5/51 \times 10^5$	$4/20 \times 10^5$
۳	$2/92 \times 10^7$	$1/55 \times 10^5$	$1/82 \times 10^5$	$1/75 \times 10^5$	$1/67 \times 10^6$
۶	$1/65 \times 10^6$.	$2/53 \times 10^4$.	$2/36 \times 10^7$
۹	$8/84 \times 10^5$.	$1/62 \times 10^4$.	$9/20 \times 10^7$
۱۲	$1/15 \times 10^6$.	$7/73 \times 10^3$.	$1/60 \times 10^7$
۱۵	$6/40 \times 10^5$.	$4/93 \times 10^3$.	3×10^7

کنترل ۱: آب+عصاره چوچاق ۵٪+استافیلوکوکوس اورئوس، کنترل ۲: آب+عصاره چوچاق ۱۰٪+استافیلوکوکوس اورئوس، کنترل ۳: پنیر+استافیلوکوکوس اورئوس



نمودار ۱- اثر غلظت ۵٪ عصاره متانولی چوچاق بر استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سویا در ۱۵ درجه سانتیگراد کنترل ۱: آب + عصاره چوچاق ۵٪+استافیلوکوکوس اورئوس کنترل ۲: پنیر+استافیلوکوکوس اورئوس



نمودار ۲- اثر غلظت ۱۰٪ عصاره متانولی چوچاق بر استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سویا در ۱۵ درجه سانتیگراد
کنترل ۱: آب + عصاره چوچاق ۱۰٪ + استافیلوکوکوس اورئوس، کنترل ۲: پنیر + استافیلوکوکوس اورئوس

جدول ۲- اثر غلظت های ۵ و ۱۰٪ عصاره ی نعنای بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد (تعداد باکتری بر حسب CFU/g و زمان بر حسب روز)

نمونه	پنیر + عصاره نعنای ۵٪ + استافیلوکوکوس اورئوس	کنترل ۱	پنیر + عصاره نعنای ۱۰٪ + استافیلوکوکوس اورئوس	کنترل ۲	کنترل ۳
روز	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA
۰	$1/57 \times 10^6$	$4/03 \times 10^6$	$3/07 \times 10^6$	$1/011 \times 10^6$	$3/36 \times 10^5$
۳	$7/06 \times 10^5$.	$2/83 \times 10^5$	$4/0 \times 10^3$	$9/58 \times 10^6$
۶	$1/09 \times 10^6$.	$2/80 \times 10^4$.	$3/35 \times 10^7$
۹	$2/003 \times 10^5$.	$2/23 \times 10^3$.	$8/25 \times 10^7$
۱۲	$3/57 \times 10^4$.	$1/23 \times 10^2$.	$2/85 \times 10^7$
۱۵	$2/61 \times 10^4$.	$4/70 \times 10^2$.	$6/35 \times 10^7$

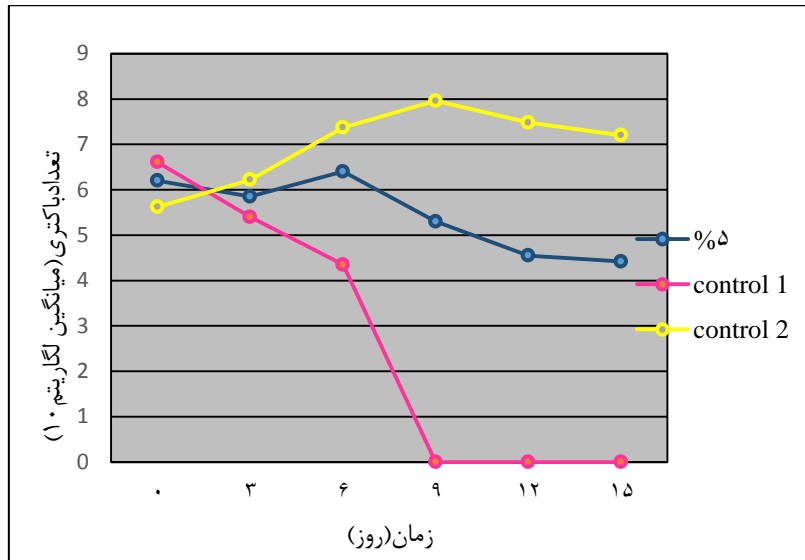
کنترل ۱: آب نمک + عصاره نعنای ۵٪ + استافیلوکوکوس اورئوس. کنترل ۲: آب نمک + عصاره نعنای ۱۰٪ + استافیلوکوکوس اورئوس. کنترل ۳: پنیر + استافیلوکوکوس اورئوس

تیمار شده با غلظت ۱۰ درصد نعنای تعداد باکتری از روز صفر تا روز ۱۵ بصورت متوالی ۴ لگاریتم کاهش یافت. در گروه کنترل ۲ (آب نمک + عصاره ۱۰ درصد نعنای + استافیلوکوکوس اورئوس) تعداد باکتری از روز صفر تا ۳ به میزان ۳ لگاریتم کاهش یافت و بعد از آن نتوانستیم باکتری جدا کنیم. در گروه کنترل ۳ (پنیر + استافیلوکوکوس اورئوس) تعداد باکتری از روز صفر تا ۶ به میزان ۲ لگاریتم افزایش یافت و پس از آن تا روز ۱۵ تقریباً ثابت ماند. آنالیز صورت گرفته نشان داد که بین گروه تیمار شده و کنترل ۳ از لحاظ آماری تفاوت معنی

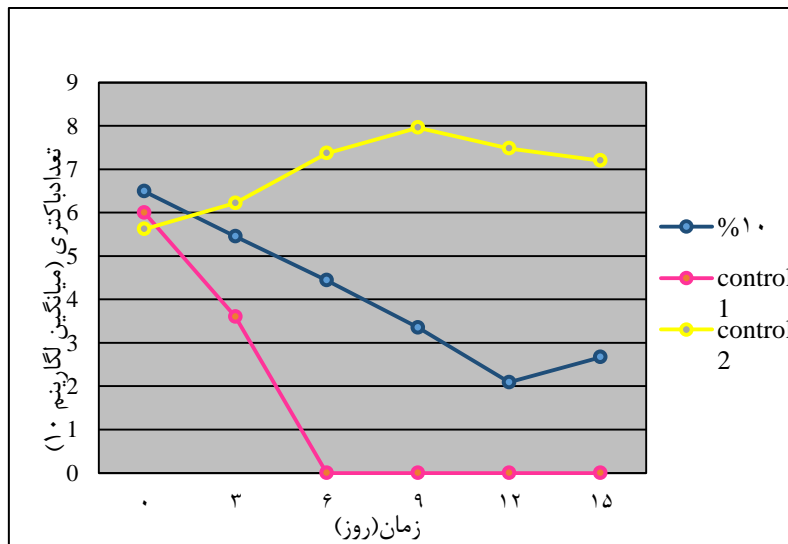
اثر ضد باکتریایی غلظت ۵ و ۱۰٪ عصاره نعنای بر استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سویا در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد: همانطور که جدول زیر نشان می دهد عصاره ۵ درصد نعنای از روز صفر تا روز ۳ باعث کاهش ۱ لگاریتم در تعداد باکتری شد و سپس از روز ۳ تا ۶ تعداد باکتری ۱ لگاریتم افزایش یافت. سپس از روز ۶ تا ۱۲ تعداد باکتری ۲ لگاریتم کاهش یافت و از روز ۱۲ تا ۱۵ تقریباً ثابت باقی ماند. در گروه کنترل ۱ (آب نمک + عصاره ۵ درصد نعنای + استافیلوکوکوس اورئوس) از روز صفر تا ۳ نتوانستیم باکتری جدا کنیم. در گروه

همچنین بین هر دو گروه کنترل نیز تفاوت معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$). (نمودار ۵). مقایسه بین دو گروه تیمار شده با یکدیگر (غلظت ۵ و ۱۰ درصد) از لحاظ آماری تفاوت معنی داری نشان نداد ($p > 0.05$).

داری وجود داشت ($p < 0.05$). همچنین بین دو گروه کنترل ۱ و ۳ نیز تفاوت معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$) (نمودار ۴). همچنین آنالیز انجام گرفته بین گروه تیمار شده با عصاره ۱۰ درصد نعناع و کنترل ۲ از لحاظ آماری تفاوت معنی داری را نشان داد ($p < 0.05$).



نمودار ۴- اثر غلظت ۵٪ عصاره متانولی نعناع بر استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سویا در ۱۵ درجه سانتیگراد. کنترل ۱: آب نمک + عصاره نعناع ۵٪ + استافیلوکوکوس اورئوس. کنترل ۲: پنیر + استافیلوکوکوس اورئوس



نمودار ۵- اثر غلظت ۱۰٪ عصاره متانولی نعناع بر استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سویا در ۱۵ درجه سانتیگراد. کنترل ۱: آب نمک + عصاره نعناع ۱۰٪ + استافیلوکوکوس اورئوس. کنترل ۲: پنیر + استافیلوکوکوس اورئوس

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 و ۰/۰۷۵ 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 عدد لگاریتمی می‌باشد (طباطبائی یزدی و همکاران، ۱۳۹۴). Tassou. همکاران (۱۹۹۵) مطالعه ای روی اثر نعناع بر باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوزنز* و *سالمونلا انتریتیدیس* در دو دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتیگراد انجام دادند. طبق این مطالعه *سالمونلا* در ماده غذایی مورد نظر (tzatziki) در غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۱۵٪ و ۰/۲٪ (v/w) از عصاره نعناع به میزان ۳۰۴،۶ d از بین رفت. *لیستریا مونوسیتوزنز* در تمام طول مدت آزمایش زنده باقی ماندند و کاهش خیلی کمی مشاهده شد (Tassou et al., 1995). در مطالعه ای که در سال

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 ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی به دلیل وجود ترکیبات فنولیک یا دیگر ترکیبات هیدروفیلک 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 ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع که در محیط برات و مدل سیستم‌های غذایی توسط (Sivropoulou Tassou et al., 1995; et al., 1995) بررسی شد و نشان داده شد که این خاصیت بعلت وجود منتول (menthol) و کتون‌ها نظیر پولگون (pulegone)، ایزومنتون (isomenthone)، پپیریتون (piperitone)، کاروون (carvone) و دئیدروکاروون (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 ضد میکروبی 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.

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 همچنین سایر گونه‌های مختلف ارینجیوم شامل آنالیز ترکیبات موجود در اسانس این گیاهان می‌باشد. مرتضی سمنانی و همکاران (۱۳۸۲) طی مطالعه‌ای 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 مطالعه‌ای به بررسی اثر ضد-باکتریایی اسانس چند گونه از گیاهان بومی کشور علیه باکتری *استریتوکوکوس اینیایی* پرداختند. این مطالعه روی اسانس گیاهان آویشن شیرازی، زیره سیاه، اناریجه، سیر وزولنگ انجام شد. زولنگ (*Eryngium campestre*) یک گونه از خانواده *Eryngium* می‌باشد. نتایج اندازه‌گیری قطر هاله مهارى نشان داد که قطر هاله مهارى استریتومايسين $16/9 \pm 0/4$ میلی‌متر و اسانس زولنگ، $18/5 \pm 0/7$ میلی‌متر تعیین شد. در واقع اندازه هاله ی عدم رشد این باکتری تحت تاثیر اسانس زولنگ در سطح نزدیک به استریتومايسين بود و اختلاف معناداری بین آنها مشاهده نشد ($p > 0.05$). در مطالعه حاضر مقادیر MIC اسانس زولنگ برای *استریتوکوکوس اینیایی* $0/5$ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (صفری و همکاران، ۱۳۹۴). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ انجام شد به بررسی و آنالیز ترکیبات دو گونه از جنس *Eryngium* پرداختند. این دو گونه شامل *E. palmatum* و *E. serbicum* بودند. ترکیبات اصلی *E. serbicum* شامل (۱۹/۷٪) *germacrene D*

۱۹۹۵ روی اسانس روغنی نعناع گرفت، از دو گونه نعناع (*M. Spicata*) و (*M. Pulegium*) استفاده شد. این بررسی روی هشت گونه از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انجام گرفت. اسانس این دو گونه از نعناع در بالاترین غلظت (۰/۰۱) اثر باکتری‌کشی بیشتری نشان داد و غلظت‌های پایین‌تر (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 ضد میکروبی نعناع بر باکتری *لیستریا مونوسیتوزنز* در پنیس ليقوان 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 آيروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسینیری* و دو گونه *سالمونلا* بود. بر اساس نتایج به دست آمده، میانگین MIC اسانس نعناع در بین باکتری‌های 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

می‌توان نتیجه گرفت که عصاره الکلی چوچاق دارای اثر ضد باکتریایی روی باکتری مورد آزمایش بود که این اثر در غلظت ۱۰ درصد 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 می‌کنند، قابل مصرف است. در آنالیز ترکیبات گیاه چوچاق که توسط مرتضی سمناوی 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 ضد میکروبی این گیاه به دلیل وجود این ترکیبات بخصوص سزکوئی ترپنوئیدها 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 در این باره و در جهت تایید و یا رد نتایج حاصل توسط ما انجام گیرد.

- گوارش. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، دوره ۲۱، شماره ۳، 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 آذربایجان، دوره ۱۴، شماره ۴، ۱۳۹۴؛ ۴۰-۳۳.
۶. صمصام شریعت، هادی. (۱۳۸۵). گیاهان دارویی. چاپ اول، انتشارات چهارباغ، صفحه ۴۶.

، β -elemene (۰/۱۰) و spathulenol (۰/۶۱۹) می‌باشند. ترکیبات اصلی *E. palmatum* شامل (۰/۲۱۳) sesquicineole (۰/۱۶) ، spathulenol (۰/۱۶) ، caryophyllene oxide (۰/۵/۵) و sabinene بود. (Capetanos et al., 2007).

کاپلی و همکاران (۲۰۰۰) پژوهشی انجام دادند که فعالیت ضد التهابی و ضد دردی گونه‌های *Eryngium* را نشان داد. عصاره به دست آمده از هر دو قسمت‌های هوایی و یا ریشه‌های هشت گونه در حال رشد *Eryngium* در ترکیه (*E. Eryngium Campestre* ، *E. E. Falcatum* ، *E. Davisii*، *Creticum* ، *E. E. Kotschy* ، *E. Maritimum* ، *Isauricum* ، *Trisectum*) فعالیت ضد التهابی و ضد دردی را نشان داد. (Kupeli et al., 2000). در سال ۱۹۹۷ تحقیق

دیگری خواص ضد التهابی و ضد درد 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 ضد باکتریایی عصاره الکلی گیاه چوچاق بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنی‌ر سویا در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد

منابع

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

- 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*.
 ۷. طباطبایی یزدی، فریده،، عزیزاده بهبهانی، بهروز، مرتضوی، سید علی. (۱۳۹۴). بررسی اثر عصاره گیاهان تیره نعناع (آویشن، نعناع و کاکوتی) 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. صفحه ۷۷-۶۷.
 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، جلد ۶، شماره ۲، صفحه ۱۴۴-۱۳۶.
 ۱۱. مرتضی سمنانی، کتابون، 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

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 F¹, Moshtaghi H^{2*}, Abbasvali M²

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 10⁶ 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.