

## اثر اسانس گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) بر لاکتوباسیل‌های جدا شده از شکمبه گاو

ستاره نبی‌زاده اصل<sup>۱</sup> و رضا ولی‌زاده<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۲۴

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری گروه علوم دامی پردیس بین‌الملل دانشگاه فردوسی مشهد و عضو هیات علمی گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی

واحد رودهن

<sup>۲</sup> 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 ۶۵٪ کنستانتره و ۳۵٪ علوفه تغذیه شده بودند جمع‌آوری و صاف گردید. به منظور 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<sub>2</sub> 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 ۱۶ گونه لاکتوباسیلوس بود که در معرض غلظت ثابتی از اسانس خالص نعناع فلفلی و آب مقطر (شاهد) قرار گرفتند. نتایج: تعداد کلنی مربوط به جنس لاکتوباسیلها جداسازی و شناسایی گردید که در ۱۵ گروه در سه طبقه تقسیم بندی شدند. لاکتوباسیل‌های هتروفرمنتیتیو با ۵۸٪ فراوانی بیشتری نسبت به لاکتوباسیل‌های هموفرمنتیتیو با ۴۲٪ داشتند. اسانس نعناع بر تمام باکتری‌های آزمایش شده اثر مهاری داشت. نتیجه گیری نهایی: اسانس گیاه نعناع فلفلی اثر معنی‌داری ( $P \leq 0/05$ ) بر کاهش رشد لاکتوباسیل‌ها در محیط آزمایشگاه داشت.

واژگان کلیدی: اسانس، شکمبه، لاکتوباسیلوس، 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 پپیریتا) به سبب دارا بودن ترکیب منتول دارای اثرات دارویی زیادی است و اسانس آن هم خواص ضد میکروبی دارد (کلارک و همکاران ۱۹۹۸). تیلور (۱۹۹۳) نعناع فلفلی<sup>۱</sup> 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 تندى دارد ولی به مرور زمان رنگ آن زرد مایل به سبز می‌شود (ایوانس ۱۹۹۶). گوئدون و پاسکوئر (۱۹۹۴) 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 احتمالاً به دلیل وجود همین ترکیب منتول است. وجود ترکیبی به نام سارفورال (۲ تا 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 کنستانتتره 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 معمولاً تنها در شرایط بیهوایی 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 ۰/۵-۰/۷ و طول ۱/۸-۶۰ 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- Peppermint

نتیجه بروز ادم ریه می‌گردد (یانکه و چنچ ۱۹۹۸). از طرفی قالی و همکاران (۲۰۰۴) گزارشاتی کردند که تحت شرایط خاص تغذیه‌ای باکتری‌هایی مانند لاکتو باسیلوس ویتولینوس توانایی تولید لاکتات زیادی از خود نشان می‌دهند. متابولیت‌های ثانویه گیاهی که عموماً 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 نعنای فلفلی بر آنها با هدف کنترل مناسب تخمیر در شرایط مصرف مقادیر زیاد کربوهیدرات‌های سهل‌الهضم مورد مطالعه قرار گیرد.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه اسانس نعنای فلفلی

گیاه نعنای فلفلی از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد جمع‌آوری گردید. مواد گیاهی جمع‌آوری 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 تقریباً تا ۲/۳ حجم بالن آب اضافه گردید. اسانس‌گیری با روش تقطیر با آب‌به‌مدت ۴ ساعت با دستگاه کلونجر انجام شد و آبیگیری اسانس استخراج شده توسط سولفات سدیم بدون آب انجام شد و در ظرف شیشه‌ای تیره دور از نور و در دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید (گلستان‌نژاد و همکاران ۱۳۹۳).

خیلی شبیه به ارگانیسیم ۱۲۳ بودند که قبلاً بوسیله مان و اکسفورد (۱۹۵۴) 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 هراندز 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 می‌تواند 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 میکروارگانیسیم‌ها فراهم می‌نماید. این شرایط شامل رطوبت، دما، محیط بی‌هوایی، فشار اسمزی و pH می‌باشد. pH مطلوب جهت پایداری تخمیر نزدیک به خنثی (۶ تا 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

<sup>1</sup>- Hydrodistillation

### جداسازی لاکتوباسیل‌ها از مایع شکمبه

مایع شکمبه از شکمبه گاو مجهز به فیستول دائمی که با جیره حاوی ۶۵ درصد کنستانتیره نسبت به علوفه (۳۵٪) تغذیه شده بود قبل از تغذیه صبحگاهی جمع‌آوری گردید. پس از انتقال مایع شکمبه به آزمایشگاه مقدار ۵ گرم از محتویات شکمبه با ۴۵ میلی لیتر محلول<sup>۱</sup> ADS مخلوط گردید. این محلول با استفاده از پارچه دولایه و تکنیک بی‌هوای 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 میلی لیتر محلول حاوی باکتری به لوله‌های استریل محتوی محیط کشت مخصوص برای لاکتوباسیل‌ها یعنی MRS<sup>۲</sup> مایع که با ۱ میلی لیتر نشاسته ۵٪ وزنی- حجمی مخلوط گردیده بود، اضافه شد. لوله‌های آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوای با استفاده از جار بیهوای و گاز پک نوع A انکوبه گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت از گرماگذاری کشت‌ها، مقدار ۱ میلی لیتر از هر یک از لوله‌های آزمایش بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS آگار استریل به صورت یکنواخت کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوای 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 ۱۳۶۷) 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 (هارینگان ۱۹۹۸، بنسون ۲۰۰۲ و عبدی و همکاران ۲۰۰۶).

### آزمایشات بیوشیمیایی و تکمیلی جهت شناسایی ایزوله‌های جداسازی شده 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 ۴۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت‌های ۶/۵ و ۱۸ درصد کلرور سدیم و pHهای ۹/۶ و ۴/۴ بر روی محیط MRS آگار بررسی شد. همچنین جهت تشخیص همو و هترو فرمنتیتیو بودن لاکتوباسیل‌ها تولید گاز CO<sub>2</sub> از قند گلوکز در محیط MRS اصلاح شده بوسیله لوله دورهام و برای تشخیص باکتری مصرف‌کننده آرژنین هیدرولیز آرژنین در محیط ردی‌براث بررسی شد (سالمینن و همکاران ۲۰۰۴). 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 ۱ درصد 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 ۰/۵ مگفارلند از هر یک از نمونه‌های میکروبی مورد آزمایش (۱۵ 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 ۱۳۶۷). در مرحله بعد حدود ۱۰ میکرو لیتر اسانس نعناع فلفلی (آب مقطر استریل به عنوان شاهد استفاده شد) به هر یک از چاهک‌ها توسط سمپلر استریل اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای

<sup>۱</sup>- Anaerobic Dilution Solution

<sup>۲</sup>- Deman Rogosa, sharpengar

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. با توجه به تعداد کل کلنی‌های تشکیل شده حدود ۲/۳۴٪ 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 نسبت به سایر باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک با ۳۴٪ بعد از جمعیت ۴۸٪ سلنوموناس‌ها بالاترین تعداد را به خود اختصاص داده بودند. باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم مثبت کاتالاز منفی که در دماهای ۱۰ و ۴۵، pH های ۴/۴ و ۹/۶ و غلظت‌های ۶/۵ و ۱۸ درصد کلرور سدیم توانایی رشد داشتند لاکتوباسیل‌های هومو و هتر فرمنتیتیو بودند (سالمینن و همکاران ۲۰۰۴ 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

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 نعنای 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).

$$Y_{ij} = \bar{X}_{00} + T_0j + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

که در آن:

$Y_{ij}$ : مشاهده تکرار  $i$  از تیمار  $j$

$T_0j$ :  $T_0$  از تیمار  $j$

$\varepsilon_{ij}$ : 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 نعنای ۱ میلی لیتر اسانس استخراج گردید که بازده وزنی- حجمی آن تقریباً یک در صد محاسبه گردید. اسانس حاصل از نعنای فلفلی دارای بوی تند نعنای و به رنگ زرد کم‌رنگ بود جهت جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل‌های شکمبه کلنی‌های تشکیل شده روی پلیت‌های MRS آگار در محدوده ۳۰-۳۰۰ 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

آمونیاک رنگ محیط بنفش می‌گردد (عدالتیان و همکاران  
۲۰۱۲).

بود (یانکه و چنچ 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

### جدول ۱- 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						تولید CO <sub>2</sub> از گلوکز CO <sub>2</sub> production of glucose	هیدرولیز آرژنین Hydrogenase arginine
	۱۰°C 10 °C	۴۵°C 45 °C	pH=۴/۴ pH=4/4	pH=۹/۶ pH=9/6	کلورسدیم ۶٪/۵ NaCl 6/5%	کلورسدیم ۱۸٪ NaCl 18%		
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 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
2	2, 4, 5, 18	هموفرمنتیتیو
3	3, 22, 29, 36	اجباری گروه A
4	17	Obligate homofermentative lactobacillus Group A
5	19	
6	20, 6	لاکتوباسیل‌های هتروفرمنتیتیو
7	12	اختیاری گروه B
8	14, 35	Facultative hetrofermentative lactobacillus Group B
9	15, 27	
10	24, 30	
11	7, 23	لاکتوباسیل‌های هتروفرمنتیتیو
12	8	اختیاری گروه C
13	9, 33	Facultative hetrofermentative lactobacillus
14	10, 16, 28, 31, 34	
15	11, 25	Group C

با توجه به مطالب فوق و بنابر نتایج بدست آمده در جدول ۱ می‌توان نتیجه گرفت که ۳۶ کلنی خالص شده متعلق به جنس لاکتوباسیل‌ها بود و لاکتوباسیل‌های هتروفرمنتیتیو با ۵۸ درصد تعداد بیشتری نسبت به لاکتوباسیل‌های هموفرمنتیتیو (۴۲٪) 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 ۲ و مقایسه آن با کتاب راهنمای برجی ۳۶ 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 ۴ قطر هاله عدم رشد باکتری تحت تأثیر بکار بردن اسانس نعناع فلفلی آورده شده است. لازم به ذکر است که برای هر پلیت 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 ۴).

جدول ۴- میانگین (mm) وانحراف معیار قطر هاله عدم رشد ناشی از اثر اسانس نعناع فلفلی و شاهد (آب مقطر) بر لاکتوباسیل‌های جدا شده 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) Meam diameter (mm) of the no growth zone essential	میانگین قطر هاله عدم رشد (mm) Meam diameter (mm) of the no growth zone control	شماره گروه باکتری Bacterial group number	میانگین قطر هاله عدم رشد (mm) Meam diameter (mm) of the no growth zone essential	میانگین قطر هاله عدم رشد (mm) Meam diameter (mm) of the no growth zone control
1	14±1/3	7/4 ± 1/48	9	22±1/4	7/70 ± 1/23
2	16±2/1	7/20 ± 1/22	10	21±1/4	7/0 ± 0/81
3	15±2/1	7/80 ± 1/23	11	21±3/3	7/50 ± 1/00
4	17±3/1	7/50 ± 1/4	12	15±1/3	70 ± 1/81
5	19±2/8	7/30 ± 1/48	13	17±1/1	6/70 ± 1/81
6	24±4/4	70 ± 1/81	14	14±1/8	7/50 ± 1/4
7	17±2/5	7/40 ± 1/46	15	17±1/4	7/50 ± 1/01
8	18±1/3	7/70 ± 1/24		22±1/4	7/30 ± 1/48

*Lactobacillus plantarum*  
سویه استاندارد



باکتری‌های گرم منفی هیدروفیلیک است و امکان ورود مواد لیپوفیلیک را نمی‌دهد. بیشتر ترکیبات اسانس‌ها مانند موننسین لیپوفیلیک هستند و نمی‌توانند به غشاء باکتری‌های گرم منفی نفوذ کنند البته غشاء بیرونی باکتری‌های گرم منفی به طور کامل نسبت به مواد هیدروفوبیک نفوذناپذیر نیست و ملکول‌های با وزن پایین می‌توانند در آن نفوذ کنند. به‌طور کلی ترکیبات فعال ضد میکروبی اسانس‌ها ترپن‌ها نظیر اوژنول، تیمول و کارواکرول می‌باشند که ماهیت فنولی دارند بویژه خاصیت ضد میکروبی اسانس نعنای که توسط تاسو و همکاران (۲۰۰۰) بررسی شد نشان داد که این خاصیت به علت وجود منتول و کتونها مانند پولگون، پیپریتون، کاروون و دهیدروکارون می‌باشد. در بررسی‌های بیوچت و گلدن (۱۹۹۸) نیز در مورد اسانس گیاهان خانواده نعنای تیمول، کارواکرول، منتول و پاراسیمین مهمترین اجزاء اسانس هستند که خاصیت ضد میکروبی 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 مزه‌ای پیدا کند. اسانسها فعالیت آنتی‌میکروبیال قوی دارند و ترپنوئیدها و فنیل پروپانوئیدها فعالیت‌شان را بر ضد باکتری‌ها در واکنش با غشاء سلولی 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 غشاء را پر می‌کند و در نتیجه باعث از دست رفتن پایداری غشاء و نفوذ یونها از غشاء می‌شود (سیکما و همکاران ۱۹۹۴ و اولته و همکاران

بنابر نتایج بدست آمده در جدول ۴ 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 نعنای حساس بودند و البته بعضی گونه‌ها حساس‌تر بودند. در پژوهش انجام شده توسط گلستان‌نژاد و همکاران (۲۰۱۴) اثر اسانس نعنای بر سه نوع لاکتوباسیل شامل لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلنتارم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس بررسی شد و مشخص گردید اسانس نعنای بر هر سه گونه موثر است اما اثر آن بر گونه لاکتوباسیلوس کازئی بیشتر بود.

در تحقیقی که توسط سی و همکاران (۲۰۰۶) انجام گرفت اثر ضد میکروبی ۹ جزء از اسانس‌های گیاهی بر روی 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 می‌شود به‌علاوه دو ایزوله لاکتوباسیلوس پلنتارم نسبت به اجزاء اسانس‌های بررسی شده بسیار مقاوم تر از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس 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 نعنای 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) و سیمانگا و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که دیواره سلولی خارجی اطراف غشای سلولی

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

به‌طور کلی 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 می‌تواند 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.

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 پاسکوا 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 و بوئن (۱۹۹۷) عملکرد ضد میکروبی دیگر اسانس‌ها را تغییر 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

#### منابع مورد استفاده

- Abdi R, Schikh-Zeinoddin M and Soleimani-Zad S, 2006. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan chesse. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9: 1.99-103.
- Bauer K, Garbe D and Sarbarg H, 1990. Common fragrance and flavor materials. VCH Pulisher, 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 Technology* 11: 134-142.
- Breithaupt DE, Wschwack W, Wolf G and Hammes WP, 2001. Characterization of the triterpenoid 4,4'-diapone and its isomers in food associated bacteria. *European Food Research and Technology* 213: 231-233.
- Bryant MP and Burkeyl A, 1953. Cultural methods and some characteristics 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 review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *American Dairy Science Association* 90:2580-2595.
- Chao SC and Young DG, 2000. Screening for inhibitory activity 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, Cameron GS and Stuart I, 1998. "An aroma chemical profile, menthol" perfumer and flavorist. *Maryland Press, Easton*. Vol 23, Pp: 33-46.
- Cox SD, Mann CM and Markam JL, 2001. Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal Applied Microbiology* 91: 492-497.
- Dawson KA and Allison MJ, 1988. Digestive disorders and nutritional toxicity in the rumen microbial ecosystem. Hobson, p.v. (eds), Elsevier Applied science publishers Ltd. London. Pp: 445-459.
- Deans SG and Ritchie G, 1997. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 10:165-180.
- Dehority BA, 2003. Rumen microbiology. First edition, Nottingham Univ, Nottingham, UK. Pp: 253-269.
- Di Pasqua R, Hoskins V, Betts G and Mauriello G, 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. *Journal Agriculture Food Chemistry* 54: 2745-2749.
- Edalatian MR, Habibinajafi MB, Mortazavi A and Mayo B, 2012. The biodiversity and evolution of lactic flora during ripening 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*. Easton, 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, Scott PT and Al Jassim RAM, 2004. Characterization of *Streptococcus bovis* 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 *Mentha 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 Pasquier BP, 1994. Analysis and distribution of flavonoid glycosides and rosmarinic acid in 40 *Mentha piperita* clones. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 42: 679-684.
- Gustafson RH and Bowen RE, 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal Applied Microbiology* 83: 531-541.
- Harrigan WF, 1998. *Laboratory methods in food microbiology*: Gulf professional publishing. edition. London, New York.
- Hernandez D, Scott PT, Shephard RW and Al Jassim RAM, 2008. The characterization of lactic acid producing bacteria from the rumen of dairy cattle grazing 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 Demirci F, 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* 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 *Thymus vulgaris* measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection* 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 *Staphylococcus aureus* 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 (*Camelus dromedarius*) 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 *Mentha piperita* essential oil on bovin ruminal isolated Lactobacillus

S Nabizadeh Asl<sup>1</sup> and R Valizadeh<sup>2\*</sup>

Received: June 13, 2016 Accepted: August 14, 2016

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>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 known 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 cleverger 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 method 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, took several colonies of 18-24 hours test organism and immerse in the hydrogen peroxide solution and observed for immediate bubbling. Slide 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the glass slide and observed for the evolution of oxygen bubbles. The oxidase test is used to identify bacteria that produce cytochrome 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<sub>2</sub> 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 proportion 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  $\text{CO}_2$  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