نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۷ شماره ۲/ سال۱۳۹۶/ صفحات ۱۸۹ تا ۲۰۲

اثراسانس گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) بر لاکتوباسیل‌های جدا شده از شکمبه گاو

ستاره نبی‌زاده اصل[۱] و رضا ولی‌زاده[*۲]

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲٤ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۲٤

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم‌دامی پردیس بین‌الملل دانشگاه فردوسی مشهد و عضو هیات علمی گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن

[۲] استاد گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

[*] مسئول مکاتبه: Email: Valizadeh@um.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: اسانس برخی گیاهان فعالیت ضد میکروارگانیزمی دارد. **هدف:** این تحقیق به منظور بررسی اثر اسانس گیاه نعناع فلفلی بر لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از شکمبه گاو به منظور مطالعه امکان کنترل اسیدوز از طریق کاهش این میکروارگانیزم‌ها انجام شد. **روش کار:** نمونه مایع شکمبه از شکمبه گاوهایی که با جیره حاوی ٦٥٪کنستانتره و ۳۵ ٪ علوفه تغذیه شده بودند جمع‌آوری و صاف گردید. به‌منظور جداسازی لاکتوباسیلها در سطح جنس از محیط اختصاصی MRS استفاده گردید و انتخاب کلنی‌ها بر اساس اندازه و مورفولوژی و تست‌های کاتالاز و اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم انجام گرفت. سپس تست‌های بیوشیمیایی تخمیر قندها و هیدرولیز آرژنین و تولید CO_2 از گلوکز انجام شد. به منظور بررسی تأثیر اسانس نعناع فلفلی بر لاکتوباسیل‌های جداسازی شده و *لاکتوباسیلوس پلنتارم* ابتدا اسانس گیاه بوسیله دستگاه کلونجر استخراج شد و سپس اثر آن به کمک روش ایجاد حلقه در آگار و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد انجام گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل ١٦ گونه لاکتوباسیلوس بود که در معرض غلظت ثابتی از اسانس خالص نعناع فلفلی وآب مقطر (شاهد) قرار گرفتند. **نتایج:** تعداد ٣٦ کلنی مربوط به جنس لاکتوباسیلها جداسازی و شناسایی گردید که در۱۵گروه در سه طبقه تقسیم بندی شدند. لاکتوباسیل‌های هتروفرمنتیتیو با ۵۸٪ فراوانی بیشتری نسبت به لاکتو باسیل‌های هموفرمنتیتیو با ٤٢٪ داشتند. اسانس نعناع بر تمام باکتری‌های آزمایش شده اثر مهاری داشت. **نتیجه گیری نهایی:** اسانس گیاه نعناع فلفلی اثر معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۵$) بر کاهش رشد لاکتوباسیل‌ها در محیط آزمایشگاه داشت.

واژگان کلیدی: اسانس، شکمبه، لاکتو باسیلوس، نعناع فلفلی

مقدمه

گیاهان مجموعه گسترده‌ای از ترکیبات آلی را به عنوان متابولیت ثانویه تولید می‌کنند. اغلب این ترکیبات فعالیت آنتی‌میکروبیال برباکتریها، مخمرها و قارچ‌ها دارند (کالسامگلیا و همکاران ۲۰۰۷).

گونه‌های گیاهی مانند نعناع، آویشن، مرزنجوش، مرزه، رزماری و مریم‌گلی حاوی ترکیبات آروماتیک هستند که علاوه بر عطر و بوی مطلوب خاصیت ضد میکروبی بالایی دارند (مارینو و همکاران ۱۹۹۹ و تاسو و همکاران ۲۰۰۰). نعناع (منتا) از جمله گیاهان شاخص دارویی است و مصارف وسیعی در صنایع دارویی و بهداشتی دارد (میر حیدر ۱۳۷۲). در بیشتر دارونامه‌های چاپ شده از میان گونه‌های نعناع گونه *(منتا پیپریتا)* به سبب دارا بودن ترکیب منتول دارای اثرات دارویی زیادی است و اسانس آن هم خواص ضدمیکروبی دارد (کلارک و همکاران ۱۹۹۸). تیلور (۱۹۹۳) نعناع فلفلی[1] از خانواده نعناع را به عنوان منبع غنی از اسانس‌های روغنی که اثرات ضد باکتریایی دارد معرفی نمود. اسانس نعناع فلفلی از سرشاخه‌های گلدار گیاه با روش تقطیر تولید می‌گردد که در حالت تازه بی‌رنگ است و طعم تندی دارد ولی به مرور زمان رنگ آن زرد مایل به سبز می‌شود (ایوانس ۱۹۹٦). گوئدون و پاسکوئر (۱۹۹٤) اجزاء و ترکیبات اصلی نعناع فلفلی را بررسی نمودند. گیاه نعناع رشد کرده در اروپا حاوی ترکیباتی چون منتول (٪۲۰) و متیل استات (۱۰ ٪) می‌باشد. بوی خاص نعناع فلفلی احتمالا به دلیل وجود همین ترکیب منتول است. وجود ترکیبی به نام سارفورال (۲تا ۳٪) نیز در اسانس نعناع گزارش شده است (بائر ۱۹۹۰). اسیدوز به‌عنوان یک بیماری متابولیکی و تغذیه‌ای در نشخوارکنندگان به دو حالت تحت بالینی و بالینی دیده می‌شود و در هر دو حالت بویژه نوع بالینی تعادل طبیعی میکروبی شکمبه دچار تغییرات نامطلوب می‌شود (شریفی و خادم ۱۳۹۱).

عوامل مختلفی باعث برهم خوردن تعادل میکروبی اکوسیستم شکمبه می‌شود، اما مصرف مقادیر زیادی کربوهیدرات سهل‌الهضم بدون ایجاد عادت‌پذیری مورد نیاز عامل اصلی گزارش شده است. باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک به عنوان بخشی از میکروارگانیزم‌های شکمبه پیوسته در این عضو حضور دارند (داوسون و آلیسون ۱۹۸۸). اما جمعیت آنها در مقایسه با جمعیت باکتریهای تولیدکننده اسیدهای چرب فرار شاخص محدود است. فراهمی مقادیر زیادی نشاسته و کاهش pH باعث ترغیب شدید باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک می‌گردد (دهوریتی ۲۰۰۳). و از بین آن‌ها معمولاً به لاکتوباسیل‌ها و استرپتوکوک‌ها به عنوان باکتری‌های شناخته شده تخمیرهای غیر نرمال اشاره می‌شود. رشد این تیپ باکتری‌ها با تغذیه رژیم‌های حاوی کنستانتره بالا مرتبط می‌باشد (داوسون و آلیسون ۱۹۸۸). شناخت جمعیت میکروبهای تولید کننده اسیدلاکتیک و عوامل موثر بر رشد آن می‌تواند متخصصان تغذیه را در جلوگیری از بروز اسیدوز بویژه تحت بالینی کمک کند (یانکه و چنج ۱۹۹۸). یکی از راه‌های جلوگیری از بروز اسیدوز و پایدار نمودن تخمیر، کنترل فعالیت لاکتوباسیل‌هایی است که عامل تولید لاکتات می‌باشند (شریفی و خادم ۱۳۹۱). لاکتوباسیل‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک شکمبه تحمل کمی در مقابل اکسیژن دارند و معمولا تنها در شرایط بیهوازی می‌توانند رشد کنند (یانکه و چنج ۱۹۹۸). برلیانت و همکاران (۱۹۵۸) تعداد ۹ سویه از باکتریهای میله‌ای شکل گرم مثبت با مشخصات غیر هاگزا، غیر متحرک، با اندازه (عرض ۰/۵-۰/۷و طول ۱/۸-٦۰ میکرومتر) که در رنگ‌آمیزی گرم به صورت زنجیره‌هایی از باسیل‌های گرم متغیر ظاهر می‌شوند را از شکمبه گوساله‌ها جدا نمودند. مشخصه دیگر این باکتریها عدم توانایی هیدرولیز نشاسته بود. بر اساس این خصوصیات و توانایی تخمیر قندها این باکتری‌ها

[1]- *Pepermint*

خیلی شبیه به ارگانیسم ۱۲۳ بودند که قبلا بوسیله مان و اکسفورد (۱۹۵٤) جداسازی و به عنوان یک سویه از *لاکتوباسیلوس لاکتیس* طبقه بندی شده بودند (دهوریتی ۲۰۰۳). حضور و فراوانی این گروه از باکتری‌ها به شدت تابع نوع قند مصرفی می‌باشد (شریفی و خادم ۱۳۹۱). شارپ و همکاران (۱۹۷۳) لاکتوباسیل‌هایی را جداسازی نمودند و آن‌ها را با سویه‌هایی که برایانت و همکاران (۱۹۵۳) جداسازی نموده بودند مقایسه کردند و دو گونه جدید *لاکتوباسیلوس ویتولینوس* و *رومینیس* را معرفی نمودند (دهوریتی ۲۰۰۳).

دهوریتی (۱۹۷۵) یک سویه لاکتوباسیلوس‌ها را از گوزن شمالی آلاسکا جداسازی نمود که شباهت زیادی به *لاکتو باسیلوس ویتولینوس* داشت. تاکنون چندین پژوهش توسط هانگیت و همکاران (۱۹۵۹)، ورنری و ونسوت (۱۹۹۲) و هرناندز و همکاران (۲۰۰۸) برای شناسایی خصوصیات فیزیولوژیکی و ژنتیکی باکتریهای مولد لاکتات در شکمبه نشخوارکنندگان انجام شده و باکتری‌های مختلفی شناسایی شده‌اند. پژوهشگران علاقمند به تعدیل رقابت بین جمعیت‌های میکروبی مختلف در شکمبه می‌باشند که می تواند از طریق بهینه کردن فرمول رژیم غذایی و کاربرد افزودنی‌های غذایی مختلف نیز انجام شود (کالسامگلیا و همکاران ۲۰۰۷). به طور کلی شکمبه محیط مناسبی را برای گسترش و تکثیر میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌نماید .این شرایط شامل رطوبت، دما، محیط بی‌هوازی، فشار اسمزی و pH می باشد. pH مطلوب جهت پایداری تخمیر نزدیک به خنثی (٦تا ۷) می‌باشد بنابراین افزایش اسیدیته شکمبه و بروز اسیدوز می‌تواند باعث به هم خوردن اکوسیستم شکمبه و بروز مشکلات زیادی شود (شریفی و خادم ۱۳۹۱). یکی از روش‌های جلوگیری از اسیدوز استفاده از بافرها می‌باشد که البته با مشکلاتی نیز همراه است. اضافه نمودن یونوفرها به جیره غذایی گاوها علاوه بر اثر سوء بر تولیدات شکمبه، باعث رشد لاکتوباسیل‌ها و در نتیجه بروز ادم ریه می‌گردد (یانکه و چنج ۱۹۹۸). از طرفی قالی و همکاران (۲۰۰٤) گزارشاتی کردند که تحت شرایط خاص تغذیه‌ای باکتری‌هایی مانند *لاکتو باسیلوس ویتولینوس* توانایی تولید لاکتات زیادی از خود نشان می‌دهند. متابولیت‌های ثانویه گیاهی که عموما در سه دسته تانن‌ها، ساپونین‌ها و اسانس‌ها تقسیم‌بندی می‌شوند را می‌توان به عنوان افزودنی‌های تعدیل‌کننده محیط شکمبه استفاده نمود. اثر تانن‌ها و ساپونین‌ها بر تخمیر میکروب‌های شکمبه به‌طور گسترده بررسی شده است ولی اطلاعات در مورد اثر اسانس‌ها بر عملکرد میکروبی شکمبه محدود است (کالسامگلیا و همکاران ۲۰۰۷). در این تحقیق تلاش شد تا لاکتوباسیلوس‌های شکمبه جداسازی شوند و اثر اسانس گیاه نعناع فلفلی بر آنها با هدف کنترل مناسب تخمیر در شرایط مصرف مقادیر زیاد کربوهیدرات‌های سهل‌الهضم مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد وروش‌ها

تهیه اسانس نعناع فلفلی

گیاه نعناع فلفلی از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد جمع‌آوری گردید. مواد گیاهی جمع آوری شده در اتاق تاریک و دور از نور مستقیم خورشید خشک گردید و پس از خرد و پودر شدن مواد خشک شده در داخل نایلون‌های زیپ‌دار بسته‌بندی گردید. برای تهیه اسانس مقدار ۵۰ گرم از این پودر داخل بالن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و تقریبا تا ۲/۳ حجم بالن آب اضافه گردید. اسانس‌گیری با روش تقطیر با آب[1] به مدت ٤ ساعت با دستگاه کلونجر انجام شد و آبگیری اسانس استخراج شده توسط سولفات سدیم بدون آب انجام شد و در ظرف شیشه ای تیره دور از نور و در دمای پایین (٤درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید (گلستان‌نژاد و همکاران ۱۳۹۳).

[1]- Hydrodistilation

جدا سازی لاکتوباسیل‌ها از مایع شکمبه

مایع شکمبه از شکمبه گاو مجهز به فیستول دائمی که با جیره حاوی ٦٥ درصد کنستانتره نسبت به علوفه (٪۳۵) تغذیه شده بود قبل از تغذیه صبحگاهی جمع‌آوری گردید. .پس از انتقال مایع شکمبه به آزمایشگاه مقدار ٥ گرم از محتویات شکمبه با ٤٥ میلی لیتر محلول ADS[1] مخلوط گردید. این محلول با استفاده از پارچه دولایه و تکنیک بی‌هوازی هانگیت و اصلاح شده توسط بریانت و بورکی (۱۹۵۳) صاف شد (بریانت ۱۹۵۳ و یانکه و چنج ۱۹۹۸). از آخرین رقت تهیه شده مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول حاوی باکتری به لوله‌های استریل محتوی محیط کشت مخصوص برای لاکتوباسیل‌ها یعنی MRS[2] مایع که با ۱ میلی لیتر نشاسته ٥٪ وزنی- حجمی مخلوط گریده بود، اضافه شد. لوله‌های آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت در شرایط بی‌هوازی با استفاده از جار بیهوازی و گاز پک نوع A انکوبه گردید. پس از گذشت ٤٨ ساعت از گرماگذاری کشت‌ها، مقدار ۱ میلی لیتر از هر یک از لوله‌های آزمایش برروی پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS آگار استریل به صورت یکنواخت کشت داده شد و به مدت ٤٨ ساعت در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس شناسایی و انتخاب چشمی کلنی‌های متفاوت از لحاظ خصوصیات ظاهری نظیر اندازه و مورفولوژی کلنی و رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز و اکسیداز (فضلی بزاز ۱۳٦۷) انجام و خالص سازی کلنی‌های انتخاب شده توسط کشت خطی روی محیط MRS آگار تا رسیدن به تک کلنی انجام گرفت. عملیات خالص‌سازی در سه مرحله انجام گرفت (هاریگان ۱۹۹۸، بنسون ۲۰۰۲ و عبدی و همکاران ۲۰۰٦).

آزمایشات بیوشیمیایی و تکمیلی جهت شناسایی ایزوله های جداشده از مایع شکمبه گاو

جهت شناسایی جنس‌های لاکتوباسیل‌های ایزوله شده از آزمون‌های بیوشیمیایی تخمیر کربوهیدرات‌ها بر اساس کتاب راهنمای برجی استفاده شد (وایتمن ۲۰۰۹) و نتایج بدست آمده با خصوصیات بیوشیمیایی هرگونه در کتاب راهنمای برجی مطابقت داده شد کلنی‌های خالص‌سازی شده متشکل از باکتری‌های میله‌ای شکل گرم مثبت، کاتالاز و اکسیداز منفی جهت انجام رشد در دماهای ۱۰ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد و غلظت‌های ٦/٥ و ۱۸ درصد کلرور سدیم و pHهای ۹/٦ و ٤/٤ بر روی محیط MRS آگار بررسی شد. همچنین جهت تشخیص همو و هترو فرمنتیتیو بودن لاکتوباسیل‌ها تولید گاز CO_2 از قند گلوکز در محیط MRS اصلاح شده بوسیله لوله دورهام وبرای تشخیص باکتری مصرف‌کننده آرژنین هیدرولیز آرژنین در محیط ردی‌براث بررسی شد (سالمینن و همکاران ۲۰۰٤). آزمون بیوشیمیایی تخمیر کربوهیدرات‌ها جهت تعیین پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها با استفاده از محیط پایه (فنل رد براث) انجام شد هر یک از قندها با غلظت ۱درصد به محیط کشت پایه استریل اضافه گردید و سپس تلقیح باکتری صورت گرفت نتایج بعد از ۷۲ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثبت گردید (پوراحمد و اسدی ۲۰۰۷).

بررسی تأثیر اسانس نعناع فلفلی بر لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از شکمبه و سویه استاندارد لاکتوباسیلوس پلنتارم

ابتدا سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/٥ مک‌فارلند از هر یک از نمونه‌های میکروبی مورد آزمایش (۱٥ گونه لاکتوباسیل ایزوله شده از شکمبه و سویه استاندارد لاکتوباسیلوس پلنتارم) تهیه شد و در محیط MRS آگار استریل با روش ایجاد حلقه در آگار کشت گردید (فضلی بزاز ۱۳٦۷). در مرحله بعد حدود ۱۰ میکرو لیتر اسانس نعناع فلفلی (آب مقطراستریل به عنوان شاهد استفاده شد) به هر یک از چاهک‌ها توسط سمپلر استریل اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای

[1]- Anaerobic Dilution Solution
[2]- Deman Rogosa, sharpengar

۳۷ درجه سانتی‌گراد به منظور بررسی هاله مورد نظر انکوبه شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ گونه لاکتوباسیلوس (شامل ۱۵ گونه جداسازی شده از شکمبه و یک گونه استاندارد) با سه تکرار اجرا شد. هر یک از تیمارهای آزمایش در معرض غلظت ثابتی از اسانس نعناع فلفلی خالص قرار گرفتند. ضمناً برای هر تیمار آب مقطر استریل بعنوان شاهد با سه تکرار در نظر گرفته شد. از آنجایی که تفاوت بین تیمارهای شاهد ناچیز بود میانگین آنها به عنوان شاهد عمومی آزمایش در تجزیه آماری به کار گرفته شد. نتایج با استفاده از مدل عمومی خطی (GLM) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (معادله ۱).

$$Y_{ij} = \overline{X}_{00} + T_0 j + \varepsilon ij \qquad (1)$$

که در آن:

Y_{ij} : مشاهده تکرار i از تیمار j

$T_0 j$: T0 از تیمار j

ε_{ij} : خطای برآورد

در نهایت میانگین‌های به هر باکتری با تیمار شاهد از طریق آزمون دانت مورد مقایسه قرار گرفت.

کلیه تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم افزار Minitab ver.17 انجام شد.

نتایج و بحث

از هر ۱۰۰ گرم برگ و ساقه خشک گیاه نعناع ۱ میلی لیتر اسانس استخراج گردید که بازده وزنی- حجمی آن تقریبا یک در صد محاسبه گردید. اسانس حاصل از نعناع فلفلی دارای بوی تند نعناع و به رنگ زرد کم‌رنگ بود جهت جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل‌های شکمبه کلنی‌های تشکیل شده روی پلیت‌های MRS آگار در محدوده ۳۰۰-۳۰۰ کلنی بررسی گردید. از لحاظ مورفولوژیکی کلنی‌های مختلفی بر روی محیط MRS آگار قابل مشاهده بود. کلنی‌ها در اندازه‌های بسیار کوچک تا کوچک و متوسط و به رنگ‌های سفید تا زرد و با قوام صاف براق و مات قابل مشاهده بودند. با توجه به شکل کلنی‌های جنس لاکتوباسیل‌ها کلنی‌هایی با اندازه بین ۵-۲ میلی‌متر با لبه‌های صاف و سطح محدب با قوام صاف براق و یا مات انتخاب شدند (بریت هاپت ۲۰۰۱). کلنی‌های انتخاب شده جهت رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز و اکسیداز مورد بررسی قرار گرفتند که از میان ۷۰ کلنی بررسی شده تعداد ۳۶ کلنی از باکتری‌های گرم مثبت میله‌ای شکل، اکسیداز و کاتالاز منفی تشکیل شده بودند که جهت خالص‌سازی انتخاب گردیدند (وایتمن ۲۰۰۹). خصوصیات رشد لاکتوباسیل‌های شناسایی شده در جدول ۱ ارائه گردیده است. باتوجه به تعداد کل کلنی‌های تشکیل شده حدود ۳٤٪/۲ از کلنی‌ها متعلق به جنس لاکتوباسیل‌ها محاسبه گردید که تا حدودی مطابق با نتایج یانکه و چنج (۱۹۹۸) می‌باشد.

یانکه و چنج (۱۹۹۸) مشخص نمودند که حدود ۱۵ درصد از کل باکتری‌های شکمبه گاوها لاکتوباسیل‌ها و استرپتوکوکوس بویس می باشند مقایسه‌ای که بین محیط کشت MRS در شرایط هوازی و بیهوازی انجام دادند مشخص شد که در حالت هوازی جمعیت کلی باکتریهای تولید کننده اسیدلاکتیک بسیار کاهش یافت و تنها استرپتوکوک‌ها (۱۳٪) و لاکتوباسیل‌ها (۸۷٪) قادر به رشد بودند و کلنی‌های ایجاد شده به شکل اصلی نیز نبودند در صورتی‌که در شرایط بیهوازی جمعیت این باکتریها افزایش نشان داد و جمعیت لاکتوباسیل‌ها نسیت به سایر باکتریهای تولید کننده اسیدلاکتیک با ۳٤٪ بعد از جمعیت ٤۸٪ سلنومونا‌س‌ها بالاترین تعداد را به خود اختصاص داده بودند. باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم مثبت کاتالاز منفی که در دماهای ۱۰ و ٤۵، pH های ٤/٤ و ۹/٦ و غلظت‌های ٦/۵ و ۱۸ درصد کلرور سدیم توانایی رشد داشتند لاکتوباسیل‌های هومو و هتر فرمنتیتیو بودند (سالمینن و همکاران ۲۰۰٤ و عدالتیان و همکاران ۲۰۱۲). تولید گاز دی‌اکسید کربن از گلوکز و تجمع آن در لوله دورهام در محیط MRS آگار اصلاح شده نشان دهنده لاکتوباسیل‌های هتروفرمنتاتیو

بود (یانکه و چنج ۱۹۹۸) در آزمایش هیدرولیز آرژنین اگر باکتری مصرف کننده آرژنین باشد ابتدا به دلیل تولید اسید لاکتیک رنگ محیط زرد و سپس بر اثر تولید آمونیاک رنگ محیط بنفش می‌گردد (عدالتیان و همکاران ۲۰۱۲).

جدول۱- خصوصیات رشد لاکتوباسیل‌های ایزوله شده از شکمبه گاو

Table 1-Characteristics of growth of lactobacilli isolated from ruminal cattle

شماره باکتری Bacterial number	شرایط رشد / Growth conditions							
	۱۰˚C 10 ˚C	٤٥˚C 45 ˚C	pH=٤/٤ pH=4/4	pH=٩/٦ pH=9/6	کلوررسدیم ٦٪/٥ NaCl 6/5%	کلوررسدیم ١٨٪ NaCl 18%	تولیدCO_2 از گلوکز CO_2 production of glucose	هیدرولیز آرژنین Hydrogenase arginine
1	−	+	+	−	−	−	−	−
2	+	+	+	−	−	−	−	−
3	−	+	+	−	−	−	−	−
4	+	+	+	−	−	−	−	−
5	+	+	+	−	−	−	−	−
6	−	−	+	−	−	−	+	−
7	+	−	+	−	−	−	+	+
8	−	+	+	−	−	−	+	+
9	+	−	+	−	−	−	+	+
10	−	+	+	−	−	−	+	+
11	−	+	+	−	−	−	+	+
12	+	−	+	−	−	−	+	−
13	−	+	+	−	−	−	−	−
14	+	+	+	−	−	−	+	−
15	+	−	+	−	−	−	+	−
16	−	+	+	−	−	−	+	+
17	−	+	+	−	−	−	−	−
18	+	+	+	−	−	−	−	−
19	−	+	+	−	−	−	−	−
20	−	−	+	−	−	−	+	−
21	−	+	+	−	−	−	−	−
22	−	+	+	−	−	−	−	−
23	+	−	+	−	−	−	+	+
24	−	+	+	−	−	−	+	−
25	−	+	+	−	−	−	+	+
26	−	+	+	−	−	−	−	−
27	+	−	+	−	−	−	+	−
28	−	+	+	−	−	−	+	−
29	−	+	+	−	−	−	−	+
30	−	+	+	−	−	−	+	−
31	−	+	+	−	−	−	+	+
32	−	+	+	−	−	−	−	−
33	+	−	+	−	−	−	+	+
34	−	+	+	−	−	−	+	+
35	+	+	+	−	−	−	+	−
36	−	+	+	−	−	−	−	−

جدول ۲- توانایی تخمیر کربوهیدرات ها توسط لاکتوباسیل‌های ایزوله شده از شکمبه گاو

Table 2-Ability to fertize carbohydrates by lactobacilli isolated form the rumen of cattle

Isolated bacterial number شماره باکتری ایزوله شده	Carbohydrate type نوع کربوهیدارت											
	Manitol	Mannose	Trehalose	Sorbitol	Raffinose	Maitose	Melibiose	Sucrose	Cellobiose	Lactose	Arabinose	Galactose
1	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-	+
2	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-	+
3	-	+	-	ND	+	+	+	+	+	+	-	+
4	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-	+
5	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	ND	+
6	+	−	ND	-	-	ND	-	+	-	−	+	−
7	-	-	-	ND	+	+	+	+	-	+	+	+
8	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	-	-	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	ND	+	−	+	+	−	+	+	+
11	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	−	ND	−	−	−	−	−	−	−	-	ND
13	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-	+
14	+	−	−	+	−	−	−	+	+	ND	+	ND
15	+	−	−	ND	+	+	+	+	+	+	+	−
16	−	-	-	ND	+	−	+	+	−	+	+	+
17	-	+	+	ND	−	+	−	+	+	−	-	+
18	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-	+
19	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-	+
20	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−
21	-	+	+	ND	+	−	+	+	+	+	-	+
22	-	+	-	ND	+	+	+	+	+	+	-	+
23	ND	-	-	ND	+	+	+	−	+	+	+	+
24	+	−	−	ND	+	−	+	+	−	−	+	−
25	ND	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
26	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-	+
27	+	−	−	ND	+	ND	+	+	+	ND	+	−
28	−	-	-	ND	+	−	+	+	−	+	+	+
29	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-	+
30	+	−	−	ND	+	ND	+	+	−	−	+	−
31	−	-	-	ND	+	−	+	+	−	+	+	+
32	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-	+
33	−	-	-	ND	+	+	+	+	−	+	+	+
34	−	-	-	ND	+	−	+	+	−	+	+	+
35	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	−
36	-	+	-	−	+	+	+	+	+	+	-	+

با توجه به مطالب فوق و بنابر نتایج بدست آمده در جدول ۱ می‌توان نتیجه گرفت که ۳٦ کلنی خالص شده متعلق به جنس لاکتوباسیل‌ها بود و لاکتوباسیل‌های هتروفرمنتیتیو با ۵۸ درصد تعداد بیشتری نسبت به لاکتوباسیل‌های هموفرمنتیتیو (٤۲٪) در شکمبه داشتند این نتیجه با نتایج سایر منابع که تأکید می‌کنند اکثر گونه‌های ایزوله شده از شکمبه از نوع هتروفرمنتیتیو هستند مطابقت دارد (دهوریتی، ۲۰۰۳ و شریفی و خادم ۱۳۹۱).با توجه به نتایج جداول ۱و۲ و مقایسه آن با کتاب راهنمای برجی ۳٦ لاکتوباسیل جدا شده در ۱۵ گروه طبقه‌بندی شدند. این ۱۵ گروه نیز در سه طبقه A، B و C تقسیم شدند (جدول ۳).

در جدول ٤ قطر هاله عدم رشد باکتری تحت تأثیر بکار بردن اسانس نعناع فلفلی آورده شده است. لازم به ذکر است که برای هرپلیت آب مقطر استریل به عنوان شاهد با سه تکرار در نظر گرفته شد از آنجا که تفاوت بین تیمارهای شاهد ناچیز بود میانگین آنها به عنوان شاهد عمومی در تجزیه آماری به کار رفت (جدول ٤).

جدول ۳- دسته بندی لاکتوباسیل های ایزوله شده از شکمبه گاو

Table 3-The classification of lactobacilli isolated the rumen of cattle

گروه Group	شماره لاکتوباسیل ها بر اساس جدول ۲ Lactobacillus number table 2	گروه (A,B,C) لاکتوباسیل‌ها Lactobacillus group(A,B,C)
1	1, 13, 21, 26, 32	لاکتوباسیل‌های هموفمنتیتیو اجباری گروهA Obligate homofermentative lactobacillus Group A
2	2, 4, 5, 18	
3	3, 22, 29, 36	
4	17	
5	19	
6	20, 6	لاکتوباسیل‌های هتروفرمنتیتیو اختیاری گروهB Facultative hetrofermentative lactobacillus Group B
7	12	
8	14, 35	
9	15, 27	
10	24, 30	
11	7, 23	لاکتوباسیل‌های هتروفرمنتیتیو اختیاری گروهC Facultative hetrofermentative lactobacillus Group C
12	8	
13	9, 33	
14	10, 16, 28, 31, 34	
15	11, 25	

جدول۴- میانگین (mm) وانحراف معیار قطر هاله عدم رشد ناشی از اثر اسانس نعناع فلفلی و شاهد (آب مقطر) بر لاکتوباسیل‌های جداشده از شکمبه گاو

Table 4-Mean (mm) and standard deviation of the inhibition zone caused by the effect of *Mentha piperita* essential oil and control (distilled water) on lactobacilli isolated from the rumen of the cattle

شماره گروه باکتری Bacterial group number	میانگین قطر هاله عدم رشد(mm) اسانس Meam diameter (mm) of the no growth zone essential	میانگین قطر هاله عدم رشد(mm) شاهد Meam diameter (mm) of the no growth zone countrol	شماره گروه باکتری Bacterial group number	میانگین قطر هاله عدم رشد(mm) اسانس Meam diameter (mm) of the no growth zone essential	میانگین قطر هاله عدم رشد(mm) شاهد Meam diameter (mm) of the no growth zone countrol
1	14±1/3	7/4۰ ± /48	9	22۲±/۴	7/7۰ ± /23
2	16±2/1	7/2۰ ± /22	10	21۱±/۴	7/0 ± 0/81
3	15±2/1	7/8۰ ± /23	11	21۳±/۳	7/5۰ ± /00
4	17±3/1	7/5۰ ± /4	12	15۱±/۳	7۰ ± /81
5	19±2/8	7/3۰ ± /48	13	17۳±/۱	6/7۰ ± /81
6	24±4/4	7۰ ± /81	14	14۲±/۸	7/5۰ ± /4
7	17±2/5	7/4۰ ± /46	15	17۱±/۴	7/5۰ ± /01
8	18±1/3	7/7۰ ± /24	*Lactobacillu splntarum* سویه استاندارد	22۲±/۴	7/3۰ ± /48

بنابر نتایج بدست آمده در جدول ٤ میانگین‌های مربوط به هر باکتری با تیمار شاهد از طریق آزمون دانت براساس سطح احتمال معنی‌داری مورد مقایسه قرار گرفت. کلیه تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم افزار Minitab ver.17 انجام شد. با توجه به سطح معنی‌داری که عددی کوچکتر از ۰/۰۵ می باشد. تمام لاکتوباسیل‌های ایزوله شده نسبت به اسانس نعناع حساس بودند و البته بعضی گونه‌ها حساس‌تر بودند. در پژوهش انجام شده توسط گلستان‌نژاد و همکاران (۲۰۱٤) اثر اسانس نعناع برسه نوع لاکتوباسیل شامل *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پلنتارم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بررسی شد و مشخص گردید اسانس نعناع بر هر سه گونه موثر است اما اثر آن برگونه *لاکتوباسیلوس کازئی* بیشتر بود.

در تحقیقی که توسط سی و همکاران (۲۰۰٦) انجام گرفت اثر ضد میکروبی ۹ جزء از اسانس‌های گیاهی برروی لاکتوباسیل‌های ایزوله شده از خوک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلنتارم*) مشخص گردید که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به طور قابل توجهی با کارواکرول و سینامون و تیمول مهار می شود به‌علاوه دو ایزوله لاکتوباسیلوس پلنتارم نسبت به اجزاء اسانس‌های بررسی شده بسیار مقاوم تراز *لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس* بودند و کارواکرول، سینامون فقط در غلظت‌های بالا اثر مهارکنندگی بر لاکتوباسیل‌ها داشت. اما مجموع لاکتوباسیل‌ها نسبت به باکتری‌های بیماریزا حساسیت کمتری نسبت به اسانس‌ها داشتند. ایسکان و همکاران (۲۰۰۲) مشخص نمودند که اسانس نعناع تأثیر بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی دارد. چائو و یونگ (۲۰۰۰) مکانسیم فعالیت اسانس‌ها بر ضد باکتری‌های گرم مثبت را واکنش مستقیم غشاء سلولی با ترکیبات هیدروفوبیک اسانس‌ها دانستند. کوکس و همکاران (۲۰۰۱) وسیمانگا و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که دیواره سلولی خارجی اطراف غشای سلولی باکتری‌های گرم منفی هیدروفیلیک است و امکان ورود مواد لیپوفیلیک را نمی‌دهد. بیشتر ترکیبات اسانس‌ها مانند مونسین لیپوفیلیک هستند و نمی‌توانند به غشاء باکتریهای گرم‌منفی نفوذ کنند البته غشاء بیرونی باکتریهای گرم‌منفی به طور کامل نسبت به مواد هیدروفوبیک نفوذناپذیر نیست و ملکول‌های با وزن پایین می‌توانند در آن نفوذ کنند. به‌طورکلی ترکیبات فعال ضدمیکروبی اسانس‌ها ترپن‌ها نظیر اوژنول، تیمول و کارواکرول می باشند که ماهیت فنولی دارند بویژه خاصیت ضد میکروبی اسانس نعناع که توسط تاسو وهمکاران (۲۰۰۰) بررسی شد نشان داد که این خاصیت به علت وجود منتول و کتونها مانند پولگون، پیپریتون، کاروون و دهیدروکارون می باشد. در بررسی‌های بیوچت و گلدن (۱۹۹۸) نیز در مورد اسانس گیاهان خانواده نعناع تیمول، کارواکرول، منتول و پاراسیمن مهمترین اجزاء اسانس هستند که خاصیت ضدمیکروبی دارند.

با توجه به دانستن این موضوع که کنترل فعالیت لاکتوباسیل‌ها و سایر باکتری‌های تولید کننده لاکتات می‌تواند از بروز اسیدوز جلوگیری کند و تخمیر را پایدارتر نماید (شریفی و خادم ۱۳۹۱) ،شاید بتوان با اضافه نمودن مواد مهارکننده رشد لاکتوباسیل‌ها از ایجاد اسیدوز و پیامدهای آن جلوگیری نمود. اما این مهم نیازمند تحقیقات فراوان است تا جنبه کاربردی و مزرعه‌ای پیدا کند. اسانسها فعالیت آنتی‌میکروبیال قوی دارند و ترپنوئیدها و فنیل پروپانوئیدها فعالیت‌شان را بر ضدباکتری‌ها در واکنش با غشاءسلولی ایجاد می‌کنند (گریفین و همکاران ۱۹۹۹) این مسئله به دلیل ماهیت هیدروفوبیک هیدرو کربن‌های حلقوی است که به آنها امکان واکنش باغشاءهای سلولی و تجمع در غشاء فسفولیپیدی باکتری را می‌دهد در واقع این ترکیبات فضای بین دو لایه لیپیدی غشاءرا پر می‌کند ودر نتیجه باعث از دست رفتن پایداری غشاء ونفوذ یونها از غشاء می‌شود (سیکما و همکاران ۱۹۹٤ و اولته و همکاران

۱۹۹۹). گریفین و همکاران (۱۹۹۹) واولته و همکاران (۱۹۹۹) و کوکس و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که در مواردی باکتریها می‌توانند این اثرات را بوسیله پمپ‌های یونی خنثی کنند و در نتیجه مانع مرگ سلولی شوند ولی میزان زیادی از انرژی سلول به این فعالیت معطوف می‌شود و رشد باکتری کند می‌گردد. دی پاسکوآ و همکاران (۲۰۰۶) مشخص نمودند که اسانس‌ها به دلیل ماهیت روغنی‌شان قادر به عبور از غشاءهای سیتوپلاسمی بوده و با اختلال در ساختمان پلی‌ساکاریدها، اسیدهای چرب و فسفولیپیدها سبب اختلال در عملکرد عوامل میکروبی می‌شوند. گوستافسون وبوئن (۱۹۹۷) عملکرد ضد میکروبی دیگر اسانس‌ها راتغییر شکل پروتئین های سلولی میکروارگانیسم‌ها معرفی نمودند. همچنین مشاهدات زیادی در رابطه با توانایی ترکیبات فنولی و غیر فنولی اسانس‌ها در واکنش با پروتئین‌های و آنزیم‌ها ارائه شده است. ترکیبات آلدئیدی نیز ممکن است منجر به غیرفعال شدن پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شوند. ونداکن و ساکاگوچی (۱۹۹۵) مشخص نمودند که سینامون و اسانس میخک می‌توانند از فعالیت آنزیمی باکتری انتروباکتر آئروژینوزا ممانعت نمایند. با توجه به بومی بودن گیاه نعناع فلفلی در ایران و اثرات ثابت شده ضد میکروبی آن بخصوص بر باکتری‌های گرم مثبت مانند لاکتوباسیل‌ها شاید اضافه نمودن اسانس آن به غذای دام‌ها روش مناسبی برای جلوگیری از اسیدوز به عنوان یک بیماری متابولیکی شایع باشد.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی آنچه از انجام این آزمایشات حاصل شد اثر معنی‌دار اسانس نعناع فلفلی بر کاهش رشد باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک در محیط آزمایشگاهی بود. کاربرد این یافته‌ها در دام‌ها نیازمند تحقیقات بیشتر است به‌ویژه باید به این نکته توجه کرد که اصولاً اسانس‌ها فرار هستند و به همین دلیل امکان مخلوط کردن طولانی مدت آنها با مواد خوراکی بسیار محدود است. انجام آزمایشات بیشتر در خصوص نگهداری اسانس‌ها از جمله اسانس نعناع فلفلی در تغذیه عملی دام‌ها توصیه می‌گردد. آزمایشات در حیوانات، بر پایه این یافته‌ها می تواند هدایت کننده نتایج به سمت کاربردی کردن پیش رود.

سپاسگزاری

این طرح با حمایت دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد که بدینوسیله از این مساعدت تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

Abdi R, Schikh-Zeinoddin M and Soleimanian-Zad S, 2006. Identification of latic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan chesse.Pakistan Journal of Biological Sciences 9: 1.99-103.

Bauer K,GarbeD and Sarbarg H, 1990.Common fragrance and flavor materials. VCH Pulisheres, New York. Pp: 164.

Benson HJ, 2002. Microbiological application,a laboratory manual in general microbiology.Mc Graw-Hill Press. Boston.Pp: 120-135.

Beuchat LR and Golden DA, 1998. Antimicrobials naturally in foods. Food Technology11: 134-142.

Breithaupt DE, Wschwack W,WolfG and Hammes WP,2001. Characterization of the triterpenoid4,4'-diapone and its isomers in food associated bacteria. European Food Reaserch and Technology 213:231-233.

Bryant MP and Burkeyl A, 1953. Cultural methods and some characteritics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. Journal of Dairy Science 44:1449-1456.

Calsamiglia S, Busquet M,Cardozo PW, Castillejos L and Ferret A, 2007. Invited reviw: essential oils s modifiers of rumen microbial fermentation. American Dairy Science Asoociation 90:2580-2595.

Chao SC and Young DG, 2000.Screening for inhibitory activitly of essential oil on selected bacteria, fungi and viruses. Journal Essential Oil Research 12: 639-649.

Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, Bruyne T, Hermans N, Totte J, Pieters L and Vlietink AJ, 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal Ethnopharmacology 79: 213-220.

Clark IV, CameronGS and Stuart I, 1998. "An aroma chemical profile, menthol" perfumer and flavorist.MaryLand Press.Eastorn. Vol23, Pp: 33-46.

Cox SD, Mann CM and Markam JL, 2001.Interaction between components of the essential *oil of Melaleuca alternifolica.* Journal Applied Microbiology 91: 492-497.

DawSon KA and Allison MJ, 1988. Digestive disorders and nutritional taxicityIn the rumen microbial ecosystem. Hobson, p.v. (eds), Elsevier Applied science publishers Ltd. London. Pp: 445-459.

Deans SG and Ritchi G, 1997. Antibacterial properties of plant essential oils. International Journal of Food Microbiology10:165-180.

Dehority BA, 2003. Rumen microbiology. First edition, Nottingham univ, Nottingham, uk.Pp: 253-269.

Di Pasqua R, Hoskins V, BettsG and MaurielloG, 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carracrol, Limonene, Cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. Journal Agricalture Food Chemistry 54: 2745-2749.

Edalatian MR, Habibinajafi MB, Mortazavi A and Mayo B, 2012. The biodiversity and evolution of lactic flora duringripening of the Iranian semi-soft Lighvan cheese. International Journal of Dairy Technology 65(1):81-89.

Evans WC, 1996. Volatile oils and resins. Pp: 259-280. In: Evans WC (eds).Pharmacognosy.Eastorn, Maryland Press.

Fazly bazzaz BS, 1988. Pharmaceutical microbiology. Ed (4) Publication of medical Sciences, Mashhad P.p: 19-zz, 184, 186 (in Persian).

Ghali MB, ScottPT and Al Jassim RAM, 2004. Characterization of*Streptococcusbovis* from the rumen of the dromedary camel and Rusadeer.Letters in Applied Microbiology 39: 341–346.

Golestannejad Z, Yousefshahi H, Afshari A and Bazazzadeh M, 2014.The composition and concentration of Menthe spicata essential oil and its effect on *Lactobacillus plantarum,Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus*. Journal Dentistry Faculty of Isfahan University 10 (5): 322-324.

Griffin SG, Wyllie SG, Markham JL and Leach DN, 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavor Fragrance Journal 14: 322-332.

Guedon DJ and Pasguier BP, 1994.Analysis and distribution of flavonoid glycosides and rosmarinic acid in 40 *Menthapiperita*clones.Journal Agriculture and Food Chernistry 42: 679-684.

Gustafson RH and Bowen RE, 1997.Antibiotic use in animal agriculture. Journal Applied Microbiology 83: 531-541.

HarriganWF, 1998. Laboratory methods in food microbiology: Gulf professional publishing. editiotion. london, New york.

Hernandez D, Scott PT, Shephard RW and Al Jassim RAM, 2008. Thecharacterization of lactic acid producing bacteria from the rumen of dairy cattlegrazing on improved pasture supplemented with wheat and barley grain. Journal Applied Microbiology 104: 1754-1763.

Hungate RE, Phillips GD, McGregor A, Hungate DP and Buechner HK,1959. Microbial fermentation in certain mammals.Science 130: 1192–1194.

Iscan G, Kirimer U, Kurkcouglu U, Husnu U, Canbaser K and Demirici F,2002. Antimicrobial screening of*Menthapiperita*essential oils.Journal of Agricultural food Chemistry 50:3943-3946.

Marino M, Bersani C and Comi G,1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymusvulgaris* measured using a bioimpedo-metric method.Journal of food Protrection 62:1017-1023.

Mirheydar H, 1993. Plant sciences. Publications office of culture and Islamic publication. Vol 1, Pp: 288—294. (in perssan).

Pourahmad R and Assadi MM, 2007. Use of isolated autochthonous Starter cultures in yogurt. Production. International Journal of Dairy Technology 60:259-262.

Salminen S, Von Wrigh A and Ouwehand A, 2004. Lactic acidbacteria: Microbiology and funetional aspects. CRC Press, Marcel DeKKer, New york. Pp: 73-103.

Si W, Gong J, Taso R, Zhou T, Yu H, Poppe C, Johmson R and Du Z, 2006. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. Journal of Applied Microbiology 100:296-305.

Sharify M and Khadem AA, 2012. Ruminants and Dynamic Rumen. Danesh negar.Pp: 154-155. (in perssan)

Sikkema J, DeBont JA and Poolman B, 1994.Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. Journal Biological Chemistry 269: 8022-8028.

Tassou C, Koutsoumaris K and Nychas GJE, 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylocococcusaureus* in nutrient broth by mint essential oil. Food Research, International 33: 273-280.

Tylor VE, 1993. Thehonest herbal. Pharmacentrial Products press.

Ultee A, Kets EP and Smit EJ, 1999.Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied Environmental Microbiology 65: 4606-4610.

Wendakoon CN and Sakaguchi M, 1995.Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. Journal Food Protection 58: 280-283.

Wernery U and Wensvoort J, 1992. Experimentally induced rumen acidosis in a 1-year-old camel bull (*Camelusdromedarius*) a preliminary report. British Veterinary Journal 148: 167–170.

Whitman WB, 2009.Lactobacillales. Pp. 465-532. In: Whitman WB (eds). Bergy's manual of Systematic bacteriology.Spriger, New york, London.

Yanke LJ and Cheng KJ, 1998. A method for the selective enumeration and isolation of ruminal Lactobacillus and Streptococcus. Journal Applied Microbiology 26:248-252.

Effect of *Menth piperita* essential oil on bovin ruminal isolated Lactobacillus

S Nabizadeh Asl[1] and R Valizadeh[2*]

Received: June 13, 2016 Accepted: August 14, 2016
[1]PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad International Campus, Mashhad, Iran and Member of Scientific Bord, Department of Biology, Basic Science Faculty, Roudehen, Islamic Azad University, Roudehen, Iran
[2]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[*]Corresponding author email: Valizadeh@um.ac.ir

Introduction: Plants produce a wide variety of organic compounds as metabolites derived from the secondary metabolism. Some plants are sources of several types of essential oil. Essential oils often have antimicrobial activity against a wide range of bacteria, yeasts and molds. Carvacrol, a terpene found in oregano oil, inhibits the growth of several bacteria strains including *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. Another example of essential oils is thymol, isomeric with carvacrol and found in oil of the common spice thyme. Thymol is part of a naturally occurring class of compounds know as biocides. An essential oil is a concentrated hydrophobic liquid containing volatile aroma compounds from plants. Essential oils are also known as volatile oils. Essential oils are usually lipophilic compounds that usually are not miscible with water. They can be diluted in solvents like pure ethanol and polyethylene glycol. Lactobacillus is a genus of Gram-positive, facultatively anaerobic or microaerophilic, rod-shaped, non-spore forming bacteria. They are a major part of the lactic acid bacteria group that convert sugars to lactic acid. Lactobacillus has many species. Many lactobacilli operate using homofermentative metabolism (they produce only lactic acid from sugars), and some species use heterofermentative metabolism (they can produce either alcohol or lactic acid from sugars). Lactobacilli are catalase negative lactic acid bacteria. Strains of lactobacilli are isolated from the rumen of cattle, sheep and other ruminating animals. In order to evaluate the effect of *Mentha piperita* essential oil on the isolated Lactobacillus engaged with rumen acidosis, ruminal fluid samples were collected from the rumen of cows equipped with permanent fistula. **Material and methods:** The cows were fed by a diet containing 65% concentrate and 35% forage. The *Menthapiperita* essential oil was extracted by the clevenger apparatus. Bacterial isolation was done according to the standard methods. Bacterial culture was done on the special media of MRS and colonies were selected and distinguished based on their size and morphology as well as catalase, oxidase and Gram staining tests. Catalase test was performed in two ways, tube metod and slide method. Tube method poured 1-2 ml of hydrogen peroxide solution into a test tube and used a sterile wooden stick or a glass rod, taked several colonies of 18-24 hours test organism and immerse in the hydrogen peroxide solution and observed for immediate bubbling. Slid method used a loop or sterile wooden stick to transfer a small amount of colony growth in the surface of a clean, dry glass slide and placed a drop of 3% H_2O_2 in the glass slide and observed for the evolution of oxygen bubbles. The oxidase test is used to identify bacteria that produce cytochorome oxidase, an enzyme of the bacterial electron transport chain. All bacteria that are oxidase positive are aerobic, and can use oxygen as a terminal electron acceptor in respiration. This does not mean that they are strict aerobes. Oxidase test was performed with this method. The amount of 2-3 drops of oxidase reagent (kovacs) was poured onto filter paper and with the loop, some bacterial colonies were tested on the filter paper. After 10 seconds, the dark blue color indicates that the test is positive. Complementary test experiments including biochemical, fermentation of carbohydrates, arginine hydrolysis, study of bacterial growth in different conditions with regards to environmental temperature and pH, sodium chloride concentration and CO_2 production from glucose were performed. The antibacterial effects of *M.piperita* essential oil was evaluated by using well diffusion agar method and measuring

the inhibitory zone diameter in comparison with the control samples (distilled water) and t-test statistic.

Results and discussion: Thirty-six colonies of Lactobacillus genus were identified according to their characteristics. It was confirmed that heterofermentative Lactobacillus with a propertion of 58% were more than the homofermentative lactobacillus with 42% following running the purification and biochemical tests of arginine hydrolysis and fermentation of carbohydrates and Co_2 production from glucose. Based on the biochemical similarity and growth characteristics, the 36 isolated Lactobacillus were classified into 15 groups and 3 stories. Fifteen species of Lactobacilli were diagnosed following the commentary experimental tests in comparison with Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. By using Levene's test, the equality of variances between 2 groups didn't reject, hence the variations between these 2 groups were equal with the 95% level of significance. In all cases the number was less than 0.05 ($P<0.05$) or the average of inhibitory zone diameter in all treated Lactobacilli were significantly higher than the control. Lactobacillus were sensitive to the peppermint essential oil.

Conclusion: All the 15 isolated groups of Lactobacillus and *Lactobacillus plantarum* were sensitive to the peppermint essential oil based on colony characteristics. Nearly all species of isolated Lactobacilli species were sensitive to the essential oils. More *in vivo* experiments are required for reaching to the practical application of *M.piperita* essential oil utilization against the Lactobacillus engaged with rumen acidosis in ruminants.

Keywords: Essential oil, Lactobacillus, *Mentha piperita*, Rumen