اثر ضدمیکروبی اسانس نعناع و نایسین به صورت ترکیبی بر روی لیستریا مونوسیتوژنز

میرحسن موسوی[1]*، رزاق محمودی[1]، سمیرا داودی[2]، نسیم شاویسی[2]

۱- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

* آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان

صندوق‌پستی: ١٦٤٧١ – ٥١٦٦٦، تلفن: ٦٣٧٨٧٤٤ (٠٤١١)، نمابر: ٦٣٧٨٧٤٣ (٠٤١١)

پست الکترونیک: moosavymh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۸ **تاریخ تصویب:** ۹۲/۵/۲۳

چکیده

مقدمه: استفاده از ترکیبات طبیعی که خواص ضدمیکروبی دارند، روش جایگزین مناسبی به منظور کنترل میکروارگانیسم‌های انتقال یافته از مواد غذایی مانند لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد. از این ترکیبات می‌توان به اسانس‌های گیاهی اشاره کرد. یکی از مهم‌ترین این اسانس‌ها، اسانس نعناع بوده که در طب پزشکی و نیز به عنوان ماده نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی کاربرد زیادی دارد. نایسین نیز معروف‌ترین پپتید ضدمیکروبی است که بر روی طیف وسیعی از باکتری‌ها تأثیر می‌گذارد و به صورت گسترده در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

هدف: بررسی خواص ضدمیکروبی اسانس نعناع و نایسین در حالت ترکیبی بر روی لیستریا مونوسیتوژنز در سه دما (٤، ۹ و ١٤ درجه سانتی‌گراد)، سه pH (٥، ٦ و ٧) و چهار غلظت نمک (٠، ١، ٢ و ٤ درصد) هدف این مطالعه بود.

روش بررسی: توصیفی

نتایج: پس از آنالیز اسانس ١٨ ترکیب مختلف در آن شناسایی شد که مهم‌ترین آنها کاروون (٧٨/٧٦ درصد)، لیمونن (١١/٥ درصد) و منتون (١/٠١ درصد) بود. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع و نایسین به ترتیب µl/ml ١٦٠ و IU/ml ٣٢٠ تعیین شد. بیشترین اثر مهارکنندگی اسانس نعناع و نایسین تحت شرایط اسیدی، دمای بالای گرمخانه‌گذاری و غلظت‌های بالای نمک مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه، اثر ترکیبی آنها منجر به کاهش معنی‌دار تعداد باکتری می‌شود.

گل‌واژگان: اثرات ترکیبی، اسانس نعناع، لیستریا مونوسیتوژنز، نایسین

مقدمه

یکی از مهم‌ترین چالش‌های محققین در کارخانجات صنایع غذایی کنترل باکتری لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد. این باکتری سبب ایجاد لیستریوز می‌شود که این بیماری با سپتی سمی، مننژیت، سقط و التهاب معده‌ای – روده‌ای همراه است [۱]. موارد متعددی از بروز بیماری ناشی از باکتری مورد مطالعه به دلیل مصرف مواد غذایی خام مانند گوشت قرمز، فرآورده‌های لبنی و دریایی گزارش شده است [۲]. با توجه به اینکه لیستریا مونوسیتوژنز به بسیاری از استرس‌های محیطی مانند دمای یخچال، شرایط اکسیداتیو و آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشد [۳]، تلاش‌های زیادی به منظور یافتن روش‌های نوین و ترکیبات مؤثر در کاهش آلودگی مواد غذایی توسط این باکتری صورت گرفته است [٤]. در بین روش‌های جایگزین مورد مطالعه مانند روش‌های بیولوژیکی، روش‌های نوین بسته‌بندی مواد غذایی و مواد شیمیایی، اسانس‌های گیاهی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند [٦، ٥].

اسانس‌های روغنی، ترکیبات مایع آروماتیکی می‌باشند که از بخش‌های مختلف گیاه مانند گل، جوانه، برگ، میوه، شاخه، دانه، چوب و ریشه به دست می‌آیند [۷]. نعناع یکی از رایج‌ترین گیاهانی می‌باشد که از زمان باستان به دلیل خواص درمانی و آروماتیک آن مورد استفاده قرار گرفته شده است. این گیاه یکی از اعضای خانواده لامیاسه بوده که دارای ۱۹ گونه و ۱۳ هیبرید طبیعی است. *Mentha spicata* یکی از مهم‌ترین و مشهورترین گونه‌های نعناع است که در قسمت‌های مختلف جهان از جمله اروپا، آفریقا، آسیا، استرالیا و آمریکای شمالی پراکنده می‌باشد [۸] و در طب سنتی استفاده از آن برای هضم بهتر مواد غذایی، افزایش حرکات دستگاه گوارش، درمان سرماخوردگی، وبا و التهاب برونش‌ها کاربرد فراوانی داشته است. امروزه هم از این گیاه به عنوان طعم‌دهنده در تهیه بسیاری از غذاها و همچنین در لوازم آرایشی و بهداشتی استفاده می شود [۹، ۸]. با وجود اینکه برخی از پژوهشگران خواص ضدانگلی [۱۰، ۸] و آنتی‌اکسیدانی [۱۱] این‌گونه نعناع را اثبات نموده‌اند و استفاده از آن را برای پیشگیری از بیماری‌های قلبی – عروقی [۱۲، ۸] و سرطان [۱۳] پیشنهاد می‌کنند، اما ترکیبات و خواص ضدمیکروبی آن به میزان بسیار کمی بررسی شده است. از مهم‌ترین این مطالعات می‌توان به مطالعه ازنینی و همکاران (سال ۲۰۱۱)، چاهان و همکاران (۲۰۰۹) و کولیپولوس و همکاران (۲۰۱۰) اشاره کرد که در این تحقیقات صرفاً ترکیب شیمیایی این گونه از نعناع شناسایی شده است. همچنین نیریز نقدهی و همکاران (۱۳۸۸) در بررسی خواص ضدمیکروبی این گونه از نعناع بر روی باسیلوس سرئوس و اشریشیا کولای O157:H7 به روش حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش کردند که اسانس نعناع به صورت کامل می‌تواند رشد این دو عامل بیماری‌زا را مهار کند [۱۵]. همانطور که بیان شد به دلیل آنکه خواص ضدمیکروبی این گونه نعناع به میزان بسیار کمی مطالعه شده، بررسی خواص ضدباکتریایی آن بر روی سایر عوامل بیماری‌زا مانند لیستریا مونوسیتوژنز در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های غذایی ضروری به نظر می‌رسد. اما به دلیل تأثیرات نامطلوبی که استفاده زیاد از اسانس نعناع بر روی خواص ارگانولپتیک مواد غذایی می‌گذارد، برای به حداقل رساندن میزان این تأثیرات نامطلوب، می‌بایست استفاده از سایر مواد نگهدارنده طبیعی مانند نایسین در ترکیب با آن بررسی شود [١٦].

نایسین پلی‌پپتیدی است که توسط برخی از سویه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه لاکتیس تولید می‌شود. در سال ۱۹٦۹ سازمان بهداشت جهانی استفاده از نایسین را به عنوان یک ماده نگهدارنده در مواد غذایی مجاز اعلام نمود و در حال حاضر در بیش از ۵۰ کشور جهان استفاده از آن بلامانع است [۱۷،۱۸]. این ترکیب بر روی بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت نظیر باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، کلستریدیوم بوتولینوم، انتروکوکوس فکالیس و همچنین اسپور باسیلوس سرئوس و کلستریدیوم تأثیرگذار است [۱۹].

در مطالعه خواص ضدمیکروبی مواد نگهدارنده طبیعی می‌بایست تأثیر تکنولوژی پارامترهای چند مانعی را به منظور افزایش اثر مواد نگهدارنده و کاهش غلظت آنها بررسی نمود [۲۰]، به همین دلیل هدف از این مطالعه دست یابی به ترکیب مناسب نایسین و اسانس با مقدار مشخص بود که بتوانند در کنار شرایط محیطی مورد مطالعه، رشد باکتری رشد لیستریا

مونوسیتوژنز را کنترل نماید. بنابراین در این پژوهش به بررسی چندین پارامتر به صورت توأم شامل ترکیبات ضدمیکروبی (اسانس نعناع و نایسین) و عوامل محیطی (دما (٤، ٩ و ١٤ درجه سانتی‌گراد)، pH (٥، ٦ و ٧) و نمک (١، ٠، ٢ و ٤ درصد)) پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس

اسانس استاندارد گیاه نعناع (*Mentha spicata*) از شرکت داروسازی باریج اسانس کاشان تهیه شد. اسانس‌گیری از گیاه نعناع به روش تقطیر با بخار آب انجام شده بود [٢١]. 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 ١٠ درصد (DMSO) (مرک، آلمان) به عنوان امولسیفایر استفاده شد. بر این اساس غلظت‌های مورد مطالعه اسانس نعناع از ٢٠ تا ٢٥٦٠ µl/ml به صورت رقت‌های سریالی دوتایی تعیین شد [٢٢].

آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس

ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس گیاه مورد مطالعه با همکاری دانشکده شیمی دانشگاه تبریز شناسایی شدند. اسانس گیاه موردنظر پس از آماده‌سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی تزریق شد تا نوع ترکیب‌های تشکیل‌دهنده آن مشخص شود. مشخصات دستگاه گاز کروماتوگراف Agilent 6890 شامل: ستون مویینه به طول ٣٠ متر، قطر داخلی ٢٥٠ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ٠/٢٥ میکرومتر از نوع HP-5MS با برنامه دمایی ٧٠ تا ٢٨٠ درجه سانتی‌گراد و با افزایش تدریجی ٢٥ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ٢٨٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ١٠ – ٢ دقیقه بود. دمای محفظه تزریق ٢٦٥ درجه سانتی‌گراد و سرعت گاز هلیوم (به عنوان حامل) ١/٢ میلی‌لیتر در هر دقیقه بود. طیف‌سنج جرمی از نوع Agilent 5973 با انرژی یونیزاسیون (EI) ٧٠ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ٢٥٠ درجه سانتی‌گراد بود.

آماده‌سازی نایسین

نایسین خالص از شرکت سیگما کشور انگلستان خریداری شد. برای آماده‌سازی 10^4 واحد بین‌المللی نایسین، ابتدا ٠/٠٢ گرم نایسین خالص را در ١٠٠٠ میکرولیتر اسید کلریدریک ٢ درصد (٠/٠٢ M) در میکروتیوپ‌های استریل حل نموده [٢٣]، در مرحله بعد آن را در دمای ٨٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ٧ دقیقه در بن ماری حرارت داده و پس از سانتریفوژ و فیلتراسیون مایه رویی با فیلتر ٠/٢٢ میکرون، آن را تا زمان مصرف در دمای ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمودیم. بر این اساس هر ٠/١ میکرولیتر از محلول نایسین و اسید کلریدریک ٢ درصد، حاوی ٢ واحد بین‌المللی نایسین بود [٢٤]. غلظت‌های مورد مطالعه نایسین نیز بر اساس واحد بین‌المللی و از ٢/٥ تا ٢٥٦٠ به صورت رقت‌های سریالی دوتایی تعیین شد.

باکتری مورد مطالعه و تعیین دوز تلقیح

باکتری مورد مطالعه لیستریا مونوسیتوژنز (ATCC 19115) بود که به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شد. آماده‌سازی باکتری برای تلقیح با انتقال باکتری از میکروتیوپ استریل به محیط آبگوشت قلب و مغز (مرک، آلمان) و نگهداری آن به مدت ٢٤ ساعت در ٣٧ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. مجدداً کشت دومی از کشت ٢٤ ساعته اول در محیط آبگوشت قلب و مغز دیگر در ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت تهیه شد و با استفاده از تهیه سری رقت و کشت سطحی مقدار باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص شد. با انجام محاسبات ریاضی دوز تلقیح تعیین شد. در نهایت به هر میلی‌لیتر محیط کشت تعداد 10^6 باکتری تلقیح شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع و نایسین

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع و نایسین از روش براث میکرودایلوشن در پلیت های میکروتیتر ٩٦ چاهکی استریل (اکستراژن، امریکا) استفاده شد. به طور خلاصه در هر چاهک ١٦٠ میکرولیتر محیط آبگوشت قلب و

مغز استریل، ۲۰ میکرولیتر از هرکدام از رقت‌های متوالی اسانس مورد مطالعه و ۲۰ میکرولیتر کشت باکتریایی اضافه شد. کنترل مثبت رشد (محیط کشت حاوی سوسپانسیون میکروبی) و کنترل منفی رشد (محیط کشت حاوی ترکیب ضدمیکروبی به علاوه DMSO، بدون سوسپانسیون میکروبی) نیز در این مرحله از آزمایش در نظر گرفته شد. پس از افزودن غلظت‌های مورد نظر از ترکیب ضدمیکروبی و باکتری مورد مطالعه، پلیت‌های میکروتیتر به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۲۵۰ rpm برای مخلوط شدن در شیکر قرار داده شدند. بعد از طی شدن زمان ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، چاهک‌ها از نظر وجود کدورت به طریق چشمی بررسی و حداقل غلظتی که مانع رشد باکتری شده بود یا عدم کدورت مشهود با گروه کنترل داشت، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از نمونه در محیط آگار قلب و مغز (مرک، آلمان) کشت داده شد و پس از طی ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، عدم رشد تأیید شد [۲٦، ۲۵]. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نایسین نیز مشابه با اسانس نعناع صورت گرفت.

بررسی اثر ترکیبی اسانس نعناع و نایسین بر روی رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز

برای تعیین اثر متقابل اسانس مورد مطالعه و نایسین، دو غلظت پایین‌تر از حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس و نایسین در نظر گرفته شد. در این مرحله از آزمایش در هر چاهک پلیت های میکروتیتر، ۱٦۰ میکرولیتر محیط آبگوشت قلب و مغز استریل دارای pH ۵، ٦ و ۷ و دارای غلظت نمک ۰، ۱، ۲ و ٤ درصد، ۲۰ میکرولیتر از دو غلظت مورد مطالعه اسانس و نایسین و ۲۰ میکرولیتر کشت باکتریایی اضافه شد. کنترل مثبت رشد (محیط کشت حاوی سوسپانسیون میکروبی) و کنترل منفی رشد (محیط کشت حاوی ترکیب ضدمیکروبی به علاوه DMSO، بدون سوسپانسیون میکروبی) در این مرحله از آزمایش نیز 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 ۲۵۰ rpm در شیکر برای مخلوط شدن قرار داده شد و سپس به مدت ۲٤ ساعت در ۳ دمای ٤، ۹ و ۱٤ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. به منظور ارزیابی رشد باکتری پس از طی دمای گرمخانه‌گذاری شمارش کلونی به روش کشت سطحی در محیط آگار قلب و مغز صورت گرفت [۲۰]. برای شمارش تعداد باکتری در هر کدام از مراحل انجام آزمایش، پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیتی انتخاب شد که تعداد کلونی باکتری آن بین ۳۰۰ – ۳۰ باکتری بود.

در این مطالعه از شاخصی به نام DP (Differences in Population) استفاده شد که به صورت زیر محاسبه می‌شود [۲۷].

$$\text{Log DP} = \log (N/N_0) = \log (N) - \log (N_0)$$

N_0: تعداد باکتری اولیه

N: تعداد باکتری پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری

این مطالعه با سه بار تکرار انجام گرفت.

آنالیز آماری

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار لحاظ شد. 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 شد و از همبستگی اسپیرمن برای بررسی ارتباط متغیرهای مزبور با هم استفاده شد.

نتایج

آنالیز اسانس

نتایج آنالیز ترکیبات اسانس نعناع مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از GC-MS در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در این جدول آمده است، ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس شامل کاروون (۷۸/۷٦ درصد)، لیمونن (۱۱/۵ درصد)، منتون (۱/۰۱ درصد)، منتول (۱ درصد)، سیس دی هیدروکارول (۱/٤۳ درصد)، ترانس کاریوفیلین

(۱/۰٤ درصد)، بتا بوربونن (۱/۲۳ درصد) و ترپینین (۰/۹۹ درصد) می باشند.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع و نایسین

در این آزمایش خواص ضدباکتریایی اسانس نعناع و نایسین در حالت ترکیبی بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در سه دما (٤، ۹ و ١٤ درجه سانتی‌گراد)، سه pH (۵، ٦ و ۷) و چهار غلظت نمک (۰، ۱، ۲ و ٤ درصد) مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس نعناع و نایسین علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز ابتدا حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) این دو ماده در غلظت‌های ۲۰ تا ۲۵٦۰ میکرولیتر در هر میلی‌لیتر اسانس نعناع و غلظت‌های ۲/۵ تا ۲۵٦۰ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر نایسین بررسی شد.

حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع و نایسین به ترتیب ۱٦۰ µl/ml و ۳۲۰IU/ml تعیین شد، با توجه به این نتایج، دو غلظت ٤۰ µl/ml و ۸۰ µl/ml اسانس نعناع و ۸۰ IU/ml و ۱٦۰ IU/ml نایسین برای بررسی حالت ترکیبی انتخاب شد.

اثرات ترکیبی ضدباکتریایی اسانس نعناع و نایسین

آنالیز آماری واریانس غلظت‌های مختلف اسانس نعناع در حالت ترکیبی با نایسین بر متغیر وابسته (کاهش لگاریتم تعداد باکتری برحسب CFU/ml) در جدول شماره‌های ۲، ۳ و ٤ نشان داده شده است. با توجه به نتایج مطالعه قبلی نویسنده [۲۸]، در هر چهار حالت زیر، اثر ترکیبی اسانس نعناع و نایسین در کاهش تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بیشتر از هنگام بکارگیری آنها در حالت جداگانه بود:

گروه ۱: ۸۰IU/ml +٤۰µl/ml (P<۰/۰۲۲)

گروه ۲: ۱٦۰IU/ml +٤۰µl/ml (P<۰/۰۰۱)

گروه ۳: ۸۰IU/ml +۸۰µl/ml (P<۰/۰۰۱)

گروه ٤: ۱٦۰IU/ml +۸۰µl/ml (P<۰/۰۰۱)

ضریب همبستگی اسپیرمن بر روی غلظت اسانس نعناع و نایسین با کاهش لگاریتم تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز به ترتیب برابر ۰/۵۵- (p<۰/۰۰۱) و ۰/۰۷- (p<۰/۰۸۳) بود. این ضریب بدین معنی است که با افزایش غلظت این مواد نگهدارنده، تعداد باکتری مذکور به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد.

اثر عوامل محیطی بر روی میزان تاثیر اسانس نعناع و نایسین در کاهش رشد باکتری

دما

مطالعه اثر درجه حرارت های مختلف گرمخانه‌گذاری (٤، ۹ و ١٤ درجه سانتی‌گراد) بر متغیر وابسته (لگاریتم تعداد باکتری برحسب CFU/ml) توسط آنالیز واریانس نشان داد که بین درجه حرارت‌های مختلف در کاهش رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۰۱). آزمون t-test نیز نشان داد که دمای ١٤ درجه در مقایسه با دمای ٤ و ۹ درجه باعث کاهش بیشتر لگاریتم باکتری می‌شود (p<۰/۰۱٦). ضریب همبستگی اسپیرمن بر روی درجه حرارت با تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز برابر ۰/۱۹- بود (p<۰/۰۰۱). این ضریب بدین معنی است که با افزایش درجه حرارت نگهداری از ٤ درجه به ١٤ درجه، تعداد باکتری مذکور به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد.

pH

بررسی اثر pH های مختلف (۵، ٦ و ۷) بر متغیر وابسته (لگاریتم تعداد باکتری بر حسب CFU/ml) با استفاده از آنالیز واریانس مشخص کرد که بین pHهای مختلف در کاهش باکتری تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۰۱). به عبارت دیگر این نتیجه نشان می‌دهد که با کاهش میزان pH لگاریتم تعداد باکتری کاهش می‌یابد. آزمون t-test نیز نشان داد که اثر pH=۵ بیشتر از سایر pH ها می‌باشد (p<۰/۰۰۱). ضریب همبستگی اسپیرمن بر روی میزان pH با تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز برابر ۰/۳۰ (P<۰/۰۰۱) بود. این ضریب نشان می‌دهد که با کاهش pH (افزایش شرایط اسیدی) رشد باکتری فوق‌الذکر نیز کم می‌شود.

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

ردیف	ترکیب	اندیس بازدارنده	درصد
۱	Beta- Myrcene	٤٥٠	۰/۲۵
۲	Limonene	٥٠٩	۱۱/۵۰
۳	Gamma-Terpinene	٥٥٣	۰/۱٦
٤	Menthone	۷۰۳	۱/۰۱
٥	Menthol	۷۱۳	۱
٦	Terpinen-4-ol	۷۲۰	۰/۹۹
۷	Alpha-Terpinol	۷۳۷	۰/۳۱
۸	Dihydrocarveol	۷٤۲	۰/۲۲
۹	Cis-Dihydrocarveol	۷٤٦	۱/٤۳
۱۰	Dihydrocarvone	۷٥٦	۰/٤۳
۱۱	Trans-Carveol	۷۷۳	۰/۳
۱۲	Carvone	۸۱۹	۷۸/۷٦
۱۳	Dihydrocarvyl acetate	۹۰٦	۰/٥۷
۱٤	L-carveol	۹٤٦	۰/۳۲
۱٥	Beta-Bourbonene	۹۸۱	۱/۲۳
۱٦	Trans-Caryophyllene	۱۰۲۱	۱/۰٤
۱۷	Gamma-Amorphene	۱۰٤۸	۰/۲۱
۱۸	Alpha-Amorphene	۱۰٥۸	۰/۱٦
۱۹	سایر ترکیبات	-	۰/۱۱
	جمع		۱۰۰

جدول شماره ۲- اثر ترکیبی اسانس نعناع و نایسین برروی شاخص DP لیستریا مونوسیتوژنز در دمای ۱٤°C

تیمار		غلظت			
		اسانس µl/ml + نایسین IU/ml			
pH	نمک (g/۱۰۰)	٤۰ + ۸۰	۱٦۰ + ٤۰	۸۰ + ۸۰	۸۰ + ۱٦۰
٥	۰	۰/۱٦ ± ۰/۰۳٥	-۰/۳۲ ± ۰/۱۸۳	-۰/٦۱ ± ۰/۲۰٥	-۱/۲۲ ± ۰/۱٤۱
	۱	-۰/۲۸ ± ۰/٤٥۹	-۱/۱٤ ± ۰/۰٦۳	-۱/۰٤ ± ۰/۰٤۹	-۱/۳۷ ± ۰/۰۰۷
	۲	-۱/۷۳ ± ۰/۲٦۸	-۱/۷۷ ± ۰/۰۲۸	-۱/٥ ± ۰/۱۳٤	-۱/۹۸ ± ۰/۲٤۰
	٤	-۲/۲٥ ± ۰/۲٤۷	-۲/۹۰ ± ۰/۲٦۱	-۲/۱ ± ۰/۷۰۰	-۳/۰۱ ± ۰/۰۳٥
٦	۰	۱/۰۲ ± ۰/۲۹٦	۰/۲۱ ± ۰/۰۸٤	۰/۲۳ ± ۰/۰۹۱	-۰/۱۰ ± ۰/۱٤۸
	۱	۰/۲٤ ± ۰/۰۲۱	-۰/٤۲ ± ۰/۳۹٥	-۰/۳٦ ± ۰/۲۲٦	-۰/٥۲ ± ۰/۳۳۲
	۲	-۰/۹٦ ± ۰/۰۲۸	-۱/۲٥ ± ۰/۲۲٦	-۱/۱٤ ± ۰/۲۷٥	-۱/٤۳ ± ۰/٥۰۲
	٤	-۱/۳٤ ± ۰/۲٦۱	-۱/۷۸ ± ۰/٥۰۲	-۱/۷۱ ± ۰/٤٥۲	-۲/٤۹ ± ۰/۰۹۱
۷	۰	۱/۰۲ ± ۰/۳۸	۰/۳۹ ± ۰/۰٤۲	۰/۷٥ ± ۰/۱۰٦	۰/۲٥ ± ۰/۰۲۸
	۱	۰/۳۲ ± ۰/۰۷۷	-۰/۰۷ ± ۰/۲۳۳	۰/۰۱ ± ۰/۱٦۲	-۰/۲۲ ± ۰/۳۳۹
	۲	-۰/٦۳ ± ۰/۰۳٥	-۰/۹٥ ± ۰/۱۲۷	-۰/۷٤ ± ۰/۰۷	-۱/۰۳ ± ۰/۰۹۱
	٤	-۱/۱۰ ± ۰/٤۰۳	-۱/۷۰ ± ۰/۰۷۷	-۱/٥۱ ± ۰/۰۳٥	-۲/۳۷ ± ۰/٥۲۳

جدول شماره ۳- اثر ترکیبی اسانس نعناع و نایسین بر روی شاخص DP لیستریا مونوسیتوژنز در دمای ۹ درجه سانتی‌گراد

تیمار		غلظت			
		اسانس µl/ml + نایسین IU/ml			
pH	نمک (g/۱۰۰)	٤۰ + ۸۰	۱٦۰ + ٤۰	۸۰ + ۸۰	۸۰ + ۱٦۰
٥	۰	-۰/۳۱ ± ۰/۰۹۸	-۰/٥۰ ± ۰/۰۱٤	-۰/۲۰ ± ۰/۱۲۰	-۰/۹٥ ± ۰/۰٤۲
	۱	-۰/٥۱ ± ۰/۰٤۱	-۰/٦۱ ± ۰/۰٤۲	-۰/٤۰ ± ۰/۱۱۳	-۰/۸۳ ± ۰/۰۷۷
	۲	-۱/۰۲ ± ۰/۰۲۸	-۱/٤۱ ± ۰/۰۲۸	-۱/۱٤ ± ۰/۱٦۹	-۱/٤٦ ± ۰/۰۰۷
	٤	-۱/٤۳ ± ۰/۰۹۱	-۲ ± ۰/۰۰۷	-۱/۹۳ ± ۰/۰۹۸	-۲/٦۱ ± ۰/٥٥۱
٦	۰	۰/۷۸ ± ۰/۰۱٤	۰/٤٦ ± ۰/۰٤۲	۰/۷۲ ± ۰/۰۳٥	۰/۱٦ ± ۰/۰٤۲
	۱	-۰/۰۸ ± ۰/۰٤۲	-۰/۲۰ ± ۰/۰۷۰	-۰/۱۸ ± ۰/۰۰۷	-۰/۳۱ ± ۰/۱۲۷
	۲	-۰/۳٤ ± ۰/۲۸۲	-۱/۱۸ ± ۰/۱۲۷	-۰/٦۳ ± ۰/۰۷۷	-۱/۳۰ ± ۰/۰۲۸
	٤	-۱/۰۸ ± ۰/۱۲۰	-۱/٤۱ ± ۰/۳۸۸	-۱/۲۳ ± ۰/۲۰٥	-۱/٦۳ ± ۰/۳٦۰
۷	۰	۰/۹۱ ± ۰/۱۲۰	۰/۷۹ ± ۰/۰۲۸	۰/۸۹ ± ۰/۱۳٤	۰/٦۱ ± ۰/۱٥٥
	۱	۰/۳۸ ± ۰/۰۳٥	۰/۲۷ ± ۰/۰٦۳	۰/۳٥ ± ۰/۰٥٦	۰/۲۲ ± ۰/۰۸٤
	۲	-۰/۱٥ ± ۰/۰٤۲	-۰/۲٥ ± ۰/۰۹۸	-۰/۲۱ ± ۰/۱۰٦	-۰/۳۷ ± ۰/۱۹۰
	٤	-۰/۷۳ ± ۰/۱۳٤	-۰/۹۹ ± ۰/۳۲٥	-۱/۳۲ ± ۰/۰٦۳	-۲/۰٤ ± ۰/۰۷۷

جدول شماره ٤- اثر اسانس نعناع و نایسین برروی شاخص DP لیستریا مونوسیتوژنز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

تیمار		غلظت			
		اسانس µl/ml + نایسین IU/ml			
pH	نمک (g/١٠٠)	٤٠ + ٨٠	٤٠ + ١٦٠	٨٠ + ٨٠	١٦٠ + ٨٠
٥	٠	٠/٣٠ ± ٠/٠٢٨	−٠/٢٥ ± ٠/٠٩٨	−٠/١٨ ± ٠/٠٣٥	−٠/٥٢ ± ٠/١٢٧
	١	−٠/٠٣ ± ٠/٠٤٩	−٠/٤٥ ± ٠/٠٤٢	−٠/١٩ ± ٠/٠٤٢	−٠/٦٩ ± ٠/٠٢١
	٢	−٠/٧٧ ± ٠/٣٢٥	−٠/٧٨ ± ٠/١٠٦	−٠/٧٥ ± ٠/٩٨٩	−٠/٩٦ ± ٠/٠٤٩
	٤	−١/٠٩ ± ٠/١٢٧	−١/٤٣ ± ٠/٤٤٥	−١/٢٠ ± ٠/٢٥٤	−١/٩٩ ± ٠/٠١٤
٦	٠	٠/٨٦ ± ٠/٠٦٣	٠/٧٠ ± ٠/٠٢١	٠/٠٢٥ ± ٠/٠٣٥	٠/٣٤ ± ٠/١٦٢
	١	٠/٥٠ ± ٠/١١٣	−٠/١٢ ± ٠/٠٠٧	−٠/٠٧ ± ٠/٠٦٣	−٠/٣٨ ± ٠/٠٣٥
	٢	٠/١٨ ± ٠/٠٦٣	−٠/٤٠ ± ٠/١١٣	−٠/٢٨ ± ٠/٠٠٧	−٠/٦٩ ± ٠/١٧٦
	٤	−٠/٧٠ ± ٠/٤١٠	−٠/٩٩ ± ٠/٠١٤	−٠/٧٥ ± ٠/٠٩٨	−١/٤٤ ± ٠/٤٥٢
٧	٠	١/٠٦ ± ٠/٠٨٤	٠/٩٣ ± ٠/٠٦٣	٠/٩٩ ± ٠/٠٤٢	٠/٨٠ ± ٠/٠٣٥
	١	٠/٦٩ ± ٠/٢٤٠	٠/٣٧ ± ٠/٠٨٤	٠/٥٥ ± ٠/٠٩٨	٠/٣٤ ± ٠/٠٨٤
	٢	٠/٠٨ ± ٠/١٣٤	−٠/٠٧ ± ٠/٠٧٠	−٠/٠٩ ± ٠/٠٩٨	−٠/٢٧ ± ٠/٠٧٠
	٤	−٠/٣٩ ± ٠/٠٩٨	−٠/٦٦ ± ٠/٢٠٥	−٠/٦٣ ± ٠/٢١٢	−١/٤٠ ± ٠/١١٣

نمک

مطالعه اثر درصدهای نمک (٠، ١، ٢ و ٤ درصد) بر متغیر وابسته (لگاریتم تعداد باکتری بر حسب CFU/ml) توسط آنالیز واریانس نشان دهنده این است که بین غلظت‌های مختلف نمک ٠، ١، ٢ و ٤ درصد تفاوت معنی‌داری در کاهش تعداد باکتری وجود دارد (p<٠/٠٠١). آزمون t-test نیز نشان داد که نمک باعث کاهش تعداد باکتری می‌شود. به طوری که کاهش تعداد باکتری در دو غلظت نمک ٢ درصد (p<٠/٠٠٢)، و ٤ درصد (p<٠/٠٠١) معنی‌دار بود. ضریب همبستگی اسپیرمن بر روی میزان درصد نمک با تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز برابر ٠/٥٧- (p<٠/٠٠١) بود. این ضریب بدین‌معنی است که با افزایش درصد نمک رشد باکتری فوق‌الذکر کاهش می‌یابد.

اثرات متغیرهای مورد مطالعه در کنار همدیگر روی لگاریتم تعداد باکتری معنی‌دار مشاهده شد (p<٠/٠٠١) که در این حالت اثر نمک از سایر متغیرها بیشتر بود و بعد به ترتیب اثر اسانس، دما، سپس pH و نایسین قرار داشتند (p<٠/٠٠١).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بهترین حالت کاهش میزان رشد باکتری استفاده از µl/ml ٨٠ اسانس نعناع و IU/ml ١٦٠ نایسین در دمای ١٤ درجه سانتی‌گراد و pH=٥ و به هنگام استفاده از ٤ درصد نمک می‌باشد.

بحث

استفاده از پارامترهای چندمانعی راهکاری مناسب برای کاهش میزان غلظت مورد استفاده مواد نگهدارنده در مواد غذایی می‌باشند. در این مطالعه به بررسی تأثیر چند پارامتر شامل: **۱.** مواد ضدمیکروبی: نایسین و اسانس نعناع و **۲.** عوامل محیطی: دما، pH و نمک بر روی رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز پرداخته شد. نایسین و اسانس نعناع هر دو بر روی غشای سلولی باکتری‌ها تأثیر می‌گذارند. در واقع نایسین با تأثیر بر غشای سیتوپلاسمی میکروارگانیسم‌ها و ایجاد حفره در این غشاء سبب اختلال در تبادل مواد موردنیاز سلول نظیر ATP و ADP می‌شود. همچنین تشکیل حفرات در غشای سلولی روی نیروی محرکه بار مثبت سلول اثر نموده باعث مرگ میکروارگانیسم می‌شود [۲۹]. علاوه بر این، خاصیت آب گریز اسانس‌های روغنی نیز سبب می‌شود که این ترکیب به راحتی در غشای لیپیدی نفوذ کند و نشت مواد درون باکتری‌ها به بیرون و در نهایت مرگ آنها اتفاق بیفتد [۳].

در مطالعه حاضر آنالیز ترکیبات موجود در اسانس نعناع با استفاده از GC-MS صورت گرفت که نشان داده شد بیشترین ترکیبات موجود در آن کاروون (۷۸/۷٦ درصد) و لیمونن (۱۱/۵ درصد) می‌باشد. به طور کلی مقایسه نتایج به دست آمده در مورد خواص ضدباکتریایی اسانس‌های مختلف بسیار مشکل می‌باشد. از دلایل آن می‌توان به تفاوت در روش‌های مختلف بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس‌ها، منابع تهیه آنها و سویه‌های باکتریایی به کار 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، آنتی‌اکسیدان‌ها، مدت زمان و دمای انکوباسیون اشاره کرد [۳۱، ۳۰]. بنابراین با توجه به مطالب گفته شده نتایج به دست آمده در مطالعات مختلف بعضاً با یکدیگر متفاوت است. به عنوان مثال در مطالعه کولیپولوس و همکاران در سال ۲۰۱۰ بیشترین ترکیبات موجود در اسانس نعناع پس از آنالیز آن پیپریتونن اکسید (۳٦ درصد) و ۱،۸ سینول (۱٤ درصد) گزارش شد و میزان کاروون در اسانس نعناع (*Mentha spicata*) جمع‌آوری شده در این کشور بسیار ناچیز بود [۱٤]. اما نتایج این مطالعه با سایر تحقیقات همخوانی دارد که در این گزارش‌ها هم کاروون بیشترین ترکیب موجود در اسانس نعناع بوده است [۳۲، ۹، ٤].

مطالعات معدودی خواص ضدباکتریایی اسانس نعناع را مورد مطالعه قرار داده که از این موارد می‌توان به مطالعه محبوبی و حقی (۲۰۰۸) اشاره نمود که خواص ضدباکتریایی اسانس نعناع را به روش دیسک دیفیوژن و براث میکرودایلوشن مورد بررسی قرار دادند و حداقل غلظت مهارکنندگی آن را برای باکتری‌های گرم مثبت بین ٤ µl/ml – ۰/۲۵ و برای لیستریا مونوسیتوژنز ۱ µl/ml گزارش نمودند. همچنین رضوی روحانی و همکاران (۲۰۱۱) غلظت مهاری نایسین را ۲۵ IU/ml گزارش نمودند. تفاوت‌های مختلفی که در گزارش غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع و نایسین وجود دارد به دلیل تفاوت در گونه نعناع، سویه باکتری و نوع محیط کشت مورد استفاده می‌باشد [۳۳]. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نعناع و نایسین به ترتیب ۱٦۰ µl/ml و ۳۲۰ IU/ml تعیین شد.

در این مطالعه تمامی غلظت‌های ترکیبی مورد استفاده به صورت معنی‌داری سبب کاهش میزان باکتری لیستریا مونوسیتوژنز شدند. علت افزایش تأثیر اسانس نعناع و نایسین به هنگام استفاده همزمان، افزایش میزان تشکیل حفرات است که در این حالت مرگ سلول سریع‌تر رخ می‌دهد [۲۰]. استفاده از اسانس نعناع به همراه نایسین سبب برطرف شدن محدودیت‌های استفاده از این ماده می‌شود، چرا که نایسین ترکیبی است که حلالیت کمی در آب داشته و همچنین بیشترین میزان تأثیر آن در شرایط اسیدی می‌باشد، یکی دیگر از محدودیت‌های استفاده از نایسین این است که بسیاری از باکتری‌ها مثل برخی از سویه‌های لیستریا مونوسیتوژنز به آن مقاومت دارند [۳٤]، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که با ترکیب این دو می‌توان به مشکلات استفاده از نایسین و همچنین اسانس نعناع غلبه کرد.

همچنین در این تحقیق، در بررسی عوامل محیطی بر میزان

اثر اسانس نعناع و نایسین روی لیستریا مونوسیتوژنز مشخص شد که افزایش میزان دمای گرمخانه‌گذاری و غلظت نمک و کاهش pH سبب افزایش تأثیر مواد نگهدارنده مورد استفاده می‌شود. اما در هیچ‌کدام از حالت‌های مورد مطالعه تعداد باکتری به طور کامل صفر نشد، این مسأله نشان‌دهنده سازگاری بالای لیستریا مونوسیتوژنز به غلظت‌های بالای نمک و دمای پایین است که به علت تجمع موادی مانند گلیسین – بتایین یا کارنیتین بوده، همچنین می‌تواند با خروج آب از سلول، غلظت‌های بالای نمک را به خوبی تحمل نماید [۳۵]. علاوه بر این، یکی دیگر از دلایل مقاومت لیستریا مونوسیتوژنز به دماهای پایین وجود اسیدهای چرب در غشای خارجی این باکتری می‌باشد. به همین دلیل استفاده از دماهای بالا به عنوان یک استرس محیطی برای این باکتری محسوب می‌شود [۳٦].

از طرف دیگر کاهش معنی‌دار تعداد باکتری در اثر افزایش غلظت نمک را می‌توان به افزایش خاصیت آب‌گریزی غشاء و کاهش حلالیت پروتئین‌های آن به هنگام استفاده از نمک نسبت داد، که پس از این تغییرات در غشای باکتری، ورود اسانس نعناع و نایسین به درون میکروارگانیسم راحت‌تر صورت می‌گیرد [۲۰]. افزایش اثرات ترکیبی اسانس نعناع و نایسین در pHهای پایین علاوه بر اینکه به دلیل افزایش تأثیر اسانس نعناع و نایسین بوده، بلکه شرایط اسیدی به صورت مستقیم در کاهش بقای باکتری لیستریا مونوسیتوژنز نقش دارد. بنابراین می‌توان گفت کاهش pH یک پارامتر اساسی در کاهش بقای باکتری است، که این مطلب با سایر تحقیقات همخوانی دارد [۳۷، ۳٤، ۲۰]. در این مطالعه دمای ۱٤ درجه نسبت به دمای ٤ و ۹ درجه سبب کاهش بیشتر تعداد باکتری شد، در تفسیر این نتیجه می‌توان گفت که هرچند لیستریا مونوسیتوژنز طیف وسیعی از دماها (٤٥ – ۲ درجه سانتی‌گراد) را در محیط و مواد غذایی تحمل می‌کند، اما به هنگام استفاده از سایر پارامترها مانند شرایط اسیدی و نمک، باکتری می‌بایست انرژی بیشتری مصرف کند تا بتواند خود را در برابر عوامل نامساعد محیطی حفظ کند و همین مسأله ضرورت استفاده از تکنولوژی پارامترهای چندمانعی را روشن می‌سازد [۳۸].

نتیجه‌گیری

در این تحقیق خواص ضدمیکروبی اسانس نعناع و نایسین به صورت ترکیبی و نیز تأثیر عوامل محیطی بر روی میزان اثر این ترکیبات در رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه اهمیت استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی به عنوان جایگزینی مناسب برای مواد شیمیایی و کاربرد پارامترهای چندمانعی در کاهش و حذف باکتری لیستریا مونوسیتوژنز را بیان می کند. همچنین این مطالعه ضرورت توجه به عوامل محیطی مهمی مانند pH و نمک را به منظور کنترل لیستریا مونوسیتوژنز در محصولات لبنی تهیه شده از شیر خام مانند پنیرهای سنتی که در دمای یخچال نگهداری می‌شوند و امکان بقاء باکتری در آنها وجود دارد را روشن می‌سازد. به همین منظور پس از مشاهده این نتایج در شرایط آزمایشگاهی، پیشنهاد می‌شود مطالعه بر روی مدل‌های غذایی بخصوص گوشت و فرآورده‌های گوشتی، فرآورده‌های دریایی و لبنی انجام شود. همچنین به منظور کاربردی‌تر کردن هرچه بیشتر نتایج، پیشنهاد می‌شود اثر اسانس نعناع و نایسین بر روی سایر عوامل بیماری‌زا و فلور میکروبی مواد غذایی مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1. Solomakos N, Govaris A, Koidis P and Botsoglou N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Sci*. 2008; 1: 159 – 66.

2. Magalhães L and Nitschke M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control* 2013; 29: 138 - 42.

3. Shannon EM, Milillo SR, Johnson MG and Ricke SC. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by exposure to a combination of nisin and cold-pressed terpene *less valencia* oil. *J. Food Sci*. 2011; 9: m600 - m604.

4. Znini M, Bouklah M, Majidi L, Kharchouf S, Aouniti A, Bouyanzer A, Hammouti B, Costa J and Al-Deyab SS. Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. *Int. J. Electrochem. Sci*. 2011; 6: 691 - 704.

5. Gutierrez J, Barry-Ryan C and Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiol*. 2008; 1: 91 –7.

6. Nedorostova L, Kloucek P, Kokoska L, Stolcova M and Pulkrabek J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control* 2009; 2: 157 – 60.

7. Solorzano-Santos F and Miranda-Novales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotech.* 2012; 2: 136 – 41.

8. Kumar P, Mishra S, Malik A and Satya S. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Ind. Crops. Prod*. 2011; 4: 802 – 17.

9. Chauhan RS, Kaul MK, Shahi AK, Kumar A, Ram G and Tawa A. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India. *Ind. Crops. Prod*. 2009; 2 - 3: 654 – 6.

10. Govindarajan M, Sivakumar R, Rajeswari M and Yogalakshmi K. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitol. Res*. 2012; 110: 2023 – 32.

11. Kanatt SR, Chander R and Sharma A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem.* 2007; 100: 451 – 8.

12. Lahlou1 S, Ferreira Lima Carneiro-Leão R and Leal-Cardoso JH. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in DOCA-salt-hypertensive rats. *Phytomedicine* 2002; 9: 715 – 20.

13. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D and Idaomar M. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem. Toxicol*. 2008; 46: 446 – 75.

14. Koliopoulos G, Pitarokili D, Kioulos E, Michaelakis A and Tzakou O. Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha, Salvia*, and *Melissa* essential oils against the West Nile virus mosquito Culexpipiens. *Parasit. Res.* 2010; 2: 327 – 35.

15. Neyriz Nagadehi M, Razavi Rohani SM, Karim G, Razavilar V, Zeynali A and Delshad R. The effect of monolaurin in combination with *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils on *Bacillus cereus* and *E. coli* O157:H7: in vitro study. *Vet. J.* 2010; 3: 657 - 66.

16. Nazer AI, Kobilinsky A, Tholozana JL and Dubois-Brissonneta F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella sv. Typhimurium*: a synergistic effect? *Food Microbiol*. 2005; 5: 391 – 8.

17. Gallo LI, Pilosof AMR and Jagus RJ. Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey. *Food Control* 2007; 9: 1086 - 92.

18. Kristo E, Koutsoumanis KP and Biliaderis CG. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloid*s 2008; 22: 373 – 86.

19. Garcia P, Rodriguez L, Rodriguez A and, Martinez B. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trend. Food Sci. Technol.* 2010; 8: 373 - 82.

20. Razavi Rohani SM, Moradi M, Mehdizadeh T, Saei-Dehkordi SS, Griffiths MW. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil

separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *LWT-Food. Sci. Technol*. 2011; 10: 2260 - 5.

21. Lv F, Liang H, Yuan Q and Li C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res. Int*. 2011; 9: 3057 – 64.

22. Mahboubi M and Haghi Gh. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol*. 2008; 2: 325 - 7.

23. Moosavy MH, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Zahraei Salehi T, Abbasifar R, Ebrahimzadeh Mousavi HL, Alipour M, Emami Razavi N, Gandomi H and Noori N. 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 Res. Int.* 2008; 10: 1050 – 7.

24. Al-Holy MA, Al-Nabulsi A, Osaili TM, Ayyash MM and Shaker RR. Inactivation of *Listeria innocua* in brined white cheese by a combination of nisin and heat. *Food Control* 2012; 1: 48 - 53.

25. Weerakkody NS, Caffin N, Turner MS and Dykes GA. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control* 2010; 10: 1408 - 14.

26. Rivas L, McDonnell MJ, Burgess C, O'Brien M, Navarro-Villa A, Fanning S and Duffy G. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int. J. Food Microbiol*. 2010; 1 - 2: 70 – 8.

27. Zhou F, Ji B, Zhang H, Jiang H, Yang Y and Li J. The antibacterial effects of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*. *J. Food Saf*. 2007; 2: 124 - 33.

28. Moosavy MH, Shavisi N. Antilisterial effect of *Mentha spicata*: In the presence of temperature, pH and NaCl. *Iranian. J. Medi. Arom. Plan. Res*. In Press.

29. De Arauza LJ, Jozalaa AF, Mazzola PG and Vessoni Penna TC. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trend. Food Sci. Technol.* 2009; 3 - 4: 146 - 54.

30. Lis-Balchin M, Steyrl H and Krenn E. The comparative effect of novel Pelargonium essential oils and their corresponding hydrosols as antimicrobial agents in a model food system. *Phytotherapy Res.* 2003; 1: 60 – 5.

31. Brandi G, Amagliani G, Schiavano GF, De Santi M and Sisti M. Activity of Brassica oleracea leaf juice on food borne pathogenic bacteria. *J. Food Protect.* 2006; 9: 2274 – 9.

32. Telci I, Demirtas I, Bayram E, Arabaci O, Kacar O. Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Trend. Food Sci. Technol.* 2010; 3: 558 - 92.

33. Murdock CA, Cleveland J, Matthews KR and Chikindas ML. The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2007; 3: 255 - 61.

34. Boziaris IS, Nychas and GJE. Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. *Food Microbiol*. 2006; 8: 779 - 84.

35. Karina P, Julio C, Leda G and Noemi Z. Behavior of *Listeria monocytogenes* type 1355/98 (85) in meat emulsions as affected by temperature, pH, water activity, fat and microbial preservatives. *Food Control* 2011; 10: 1573 – 81.

36. Mastronicolisa SK, Bouraa A, Karaliotab A, Magiatisc P, Arvanitisa N, Litosb C, Tsakirakisa A, Paraskevasa P, Moustakaa H and Heropoulos G. Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*: Focus on neutral lipids. *Food Microbiol.* 2006; 2: 184 - 94.

37. Xi Y, Sullivan GA, Jackson AL, Zhou GH and Sebranek JG. Use of natural antimicrobials to improve the control of *Listeria monocytogenes* in a cured cooked meat model system. *Meat Sci.* 2011; 3: 503 – 11.

38. Shabala L, Lee SH, Cannesson P and Ross T. Acid and NaCl limits of growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *J. Food Protect.* 2008; 71: 1169 – 77.