مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۱۱، بهمن ۱۳۹۸ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

فعالیت ضد باکتریایی اوژنول و اسیدهای آلی علیه *اشریشیاکلی* O157: H7

زلیخا شیروانی: دانشجوی دکتری، گروه بهداشت وکنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (*نویسنده مسئول).
z.shiravani682@yahoo.com
حسین تاجیک: استاد، گروه بهداشت وکنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
جواد علی اکبرلو : دانشیار، گروه بهداشت وکنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به نگرانی مصرف کنندگان در مورد اثرات منفی نگه دارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی، اخیراً تحقیقات بسیاری به منظور یافتن ترکیبات ضد میکروبی طبیعی موثر انجام شده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد باکتریایی اوژنول در ترکیب با اسید استیک و اسید لاکتیک روی باکتری *اشریشیاکلی* O157: H7 می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، اثر ضد باکتریایی اوژنول، اسید استیک و اسید لاکتیک با استفاده از روش حداقل غلظت مهارکنندگی مشخص شد و از روش غلظت مهاری سهمی و منحنی زمان مرگ نیز برای ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی ترکیبی استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج بدست آمده، مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی به تنهایی برای اوژنول، اسید استیک و اسید لاکتیک به ترتیب ۰/۷۵، ۲/۵ و ۵ میکرولیتر بر میلی لیتر بود و نتایج غلظت مهار سهمی آن ها نشان داد که حالت ترکیبی اوژنول با اسید های آلی بدون اثر متقابل (۰/۴< FIC <۱/۰) می باشند. با توجه به نتایج بررسی منحنی زمان مرگ حالت ترکیبی اوژنول / اسید لاکتیک در عرض ۴ ساعت باعث از بین رفتن باکتری شد.

نتیجه‌گیری: اوژنول، اسید استیک و اسید لاکتیک در ممانعت از رشد باکتری *اشریشیا کلی* O157: H7 موثر بوده اند و استفاده از اسید های آلی می تواند میزان مورد نیاز اوژنول را کاهش دهد. بنابراین، استفاده ترکیبی ازاوژنول و اسیدهای آلی به‌عنوان مواد ضدمیکروبی طبیعی میتواند جایگزین نگهدارنده های شیمیایی در مواد غذایی گردد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت کننده: دانشگاه ارومیه

کلیدواژه‌ها
اوژنول،
اسیدهای آلی،
فعالیت ضدباکتریایی،
اشریشیا کلی O157: H7

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۰۵
تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۰۷

شیوه استناد به این مقاله:
Shiravani Z, Tajik H, Aliakbarlu J. Antibacterial activity of eugenol and organic acids against *Escherichia coli* O157: H7. Razi J Med Sci. 2020;26(11):53-63.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

Razi Journal of Medical Sciences.2020;26(11):53-63. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Antibacterial activity of eugenol and organic acids against *Escherichia coli* O157: H7

Zolaikha Shiravani, PhD Student, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran (*Corresponding author) z.shiravani682@yahoo.com (ORCID: 0000-0002-0601-2745
Hossein Tajik, Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
Javad Aliakbarlu, Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran

Abstract

Background: Due to consumer concern about the negative side effects of chemical preservatives in food, recently increasing researches have been done to find effective natural antimicrobials. The aim of this study was to investigate the antibacterial activity of eugenol in combination with acetic and lactic acids against *E. coli* O157: H7.
Methods: The antibacterial effects of eugenol, acetic and lactic acids were determined using minimum inhibitory concentration (MIC) methods. Fractional inhibitory concentration (FIC) and Time-Kill assays were also used to evaluate the combined antibacterial activity.
Results: Based on our results, eugenol, acetic and lactic acids inhibited the growth of E. coli O157: H7, and eugenol had the strongest effect against the bacterium. MIC values for eugenol, acetic acid and lactic acid were 0.75, 2.5 and 5 µl/ml respectively. FIC method showed that eugenol combina-tion with the organic acids had no interaction effects (1.0 > FIC >4.0). Time kill cureve showed that eugenol combined with lactic acid caused the death of *E. coli* O157: H7 in 4 h.
Conclusion: Eugenol, acetic and lactic acids are effective in inhibiting the growth of *E. coli* O157: H7 Mean while, organic acids can reduce the required amount of eugenol. Then, combination of eugenol and organic acids could provide an alternative to chemical preservatives in foods.

Conflicts of interest: None
Funding: University of Urmia

Keywords
Eugenol,
Organic acids,
Antibacterial,
Escherichia coli O157: H7

Received: 27/07/2019
Accepted: 28/12/2019

Cite this article as:
Shiravani Z, Tajik H, Aliakbarlu J. Antibacterial activity of eugenol and organic acids against *Escherichia coli* O157: H7. Razi J Med Sci. 2020;26(11):53-63.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

مقدمه

باکتری اشریشیاکلی یک باکتری گرم منفی و از اعضای مهم خانواده انتروباکتریاسه محسوب می‌شود. این باکتری پاتوژن مهم انسان و حیوان است که یکی از نژادهای مهم اشریشیاکلی بنام اشریشیاکلی مولد خونریزی روده‌ای (Enterohaemorrhagic - EHEC) (E.coli) به‌ویژه سروتیپ O_{157} H_7 می باشد و با مصرف آب و غذای آلوده به باکتری اشریشیاکلی O_{157} H_7 سبب ابتلاء انسان به بیماری‌هایی نظیر کولیت خونریزی دهنده (Haemorrhagic Colitis)، سندرم کم‌خونی همولیتیک (Haemolytic Uraemic Syndrome) و آسیب‌های کلیوی می‌شود (۱). بسیاری از بیماری‌های عفونی ناشی از میکروارگانیسم‌های مختلف در سراسر جهان ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده به باکتری‌های پاتوژن هستند که در بسیاری از جوامع انسانی باعث ایجاد زیان‌های اقتصادی و جانی گسترده‌ای شده است (۲، ۳). یکی از راه‌ها کنترل رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در مواد غذایی استفاده از نگهدارنده‌ها و مواد ضد میکروبی می‌باشد (۴). در حال حاضر روبروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بین جوامع در حال افزایش می‌باشد و یافتن جایگزینی مناسب با عوارض جانبی پایین از اهمیت زیادی برخوردار است(۵). از طرفی جامعه امروز تمایل به روند مصرف کنندگی "سبز" دارد. این بدان معنااست که تولیدکنندگان مواد غذایی باید به دنبال روش‌های سبز یا طبیعی جدید، برای غذای امن (GRAS) (Generally Regarded As Safe) باشند. بنابراین، اخیرا توجه زیادی به توسعه ترکیبات ضد میکروبی طبیعی جدید از عصاره گیاهی به منظور بهبود کیفیت و ایمنی محصولات کشاورزی و صنعتی دارند (۶، ۷). اوژنول (۴-آلیل- متوکسی فنل) (C_{10} H_{12} O_2)، روغنی مایع روشن به زرد کم رنگ، با آرومای مشخص است که از جوانه و برگ میخک و دارچین استخراج شده است (۸). اوژنول دارای ترکیبات فنولی آمفی‌پاتیک گسترده‌ای می‌باشد که فعالیت ضد باکتریایی عالی در برابر طیف گسترده ای از ارگانیسم‌ها مانند *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* دارد (۱۳-۹). فعالیت ضد باکتری آن از طریق اختلال در غشای سیتوپلاسمی است که نفوذپذیری غیر اختصاصی را افزایش می دهد (۱۴) و بیشتر حالت آب گریزی اوژنول آن را قادر به نفوذ در غشا لیپوپلی ساکاریدی سلول باکتری‌های گرم منفی و تغییر در ساختار سلولی آن‌ها کرده است. نشان داده شده است که اوژنول نیز در برابر *سالمونلا تیفی* فعالیت ضد میکروبی دارد که به علت تعامل با غشای سلولی باکتری می باشد. شواهد اخیر نشان داده که گروه هیدروکسیل در اوژنول با اتصال به پروتئین ها، باعث جلوگیری از اقدام آنزیمی *انتروباکتر ائروژنز* می شود (۱۵). Modjinou و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که اوژنول باعث مهار رشد دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* می‌گردد، همچنین با اندازه‌گیری پارامترهای مختلف اکسیداتیو افزودند که اوژنول به دلیل داشتن گروه‌های متنوع فنولی دارای قدرت آنتی اکسیدانی بالایی نیز می‌باشد (۱۶). Requena و همکاران در سال ۲۰۱۹، اثر ضد باکتریایی فیلم‌های PHBV حاوی ترکیبات اوژنول و کارواکرول در ماتریکس‌های غذایی (پنیر، سینه مرغ، کدو و خربزه) علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *لیستریا اینوکوآ* را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند، نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین فعالیت ضد میکروبی اوژنول و کارواکرول علیه *اشریشیاکلی* در پنیر و کدو بوده است و اثر ضد باکتریایی آن‌ها علیه *لیستریا اینوکوآ* در این غذاها کمتر بوده است که علت آن را در دسترس بودن عوامل موثر و ترکیبات فعال برای تاثیر فعالیت ضد باکتریایی را در یک غذای خاص تعریف کرده‌اند (۱۷). به طور کلی اسانس‌های گیاهی و ترکیبات مونوترپنیدهای آن‌ها با نفوذ در لیپید غشاء سلولی و افزایش نفوذپذیری در آن، سبب اختلال در کلیه فعالیت‌های حیاتی وابسته به غشای سلولی، خروج یون‌ها، ترکیبات حیاتی و در نهایت مرگ سلول خواهد شد (۱۸، ۱۹). اثرات سمی روی ساختار و عملکرد غشا توجیه کننده فعالیت ضد میکروبی آن‌ها می‌باشد (۲۰).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

اسیدهای آلی مواد طبیعی هستند که در میوه های مختلف و محصولات تخمیری یافت می شوند و فعالیت ضد میکروبی علیه پاتوژن های ناشی از مواد غذایی دارند (۲۱). اسیداستیک و اسید لاکتیک متداول ترین نگه دارنده مورد استفاده هستند. فرآورده هایی مانند ترشی ها، ساورکرات (کلم ترش) و شیرهای تخمیری از طریق فعالیت های تخمیری باکتری های اسید لاکتیک مختلف تهیه می شوند که اسید استیک، اسید لاکتیک و سایر اسید ها را تولید می کنند. اثرات ضد میکروبی اسید های آلی به علت کاهش دادن pH به کمتر از حداقل مورد نیاز برای رشد و بازدارندگی متابولیکی ناشی از مولکول های تفکیک نشده اسید می باشد (۲۲).

در این مطالعه تجربی که در پاییز سال ۱۳۹۴ صورت گرفت، اثر ضد باکتریایی غلظت های مختلف اوژنول (۶، ۳، ۱/۵، ۰/۷۵، ۰/۳۷۵، ۰/۱۸۷، ۰/۰۹۳، ۰/۰۴۶ میکرولیتر بر میلی لیتر)، اسید استیک (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶، ۰/۰۳۹ میکرولیتر بر میلی لیتر) و اسیدلاکتیک (۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ میکرولیتر بر میلی لیتر) به تنهایی و ترکیبی در محیط آبگوشت مغز و قلب جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) (Minimum inhibitory concentration)، حداقل غلظت کشندگی (MBC) (Minimum Bactericidal Concentration)، غلظت مهاری سهمی (FIC) (Fractional inhibitory concentration) به روش استاندارد میکرودایلوشن و منحنی مرگ (Kill Time) مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

اوژنول ۹۹٪، اسید استیک ۱۰۰٪ ، اسید لاکتیک ۹۰٪ و دی متیل سولفوکسید (Germany-Merck) محیط‌های کشت میکروبی Brain Heart Infusion Agar-BHIA و Brain Heart Infusion Broth- BHIB (شرکت بیولایف Milano, Italia) بودند.

باکتری مورد مطالعه: باکتری *اشریشیا کلی* O157: H7 از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری: ابتدا یک گرانول باکتری *اشریشیاکلی* O157: H7 از لوله‌های کرایو (Cryo tube) مورد نظر در شرایط سترون خارج و جهت تهیه کشت تازه و فعال‌سازی سویه میکروبی به ۱۰ میلی لیتر محیط BHI براث منتقل شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه‌داری گردید. باکتری قبل از استفاده به طور متوالی دوبار تجدید کشت شد. برای این منظور ۴-۵ کلنی باکتری از BHI آگار را با لوپ برداشت کرده و به ۱۰ میلی لیتر BHI براث منتقل گردید و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. کشت دوم را با استفاده از سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر BHI براث انتقال داده و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ساعت نگه‌داری گردید. سپس از کشت ۲۰ ساعته با هم‌زدن مداوم سوسپانسیون در دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر با میزان جذب ۰/۰۸- ۰/۱۳ (استاندارد ۰/۵ مک فارلند) تعداد باکتری معادل $0/10^{8}\times32$ cfu/ml تنظیم گردید و با دو بار رقیق سازی به 10^{6} در محیط کشت BHI براث تهیه گردید و این عمل را هر بار قبل از هر آزمون تکرار شد. کلیه محیط‌های کشت بر اساس دستور کارخانه سازنده تهیه و با استفاده از دستگاه اتوکلاو سترون گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش میکرودایلوشن: در این روش از میکروپلیت های ۹۶ خانه ای با چاهک ته گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر که دارای ۱۲ ستون و ۸ ردیف می باشند، استفاده شد.

ابتدا اوژنول در دی متیل سولفوکسید (DMSO)، اسید استیک و اسید لاکتیک در آب مقطر استریل حل و توسط فیلتر میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند. بالاترین غلظت برای اوژنول ۶ µl/mL ، اسید استیک ۱۰ µl/mL و برای اسید لاکتیک ۲۰ µl/mL بود. سپس بطور سریالی با BHI براث رقیق سازی شدند. رنج غلظتی اوژنول ۶ µl/mL -۰/۰۴۶ ، اسید استیک ۱۰ µl/mL -۰/۰۳۹ و برای اسید لاکتیک ۲۰ µl/mL -۰/۱۵۶ بود. در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه ای ۹۵ µl محیط کشت BHI براث و ۵ µl باکتری ریخته شد، و ۱۰۰ µl از محلول استوک اوژنول، اسید استیک واسید لاکتیک به اولین چاهک افزوده شدند، سپس ۱۰۰ µl از رقت های سریالی در ۷ چاهک پی در پی انتقال یافت. به آخرین ستون به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

وسیله ۱۹۵ µl از BHI براث و ۵ µl از باکتری افزوده و به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. از اریترومایسین به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. حجم نهایی در هر چاهک ۲۰۰ µl بود. سپس میکروپلیت بوسیله پارافیلم پوشانده شد. به منظور مخلوط شدن تمام محلول های درون چاهک ها از میکروپلیت شیکر (BOECO, Germany) با دور سرعت ۳۰۰ rpm برای ۲۰ ثانیه استفاده گردید و سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بمدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. بعد از اتمام گرمخانه گذاری کدورت یا عدم کدورت در چاهک ها به صورت چشمی مشاهده گردید. وبرای تست MBC از چاهک هایی که شفاف بودند و نشان دهنده عدم رشد باکتری بودند به مقدار ۵ میکرولیتر برداشته و بر روی BHI آگار کشت سطحی داده شد پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، پلیت‌ها از لحاظ رشد و تشکیل کلنی بررسی شده و آخرین رقتی که توانسته ۹۹/۹ ٪ از باکتری‌ها را بکشد به‌عنوان رقت MBC در نظر گرفته شد(۲۳).

غلظت مهاری سهمی (FIC): در این آزمایش اثر ترکیبی اوژنول، اسید استیک و اسید لاکتیک در برابر باکتری *اشریشیاکلی* O157: H7 مورد بررسی قرار گرفت. رنج غلظتی این ترکیبات از دو برابر بیشتر از مقدار MIC تا حداقل چهار برابر کمتر از مقدار MIC برای این باکتری انتخاب گردید و چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه ای به شرح زیرآماده گردید:

در ردیف اول، هر چاهک محتوی ۹۵ میکرولیتر BHI براث، ۵ میکرولیتر باکتری (که تعداد آن روی cfu/ml 10^6 تنظیم گشته است) و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف اوژنول بود. درستون اول، هر چاهک محتوی ۹۵ میکرولیتر BHI براث، ۵ میکرولیتر باکتری و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف اسیداستیک یا اسید لاکتیک بود. بقیه چاهک ها اثر ترکیبی اوژنول با اسید استیک یا اسید لاکتیک را نشان می دهند. پس محتوی ۹۵ میکرولیتر BHI براث، ۵ میکرولیتر باکتری و ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف اوژنول و ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف اسید استیک یا اسید لاکتیک بود. سپس به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگه داری گردید و بر اساس مشاهدات چشمی و میزان کدورت FIC تعیین گردید.

این آزمایش بر اساس روشی که Murdock و همکاران در سال ۲۰۰۶ ارائه کردند انجام گرفت و مطابق آن FIC> ۰/۵ جز سینرژیست ها، FIC <۰/۷۵ < ۰/۵ سینرژیست نسبی، ۱/۰ < FIC < ۰/۷۵ دارای اثر افزایشی، ۴/۰> FIC > ۱/۰ بی اثر، FIC< ۴/۰ جز آنتاگونیست ها تقسیم گردید (۲۴).

بررسی منحنی مرگ مواد ضدباکتریایی Time Kill Curve: در مرحله اول MIC باکتری *اشریشیاکلی* O157: H7 تعیین گردید. در ۵ سری لوله جداگانه سوسپانسیون میکروبی حاوی رقت MIC اوژنول، اسید لاکتیک، اسید استیک، اوژنول /اسید لاکتیک، اوژنول /اسید استیک و یک لوله فاقد ترکیبات ضد باکتریایی به‌عنوان شاهد ساخته شد. در همان ابتدا تعداد باکتری-های موجود در هر لوله به‌طور جداگانه به روش زیر شمارش شد:

۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون به ۹۰۰ میکرولیتر به محیط پپتون واتر منتقل شده و پس از رقت سازی سریالی آن، هر رقت در پلیت بر روی محیط کشت BHI آگار کشت داده شد و تعداد باکتری‌های موجود در سوسپانسیون پس از گذشت ۲۴ ساعت با شمارش کلنی‌های رشد کرده در روی پلیت‌ها بدست آمد(۲۵).

در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت تعداد باکتری‌ها شمارش شد تعداد آن‌ها به ثبت رسید و در نهایت بر اساس تعداد باکتری‌های، منحنی مرگ بوسیله آزمون Tukey نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ بدست آمد.

یافته‌ها

نتایج MIC و MBC مواد ضدباکتریایی به تنهایی: اساسا MIC کمترین مقدار از یک ترکیب است که می‌تواند به میزان زیادی رشد یک ارگانیسم را پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص مهار نماید اما در حالت MBC حداقل میزان غلظت لازم برای کشندگی یک ارگانیسم می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که، در اوژنول و اسید استیک، مقدار کمتر MIC نسبت به MBC نشان می‌دهد که این ترکیبات در غلظت پایین‌تر دارای خاصیت باکتریواستاتیک است و در غلظت بالاتری دارای خاصیت باکتریوسید است اما در اسید لاکتیک مقدار MIC و MBC در یک میزان مشخص

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

جدول ۱- نتایج MIC به‌تنهایی و MBC اوژنول، اسید استیک و اسید لاکتیک برباکتری اشریشیا کلی O157: H7

ترکیب استفاده شده	MIC(µl/mL)	MBC(µl/mL)
اوژنول	۰/۷۵	۱/۵
اسید استیک	۲/۵	۵
اسید لاکتیک	۵	۵
اریترومایسین (µg/mL)	۱۶	-

جدول ۲- MIC ترکیبی و FIC اوژنول، اسید استیک و اسید لاکتیک برباکتری اشریشیا کلی O157: H7

ترکیب استفاده شده (A)	ترکیب استفاده شده (B)	MIC ترکیبی(µl/mL)		FIC شاخص (µl/mL)	عملکرد
		A	B		
اوژنول	اسید استیک	۰/۷۵	۰/۱۵۶	۱/۰۶۳	بی اثر
اوژنول	اسید لاکتیک	۰/۷۵	۰/۳۱۲	۱/۰۶۳	بی اثر

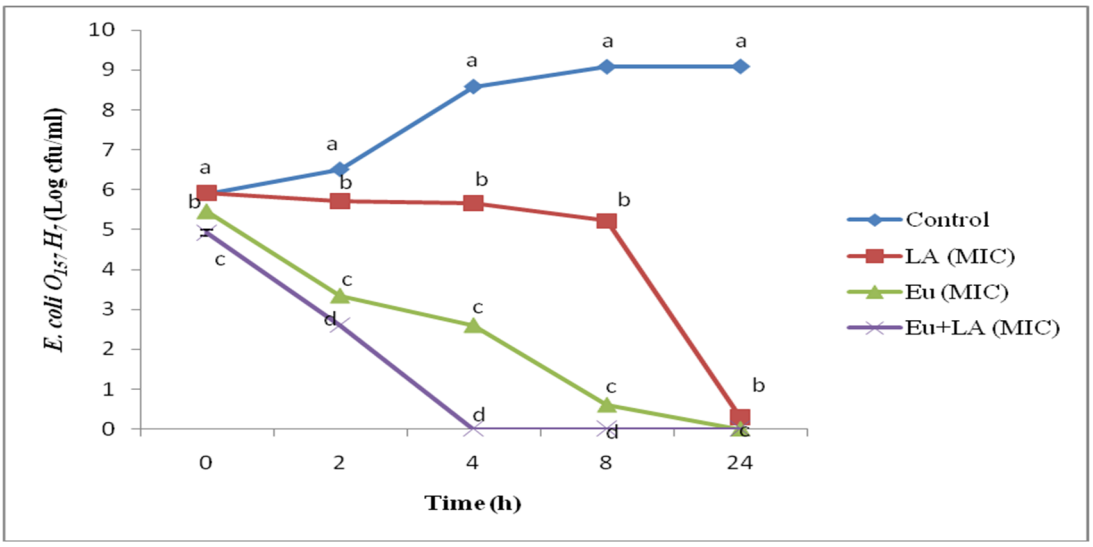
معادل یکدیگر بودند. به‌طور کلی، اوژنول اثر ضد باکتریایی قوی تری نسبت به دو اسید آلی دارد و همچنین اسید استیک اثر ضد باکتریایی قوی تری نسبت به اسید لاکتیک داشت (جدول ۱).

نتایج MIC ترکیبی و FIC مواد ضد باکتریایی به صورت ترکیبی: جدول شماره۲ MIC ترکیبی و FIC اوژنول در ترکیب با اسیدهای آلی را نشان می دهد. MIC ترکیبی اوژنول / اسید استیک نسبت به اوژنول / اسید لاکتیک اثر قوی تری را از خود نشان داد. مقادیر MIC ترکیبی این مواد نسبت به MIC آن ها به تنهایی نشان می دهد که، نیاز به غلظت های کمتری از اوژنول و اسید های آلی برای مهار رشد *اشریشیا کلی* O157: H7 می باشد.

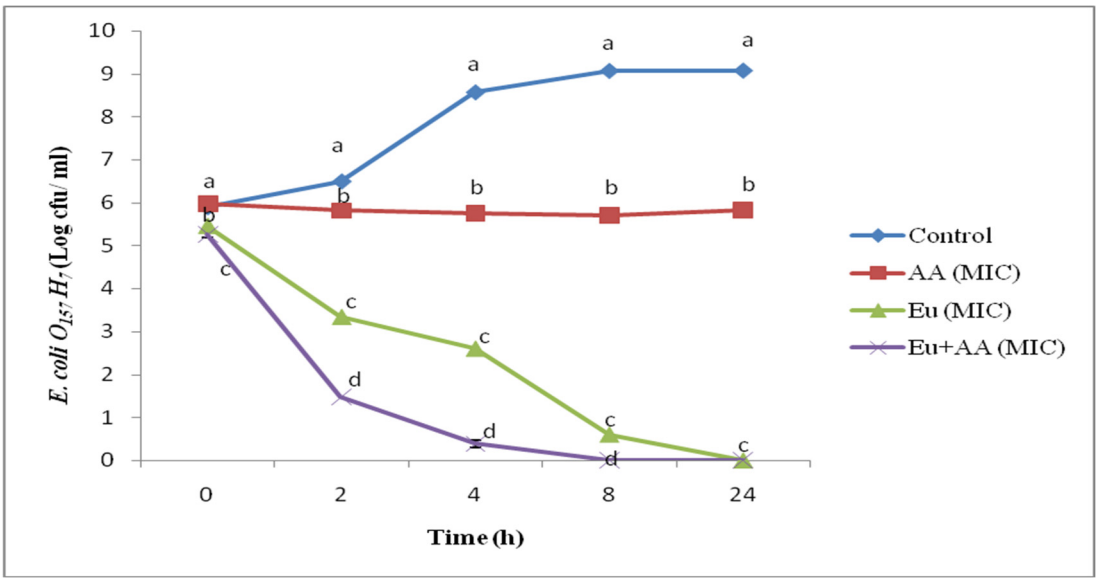
FIC ترکیبات ضد باکتریایی اوژنول /اسید استیک و اوژنول / اسید لاکتیک نشان می دهد که این ترکیبات بدون اثر متقابل نسبت بهم علیه باکتری *اشریشیا کلی* O157: H7 هستند.

نتایج بررسی منحنی مرگ مواد ضدباکتریایی Time Kill Curve: این روش یکی از بهترین روش‌ها برای تعیین خاصیت باکتری‌کشی می‌باشد و یکی از قوی‌ترین روش‌ها برای بدست آوردن ارتباط بین مواد ضد باکتریایی با گونه‌های باکتری‌ها می‌باشد که وابسته به زمان است و کشت تحت شرایط مناسب در فواصل زمانی مختلف صورت می‌گیرد، سپس درصد سلول‌های مرده نسبت به تعداد سلول‌های زنده بر اساس (CFU/ml) با استفاده از روش شمارش سطحی در مقایسه با شاهد بعمل می‌آید. در اینجا تصور می‌شود که اوژنول بعنوان یک ترکیب ضدمیکروبی از اسانس گیاهی بدلیل داشتن ساختار فنولی دارای فعالیت سطحی می باشد و موجب آسیب به غشای سلول‌های باکتری، مهار آنزیم‌های آن و یا تداخل با تولید برخی از آمینواسیدهای ضروری برای رشد باکتری می‌شوند و با این مکانیسم باعث مرگ سلولی می‌شود. از طرفی بازدارندگی رشد باکتری مستقیما مربوط به غلظت اسید تفکیک نشده در اسیدهای ضعیفی مانند اسید استیک و لاکتیک می‌باشد، برخی اعمال ضروری سلولی نظیر سنتز ATP در باکتری‌ها، انتقال فعال مواد غذایی و تنظیم سیتوپلاسمی به‌وسیله غشا سلولی انجام می‌گیرد، حال مولکول‌های اسید تفکیک نشده می‌توانند آزادانه از غشا عبور کنند. با انجام این عمل مولکول‌های تفکیک نشده از محیط خارجی با pH کمتر که در آن تعادل به سمت مولکول تفکیک نشده است به داخل سیتوپلاسم که دارای pH بالاتری است وارد می‌شوند. در این pH بالاتر تعادل به سمت مولکول تفکیک شده تغییر می‌یابد و بنابراین اسید یونیزه شده و منجر به تولید پروتون‌هایی می‌شود که موجب اسیدی شدن سیتوپلاسم می‌شود. سلول جهت ثبات pH درونی خود سعی می‌کند به‌وسیله خنثی سازی و یا بیرون راندن پروتون‌های نفوذ کرده بدرون خود را خارج نماید اما این عمل باعث کند شدن رشد می‌شود زیرا انرژی مورد استفاده در این عمل از میزان انرژی مورد استفاده جهت رشد سلول می‌کاهد که دیگر رشد ممکن نیست و احتمالا سلول می‌میرد. نمودار شماره ۱ و ۲ در برابر رقت MIC ترکیبات ضد باکتریایی مختلف، باکتری استاندارد را کشت داده و در زمان‌های مختلف تغییرات تعداد آن‌ها بررسی شد و منحنی رشد و مرگ باکتری

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]



نمودار ۱- بررسی منحنی رشد باکتری *اشریشیا کلی O157: H7* در برابر رقت MIC اوژنول، لاکتیک اسید و اوژنول /لاکتیک اسید



نمودار ۲- بررسی منحنی رشد باکتری *اشریشیاکلی O157: H7* در برابر رقت MIC اوژنول، استیک اسید و اوژنول / استیک اسید

در برابر آن بدست آمد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود حالت ترکیبی مواد ضد میکروبی طبیعی توانسته‌اند در مدت زمان کوتاه‌تری (اوژنول/ لاکتیک اسید پس از ۴ ساعت و اوژنول/ لاکتیک اسید پس از ۸ ساعت) باعث مرگ باکتری *اشریشیاکلی* O_{157} H_7 شوند.

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری‌های منتقله از غذا یک مشکل عمده و پر هزینه است. پاتوژن‌های منتقله از غذا به طور گسترده در طبیعت یافت می شوند و جلوگیری از ورود آن ها به غذاهای خام مشکل می باشد (۲۶). گزارش ها حاکی از آن است که بسیاری از ترکیبات اسانس های گیاهی دارای اثر بازدارندگی قابل توجهی بر میکروارگانیسم‌های بیماریزا هستند (۲۷) و مطالعات بسیاری در این راستا صورت گرفته است. درنتایج این بررسی، MIC ترکیبی اوژنول با اسید استیک و اسید لاکتیک در مقایسه با نتایج تست MIC به‌تنهایی نشان دادکه، غلظت های اوژنول در حالت ترکیب با اسید های آلی برای مهار *اشریشیا کلی* O157: H7 کاهش یافت.

در مطالعه‌ای که توسط Kim و همکاران در سال

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

۱۹۹۵ انجام گردید فعالیت ضد باکتریایی اوژنول بر علیه *اشریشیاکلی* واشریشیاکلی $O_{157}H_7$ بررسی شد نتایج نشان داد که اوژنول دارای فعالیت ضد میکروبی معنی داری بر روی این باکتری‌ها می باشد و MIC آن برای هر دو باکتری µg/mL ۱۰۰۰ و MBC آن برای *اشریشیاکلی* µg/mL ۱۰۰۰ و برای اشریشیاکلی $o_{157}H_7$ >۱۰۰۰ µg/mL گزارش کردند (۲۸) که با نتایج تحقیق حاضرتا حدی مطابقت دارد.

در تحقیق دیگر، Li و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان کردند که، مقدار MIC و MBC ۵٪ اوژنول در اتانول علیه باکتری *اشریشیا کلی* برابر با µg/mL ۷۸۱/۲۵ می‌باشد و همچنین مقدار MIC و MBC ۵٪ اوژنول در اتانول علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را برابر با µg/mL ۱۵۶/۵۰ تعیین کردند (۲۹).

Pandima Devi و همکاران در سال ۲۰۱۰، نشان دادند که، اوژنول فعالیت ضد باکتری عالی در برابر طیف گسترده ای از ارگانیسم ها مانند *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *لیستریامونوسیتوژنز* دارد(۳۰).

در بررسی‌های دیگر نیز اوژنول به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی علیه *اشریشیاکلی* معرفی شده است (۳۱ و ۲۶).

Jang و همکاران در سال ۲۰۰۷، اثر اسید استیک را علیه *اشریشیاکلی* $O_{157}H_7$ بررسی کردند، MIC اسید استیک برابر با ppm ۲۵۰۰ از رشد این باکتری جلوگیری کرد (۳۲). این یافته با MIC تحقیق حاضر یکسان است.

Piletti و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که، طبق آزمون‌های MIC و آگار دیفیوزن میکروکپسول‌های حاوی ۱۷/۰۸ میلی مول بر لیتر از اوژنول دارای فعالیت ضد باکتریایی عالی علیه اشریشیاکلی و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشند، در این تحقیق غلظت MIC برای باکتری *اشریشیاکلی* برابر با µg/mL ۲۵۰۰ و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* µg/mL ۶۲۵ گزارش گردید، و بالاتر بودن مقدار MIC برای *اشریشیاکلی* را بخاطر اینکه میکروارگانیسمی گرم منفی می‌باشد و مقاوم‌تر از *استافیلوکوکوس اورئوس* بعنوان باکتری گرم مثبت دانسته‌اند (۳۳).

Sharma و همکاران در سال ۲۰۱۷، اثر مهاری سینامالدئید به تنهایی و در حالت ترکیب با اوژنول، تیمول و تیموکینون را علیه باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مطالعه کردند، نتایج نشان داد که ترکیبات ضد میکروبی در حالت ترکیبی خود می‌توانند دوز مورد نیاز عامل ضد میکروبی را علیه رشد و سمیت میکروارگانیسم‌ها کاهش دهند و همچنین بیان کردند که تمام ترکیبات سینامالدئید، اوژنول، تیمول و تیموکینون علیه رشد *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* موثر بوده‌اند و حالت ترکیبی سینامالدئید با تیمول اثر سینرژیک علیه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* داشته است و به میزان قابل توجهی دوز مورد نیاز در مقایسه با حالت سینامالدئید به تنهایی را کاهش داده است، همچنین سینامالدئید در ترکیب با ترکیبات دیگر وابسته به زمان و غلظت می‌باشد و باعث افزایش نفوذپذیری در غشای باکتری به‌وسیله فعالیت بتا-گالاکتوزیداز بر روی باکتری *اشریشیاکلی* سویه ML35P می‌شود که دلیلی برای مرگ ارگانیسم به‌شمار می‌آید (۳۴).

Zhou و همکاران در سال ۲۰۰۷، نشان دادند که رشد *سالمونلا تیفی موریوم* به عنوان یک باکتری گرم منفی در محیط کشت مولر- هینتون براث حاوی تیمول، کارواکرول، EDTA، اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید سیتریک با غلظت های به ترتیب mg/L ۴۰۰، µl/L ۴۰۰ ، mg/L ۳۰۰، ۰٪/۲ حجمی/حجمی ، ۰٪/۲ حجمی/حجمی ، ۰٪/۲ حجمی/حجمی به طور معنی داری مهار شد و تمامی نتایج ترکیبی تیمول یا کارواکرول با اسید استیک کاهش معنی داری در رشد *سالمونلا تیفی موریوم* را داشتند.

Ahn و Shin در سال ۱۹۹۹، انواع متفاوتی از اسیدهای آلی که اثرات مهاری ضد میکروبی در برابر میکروارگانیسم های مختلف دارند را گزارش کردند. فعالیت های ضدباکتریایی اسیدهای آلی در برابر پاتوژن های ناشی از مواد غذایی شامل *اشریشیاکلی*، *لیستریامونوسیتوژنز*، *سالمونلاتیفی موریوم* و دیگر باکتری های توکسین زا در محصولات غذایی وجود دارد (۳۵ و ۳۶).

در مطالعه‌ای Zheng و همکاران در سال ۲۰۱۳، مقدار MIC دو حالت ترکیبی اوژنول / اسید استیک و اوژنول / اسید لاکتیک علیه گونه *انتروباکتر* جداشده از

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

سبزیجات را برابر با µg/mL ۶۲۵ بدست آوردند (۲۷).

Al- Rousan و همکاران در سال ۲۰۱۸، از اسید استیک و اسید سیتریک برای مهار *اشریشیاکلی* O_{157} H_7، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در سالاد تبوله (Tabbouleh) استفاده کردند، که در این مطالعه اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف اسید استیک (۰/۳٪ و ۰/۴٪) و اسید سیتریک (۱٪ و ۱/۴٪) و حالت ترکیبی آن‌ها (۱٪ اسید سیتریک به‌همراه ۰/۴٪ اسید استیک و ۱/۴ ٪ اسید سیتریک به‌همراه ۰/۳ ٪ اسید استیک) علیه *اشریشیاکلی* O_{157} H_7، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در سالاد تبوله در دمای ۴ و ۱۰ و ۲۱ درجه سلیسیوس مورد ارزیابی قرار دادند، با توجه به نتایج نشان دادند که، اسید استیک نسبت به اسید سیتریک اثر مهاری بیشتری بر *سالمونلاتیفی‌موریوم* و *اشریشیاکلی* O_{157} H_7 در دمای ۲۱ درجه داشته است و حتی سلول‌های این دو باکتری *سالمونلاتیفی‌موریوم* و *اشریشیاکلی* O_{157} H_7 در تیمار با اسید استیک ۰/۴ ٪ به ترتیب پس از ۵ و ۷ روز شناسایی نشده است، حالت ترکیبی اسید استیک و اسید سیتریک باعث کاهش *سالمونلاتیفی‌موریوم* و *اشریشیاکلی* O_{157} H_7 به کمتر از سطح تشخیص بعد از ۲ و ۳ روز در دمای ۲۱ درجه گردیده است، با این حال، این تیمارها به‌طور قابل توجهی *استافیلوکوکوس اورئوس* را در مقایسه با حالت کنترل کاهش دادند و خاظر نشان کردند که اسیدهای استیک و سیتریک می‌توانند در سالاد تبوله باعث کاهش آلودگی *اشریشیاکلی* O_{157} H_7، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* گردند (۳۷).

فعالیت ضد باکتریایی عوامل ضدمیکروبی را می‌توان با روش Time Kill در شرایط آزمایشگاهی را ارزیابی کرد (۲۵). این روش برخلاف روش MIC و MBC، اجازه می‌دهد تا سرعت فعالیت ضد باکتریایی ترکیبات تعیین گردد (۳۸).

Devi و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که، اوژنول در حالت MIC 4 و ۰/۰۵٪ حجمی/حجمی اثر ضد باکتریایی قوی بر روی سالمونلا تیفی دارد و در عرض ۶۰ دقیقه جمعیت باکتریایی *سالمونلا تیفی* را غیر فعال کرد. علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد که در معرض طولانی مدت قرار گرفتن با اوژنول باعث مرگ کامل این باکتری می‌گردد (۳۰).

در مطالعه‌ای که توسط Ye و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت، منحنی مرگ را بوسیله آزمایش OD Value برای دو ترکیب ضد میکروبی سینامالدئید و کارواکرول علیه *اشریشیاکلی* در حالت ۱۲ ساعت انکوباسیون بررسی کردند. نتایج نشان می‌دهد که اثر ترکیبی سینامالدئید / کارواکرول در مقایسه با حالت به تنهایی آن‌ها علیه *اشریشیاکلی* قوی‌تر می‌باشد و حالت ترکیبی روند کاهشی سریع‌تری دارد (۳۹).

نتایج این مطالعه هم نشان می دهد که ترکیبات ضد باکتریایی در حالت ترکیبی به ویژه اوژنول / لاکتیک اسید سرعت و زمان مهار رشد باکتری را به طور قابل توجهی کاهش دادند که این زمان برای حالت اوژنول / لاکتیک اسید در عرض ۴ ساعت بود.

ترکیبات اسانس‌ها فعالیت ضد میکروبی گسترده‌ای دارند و در بسیاری از موارد سبب از بین بردن باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها می‌شوند، بدون اینکه اثرهای نامطلوبی بر سلامت مصرف کننده داشته باشند. همچنین ترکیبات اسانس‌ها فعالیت ضدالتهابی، آنتی اکسیدانی و بسیاری خواص فارماکولوژیکی با دامنه وسیع دارند که کاربرد آن‌ها را به عنوان فرآورده‌های طبیعی دوچندان می‌سازد در این بررسی، اوژنول اثر قوی بر روی باکتری *اشریشیا کلی* O157: H7 نشان داد. بنابراین با توجه به عوارض منفی و شناخته شده نگه‌دارنده‌های شیمیایی، ترکیبات اسانس مانند اوژنول می تواند جایگزین خوبی برای آن‌ها باشد و همچنین اوژنول و اسید های آلی می توانند به عنوان نگه‌دارنده طبیعی مواد غذایی در برابر این باکتری پاتوژن مواد غذایی استفاده شوند و استفاده از اسیدهای آلی می‌تواند میزان مورد نیاز اوژنول را کاهش دهد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه نتایج حاصل از پایان نامه به شماره د ۲-۴۷۰ دانشگاه ارومیه می باشد. بدین وسیله نویسندگان مراتب سپاس خود را از همکاری مسئولین محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه و همچنین به دلیل تامین بودجه پژوهشی این مطالعه اعلام می‌دارند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

References

1. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology 7th ed. New York, NY: Springer; 2005.
2. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):564-82.
3. Shahnia M, Khaksar R. Antimicrobial effects and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) methods of essential oils against pathogenic bacteria. Iran J Nutr Sci. Food Technol. 2013;7(5):949-55.
4. Canillac N, Mourey A. Antibacterial activity of the essential oil of Picea excelsa on Listeria, Staphylococcus aureus and coliform bacteria. Food Microbiol. 2001;18(3):261-8.
5. Majnooni M, Abiri R, Afnanzade N, Malek Khatabi P. Study of antibacterial effects of hydro-alcoholic extract of 8 medicinal herbs against vancomycin resistant staphylococcus aureus. J. Med. Plants. 2012;1(41):103-10.
6. Periago PM, Moezelaar R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of Bacillus cereus. Int. J. Food Microbiol. 2001;68(1):141-8.
7. Periago P, Palop A, Fernandez P. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of Bacillus cereus heat-treated vegetative cells. Food Sci Technol Int. 2001;7(6):487-92.
8. Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J Agric Food Chem. 1998;46(9):3590-5.
9. Walsh SE, Maillard JY, Russell A, Catrenich C, Charbonneau D, Bartolo R. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and-negative bacteria. J Appl Microbiol.. 2003;94(2):240-7.
10. Filgueiras CT, Vanetti MCD. Effect of eugenol on growth and listeriolysin O production by Listeria monocytogenes. Braz Arch Biol Technol. 2006;49(3):405-9.
11. Koeduka T, Suzuki S, Iijima Y, Ohnishi T, Suzuki H, Watanabe B, et al. Enhancement of production of eugenol and its glycosides in transgenic aspen plants via genetic engineering. Biochem Biophys Res Commun. 2013;436(1):73-8.
12. Li Y, McClements DJ. Influence of cosurfactant on the behavior of structured emulsions under simulated intestinal lipolysis conditions. Food Hydrocoll. 2014;40:96-103.
13. Roberts SK, McAinsh M, Cantopher H, Sandison S. Calcium dependence of eugenol tolerance and toxicity in Saccharomyces cerevisiae. PloS One. 2014;9(7):e102712.
14. Gill A, Holley R. Disruption of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei cellular membranes by plant oil aromatics. Int J Food Microbiol. 2006;108(1):1-9.
15. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J Food Microbiol. 2004;94(3):223-53.
16. Modjinou T, Versace DL, Abbad-Andallousi S, Bousserrhine N, Dubot P, Langlois V, et al. Antibacterial and antioxidant bio-based networks derived from eugenol using photo-activated thiol-ene reaction. React Funct Polym. 2016;101:47-53.
17. Requena R, Vargas M, Chiralt A. Eugenol and carvacrol migration from PHBV films and antibacterial action in different food matrices. Food Chem. 2019;277:38-45.
18. Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. J. Essent. Oil Res. 1989;1(3):119-28.
19. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiol. 2001;18(4):463-70.
20. Morris J, Khettry A, Seitz E. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. J Am Oil Chem Soc. 1979;56(5):595-603.
21. Beuchat LR, Golden DA. Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technol (USA). 1989.
22. Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander I. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. Appl Environ Microbiol. 2000;66(5):2001-5.
23. Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between Thymus vulgaris and Pimpinella anisum essential oils and methanol extracts. J Ethnopharmacol. 2008;116(3):403-6.
24. Murdock C, Cleveland J, Matthews K, Chikindas M. The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157: H7. Lett Appl Microbiol. 2007;44(3):255-61.
25. Mitić-Ćulafić D, Vuković-Gačić BS, Knežević-Vukčević JB, Stanković S, Simić DM. Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (Salvia officinalis L.). Arch Biol Sci. 2005;57(3):173-8.
26. Gutiérrez-Larraínzar M, Rúa J, Caro I, de Castro C, de Arriaga D, García-Armesto MR, et al. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. Food Control. 2012;26(2):555-63.
27. Zheng L, Bae YM, Jung KS, Heu S, Lee SY. Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. Food Control. 2013;32(2):665-72.
28. Kim J, Marshall MR, Wei CI. Antibacterial activity of some essential oil components against five

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

foodborne pathogens. J Agric Food Chem. 1995;43(11):2839-45.
29. Li W, Chen H, He Z, Han C, Liu S, Li Y. Influence of surfactant and oil composition on the stability and antibacterial activity of eugenol nanoemulsions. Food Sci Techno. 2015;62(1):39-47.
30. Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane. J Ethnopharmacol. 2010;130(1):107-15.
31. Pei Rs, Zhou F, Ji Bp, Xu J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against E. coli with an improved method. J Food Sci. 2009;74(7):M379-M83.
32. Jang JS, Lee HJ, Oh BY, Lee JM, Go JM, Kim YH. Inactivation of Escherichia coli O157: H7, Salmonella and Listeria monocytogenes by organic acid. Korean J Environ Health Sci. 2007;33(5):403-7.
33. Piletti R, Bugiereck A, Pereira A, Gussati E, Dal Magro J, Mello J, et al. Microencapsulation of eugenol molecules by β-cyclodextrine as a thermal protection method of antibacterial action. Mat Sci Eng: C. 2017;75:259-71.
34. Sharma G, Raturi K, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in combination with thymol, eugenol and thymoquinone against Staphylococcus epidermidis. J Herb Med. 2017;9:68-73.
35. Dubal Z, Paturkar A, Waskar V, Zende R, Latha C, Rawool D, et al. Effect of food grade organic acids on inoculated. S aureus, L monocytogenes, E coli. Meat Sci. 2004:817-21.
36. Huang Y, Chen H. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of Escherichia coli O157: H7 on baby spinach. Food Control. 2011;22(8):1178-83.
37. Al-Rousan WM, Olaimat AN, Osaili TM, Al-Nabulsi AA, Ajo RY, Holley RA. Use of acetic and citric acids to inhibit Escherichia coli O157: H7, Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus in tabbouleh salad. Food Microbiol. 2018;73:61-6.
38. Aiyegoro O, Afolayan A, Okoh A. In vitro antibacterial time kill studies of leaves extracts of Helichrysum longifolium. J Med Plant Res. 2009;3(6):462-7.
39. Ye H, Shen S, Xu J, Lin S, Yuan Y, Jones GS. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. Food Control. 2013;34(2):619-23.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]