ارزیابی اثرات ضد باکتریایی اسانس بومادران در شرایط آزمایشگاهی و مدل غذایی

آسیه احمدی دستگردی*[۱]، پانیذ زین‌ساز[۲]، ندا ظهوریان[۲]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.
۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ممقان، دانشگاه آزاد اسلامی، تریز، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ خرداد ۱۳۹۸ ، بازنگری: ۲۵ شهریور ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۵ مهر ۱۳۹۸

چکیده

اهمیت بیماری‌های ناشی از مواد غذایی از یک طرف و تقاضای مصرف‌کنندگان برای کاهش استفاده از افزودنی‌های سنتزی از طرف دیگر، توجه محققین را به استفاده از افزودنی‌های طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی جلب نموده است. هدف از انجام این مطالعه استخراج و شناسایی ترکیبات اصلی اسانس بومادران، ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و سس مایونز می‌باشد. بررسی ترکیبات اسانس با روش گاز کروماتوگرافی وجود بورنئول، سینئول، کامفور و پینن را به عنوان مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس بومادران تعیین کرد. حساس‌ترین پاتوژن به اسانس در شرایط آزمایشگاهی، باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاوم‌ترین پاتوژن‌ها، باکتری‌های گرم منفی تشخیص داده شدند. نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های میکروبی سس مایونز نشان داد که اسانس بومادران همانند نگهدارنده سنتزی بنزوات- سوربات از رشد تمام میکروارگانیسم‌های پاتوژن جلوگیری کرد، در حالی که در نمونه کنترل، پاتوژن‌ها مشاهده شدند. همچنین مایونز کم‌چرب در مقایسه با نمونه پرچرب، بار میکروبی کمتری نشان داد. بنابراین می‌توان استفاده از اسانس بومادران را به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در سس مایونز پیشنهاد نمود.

واژگان کلیدی: *اسانس، بومادران، فعالیت ضد میکروبی، مایونز*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: As.ahmadi17@gmail.com

مقدمه

از آنجا که بسیاری از مواد غذایی حاوی نگهدارنده‌های شیمیایی می‌باشند که با معیارهای سلامتی مطابقت ندارد هر نوع اقدامی در جهت کاهش استفاده از این ترکیبات ضروری به نظر می‌رسد. امروزه در راستای حذف و یا کاهش افزودنی‌های شیمیایی در مواد غذایی، تحقیقات زیادی برای جایگزین کردن مواد شیمیایی با مواد طبیعی انجام شده است. ترکیبات استخراج شده از گیاهان مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد هستند. در حقیقت اسانس‌های گیاهی به علت داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فرار آروماتیک که برخی از آنها از عوامل مهم ایجادکننده طعم در غذا نیز به شمار می‌روند مورد توجه می‌باشند (۱). این ترکیبات فرار دارای خاصیت ضد اکسایشی و ضد میکروبی ذاتی بوده و می‌توانند به عنوان طعم‌دهنده و نگهدارنده در مواد غذایی به‌کار روند (۲).

در بین گیاهان دارویی، بومادران از مشهورترین و قدیمی‌ترین گیاهان دارویی است که به فراوانی در طب برای درمان بیماری‌ها زخم‌ها و سوختگی‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از مهم‌ترین خواص دارویی بومادران، تأثیرات ضد میکروبی آن بر طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا در انسان و حیوان است (۳).

مایونز یکی از مهم‌ترین مواد غذایی حساس به فساد میکروبی است و به دلیل میزان چربی بالا، ماهیت مواد خام مانند تخم‌مرغ و فقدان تیمار حرارتی، مستعد آلودگی میکروبی با *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا* می‌باشد (۴-۶). مایونز متداول‌ترین عامل شیوع بیماری‌های سالمونلوزیس در سراسر دنیا می‌باشد. شیوع مسمومیت غذایی توسط *سالمونلا* از طریق مصرف مایونز خانگی توسط رادرف رد و بورد (۱۹۹۳) گزارش شده است (۷). *سالمونلا اینتریتیدیس* یک باکتری انتروپاتوژنیک است که به وسیله مواد غذایی مثل مایونز که طی تولید آن فرآیند حرارتی نمی‌بینند شیوع پیدا می‌کند. این باکتری می‌تواند توسط تیمار حرارتی نابود شود. ولی معمولا مایونز، تیمار حرارتی ندارد. این شرایط نیاز به روش‌هایی برای حذف پاتوژن‌ها را ایجاد می‌کند (۸-۹). *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* از باکتری‌های پاتوژن در مواد غذایی بدون تیمار حرارتی می‌باشند (۷). با توجه به تاثیرات نامطلوب افزودنی‌های سنتزی در مایونز، استفاده از افزودنی‌های طبیعی یک ضرورت جدی به حساب می‌آید. در تحقیقات قبلی کاربرد اسانس پونه کوهی، اسانس *Ziziphora clinopodioides* و اسانس آویشن شیرازی در مایونز بر ضد *سالمونلا اینتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ساکارومایسس سرویزیه* بررسی شده است (۹،۱۰،۱۱). هدف از این پژوهش، رشد و بقاء *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا اینتریتیدیس* و *اشریشیاکلی* در مایونز حاوی اسانس گیاه بومادران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

سویه‌های میکروبی استاندارد شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *سالمونلا اینتریتیدیس* (ATCC 4933) و *اشریشیاکلی* (ATCC 25922) به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. کلیه محیط‌های کشت (بردپارکر آگار، EC براث و سالمونلا شیگلا آگار)، همچنین بنزوات و سوربات از مرک آلمان تهیه شد. مواد تشکیل‌دهنده سس مایونز از جمله تخم‌مرغ، نمک و شکر از سوپرمارکت خریداری شد.

روش‌ها

بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس: اسانس گل گیاه با روش کلونجر استخراج و به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) مدل Agilent 7890 A مجهز به ستون HP-5-MS به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت لایه ۲۵ میکرومتر متصل به طیف نگار جرمی مدل Agilent 5975 C تزریق شد. شناسایی طیف‌ها به کمک بانک اطلاعات جرمی، زمان بازداری (R_t)، شاخص کواتز (RI) و مقایسه با طیف‌های جرمی استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه دستگاه GC/MS صورت گرفت (۱۲).

بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی اسانس: جهت بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس (۷/۲۰-۰/۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از دو روش چاهک و ریز رقت استفاده شد. شاهد منفی ۵٪ DMSO و شاهد مثبت آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود. هاله‌های عدم رشد، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین شد. جهت تعیین MIC از اسانس، سریال‌های رقتی در محیط MHB به‌دست آمد. آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد. پس از تعیین MIC از تمامی لوله‌هایی که در آنها عدم رشد باکتری و قارچ مشاهده شد نمونه‌برداری شد و پس از کشت در پلیت حاوی مولر هینتون آگار پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شده، پلیت حاوی کمترین غلظت اسانس که در آن عدم رشد باکتری و قارچ قابل مشاهده است به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۳-۱۴).

تهیه تیمارهای مایونز: بر اساس مقادیر محاسبه شده از فعالیت ضد میکروبی اسانس در آزمون MIC و MBC، اسانس بومادران (۴/۵ و ۷/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) برای بررسی ویژگی‌های ضد باکتریایی به مایونز اضافه شد. یک نمونه مایونز با نگهدارنده سنتزی بنزوات- سوربات (۰/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شد (۱۵). یک نمونه سس مایونز نیز بدون هیچ‌گونه افزودنی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. دو نوع سس مایونز پرچرب (۶۵٪) و کم چرب (۳۰٪) در پایلوت تولید شد (۱۶). نمونه‌های مایونز به چهار گروه تقسیم شدند: EO (حاوی اسانس)، BS (بنزوات-سوربات)، C (کنترل بدون افزودن اسانس و میکروارگانیسم) و C_{mo} (کنترل بدون افزودن اسانس و حاوی میکروارگانیسم تلقیح شده). نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای بسته‌بندی شده و با فویل آلومونیوم پوشانده شدند و تا زمان انجام آزمایشات در دمای یخچال نگهداری شدند.

اندازه گیری pH: برای اندازه‌گیری pH مایونز پرچرب و کم چرب pH متر (Metrohm, Switzerland) در دمای محیط استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی: برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از محیط کشت نوترینت آگار شیب‌دار استفاده شد. بعد از کشت و ۲۴ ساعت انکوباتورگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد (۱۳-۱۴).

تلقیح میکروارگانیسم‌ها به مایونز: سوسپانسیون میکروبی *سالمونلا اینتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* به نمونه‌های مایونز تلقیح شد، به‌طوری که غلظت نهایی 10^3 CFU/g باشد. برای اطمینان از صحت تلقیح، کشت میکروبی انجام گرفت. میزان رشد میکروارگانیسم‌ها پس از زمان‌های ۷۲ ساعت، ماه‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ تعیین گردید. نتایج به‌صورت log 10 CFU/g گزارش شد.

جستجوی میکروارگانیسم‌ها : برای جستجوی *استافیلوکوکوس آرئوس* از محیط بردپارکر آگار، برای جستجوی *اشریشیاکلی* از محیط EC براث و برای جستجوی *سالمونلا اینتریتیدیس* از محیط سالمونلا شیگلا آگار و کشت سطحی و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد (۱۷).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تحلیل و ارزیابی آماری داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه داده‌ها (ANOVA) توسط نرم افزار (Stat-Ease, Expert Design (Inc., Minneapolis, MN, USA 8.0 برای تأیید وجود اختلاف بین داده‌ها انجام شد. نوع مطالعه response surface optimal، نوع طراحی D-optimal و مدل طراحی Quadratic بود ($P < 0.05$).

نتایج

بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس: نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس بومادران بر روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در جدول شماره ۱ آورده شده است. جدول ۲ نشان می دهد قوی‌ترین اثر و بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد، مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ۷/۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که در برخی غلظت‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک شیمیایی کلرامفنیکل (30µg/ml) بیشتر بود. همچنین با افزایش غلظت اسانس، قطر هاله عدم رشد افزایش یافته است.

جدول ۱- نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس بومادران

باکتری	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	۴/۵	۷/۲
سالمونلا اینتریتیدیس	۷/۲	-
اشریشیاکلی	۷/۲	-

نتایج برحسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است

جدول ۲- نتایج قطر هاله عدم رشد مربوط به اسانس بومادران در غلظت‌های مختلف و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل

باکتری	غلظت (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)										
	۰/۴۵	۱/۰۲	۱/۶۷	۲/۴۱	۳/۱۲	۳/۸۳	۴/۵	۵/۱۸	۵/۸۵	۶/۵۳	۷/۲۰	کلرامفنیکل
استافیلوکوکوس اورئوس	-	-	-	-	۵	۶	۷/۵	۸/۵	۹/۵	۱۰/۵	۱۷/۵	۹/۵
سالمونلا اینتریتیدیس	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۱/۵
اشریشیاکلی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۵/۵

نتایج برحسب میلی‌متر گزارش شده است؛ کلرامفنیکل (۳۰ µg/ml)

بررسی ویژگی‌های میکروبی سس مایونز: از آن‌جایی که سیستم‌های طبیعی معمولاً دارای پیچیدگی بیشتری نسبت به شرایط آزمایشگاهی هستند، لذا علاوه بر مطالعه خواص ضد میکروبی اسانس بومادران در محیط آزمایشگاهی، این ویژگی در سس مایونز و بر روی باکتری‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۳ جمعیت باکتریایی در انواع مایونزهای پرچرب و کم‌چرب در طول مدت ۶ ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است در هر دو نوع مایونز

حاوی نگهدارنده طبیعی (اسانس) و شیمیایی (بنزوات-سوربات)، سلول‌های زنده میکروبی در طول دوره نگهداری مشاهده نشدند.

جدول ۳- جمعیت باکتریایی (log10 CFU/g) در تیمارهای مختلف مایونز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

زمان نگهداری	تیمارها	*استافیلوکوکوس اورئوس*		*اشریشیاکلی*		*سالمونلا اینتریتیدیس*	
		مایونز پرچرب	مایونز کم‌چرب	مایونز پرچرب	مایونز کم‌چرب	مایونز پرچرب	مایونز کم‌چرب
۰	EO 4.5	-	-	-	-	-	-
	EO 7.2	-	-	-	-	-	-
	B+S 0.75	-	-	-	-	-	-
	C mo	۲/۱۳×۱۰^{۲}± ۰/۱۵^{a}	۹/۳×۱۰^{۱}± ۰/۳۰^{b}	۷/۲×۱۰^{۲}± ۰/۲^{c}	۴/۳۶×۱۰^{۲}± ۰/۳۷^{d}	۶/۱×۱۰^{۱}± ۰/۱۵^{e}	۵/۱×۱۰^{۲}± ۰/۱۰^{f}
	C	۴/۲۶×۱۰^{۱}± ۰/۱۵^{g}	-	-	-	-	-
۱	EO 4.5	-	-	-	-	-	-
	EO 7.2	-	-	-	-	-	-
	B+S 0.75	-	-	-	-	-	-
	C mo	۲/۴۳×۱۰^{۲}± ۰/۱۵^{a}	۱/۲×۱۰^{۲}± ۰/۲۶^{b}	۵/۵۶×۱۰^{۲}± ۰/۲۵^{h}	۳/۳۶×۱۰^{۲}± ۰/۳۵^{k}	-	-
	C	۲/۵۳×۱۰^{۱}± ۰/۳۰^{m}	-	-	-	-	-
۲	EO 4.5	-	-	-	-	-	-
	EO 7.2	-	-	-	-	-	-
	B+S 0.75	-	-	-	-	-	-
	C mo	۳/۳۳×۱۰^{۱}± ۰/۱۵^{n}	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-

EO 4.5: اسانس در غلظت ۴/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر

EO 7.2: اسانس در غلظت ۷/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر

B+S 0.75: بنزوات-سوربات در غلظت ۰/۷۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر

C mo: نمونه کنترل بدون افزودن اسانس و حاوی میکروارگانیسم تلقیح شده

C: نمونه کنترل بدون افزودن اسانس و میکروارگانیسم

در ماه سوم تا انتهای دوره نگهداری در هیچ کدام از نمونه‌ها رشد میکروبی مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

حساس‌ترین میکروارگانیسم به اسانس بومادران (کمترین MIC) در بین میکروارگانیسم‌های مورد بررسی *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاوم‌ترین آنها *سالمونلا اینتریتیدیس* و *اشریشیاکلی* بودند. اسانس‌ها اثرات ضد میکروبی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می‌کنند. این ترکیبات نفوذپذیری غشا را افزایش می‌دهند و با نفوذ در غشا منجر به متورم شدن غشا گردیده و فعالیت آن را تحت تاثیر قرار می‌دهند و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند شد (۱۸). فعالیت ضد میکروبی اسانس بومادران می‌تواند ناشی از حضور مقادیر زیاد کامفور، بورنئول، سینئول و آلفا کادینول در اسانس باشد (۱۹).

جدول ۱ و ۲ نشان می‌دهد که به‌طور معمول باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به اسانس حساس‌تر از باکتری‌های گرم‌منفی هستند. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق (بالاتر بودن MIC اسانس علیه باکتری‌های گرم‌منفی نسبت به باکتری‌های گرم‌مثبت) نیز حاکی از حساس‌تر بودن باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی بود. به دلیل وجود غشاهای خارجی نسبتاً نفوذ ناپذیر احاطه‌کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم‌منفی (لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی) منطقی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند (۱، ۲۰).

در تیمارهای مختلف مایونز، کلونی‌های *اشریشیاکلی* و *سالمونلا اینتریتیدیس* در نمونه‌های شاهد (C) مشاهده نشد. در مقابل، تعداد کلونی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از ۷۲ ساعت از تولید از CFU/g ۴/۲۶ × ۱۰^{۱} به CFU/g ۲/۵۳ × ۱۰^{۱} در ماه اول کاهش یافت. علت این امر، احتمالاً آلودگی عرضی با مواد اولیه به ویژه وجود تخم‌مرغ غیر

پاستوریزه، ظروف و وسایل آلوده و وسایل حمل و نقل آلوده است که باعث شده این باکتری پاتوژن برای روزها بقا پیدا کند. در نمونه‌های شاهد پرچرب تلقیح شده با *استافیلوکوکوس اورئوس*، تا دومین ماه نگهداری بقاء میکروارگانیسم مشاهده شد. تعداد کلونی‌ها پس از ۷۲ ساعت یک سیکل لگاریتمی کاهش پیدا کرد. احتمالاً شوک وارده بر باکتری هنگام ورود به محیط اسیدی، دلیل کاهش تعداد کلونی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده است. علاوه بر این در اولین ماه نگهداری اختلاف معنی‌داری با ماه صفر، مشاهده نشد. احتمالا دلیل آن این است که مرگ باکتری با تزاید آن برابری کرده است. به عبارت دیگر، بقاء باکتری با رشد و تزایدشان قابل مقایسه است. فاکتورهای بسیاری از جمله a_w پایین، pH، درجه حرارت، ویسکوزیته و غیره در این مسأله دخالت دارند. در مایونز کم‌چرب احتمالاً به دلیل عدم وجود تخم‌مرغ کامل، کلونی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نشد. مطالعات نشان داده است *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به رشد در مقادیر پایین pH و a_w می‌باشد. با این وجود در مایونز فاکتورهای دیگری را بجز pH در زمان بررسی ریسک خطر فرآورده باید مد نظر قرار داد. یکی از این فاکتورها تخم‌مرغ است. گزارش شده است تخم‌مرغ غیرپاستوریزه رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا اینتریتیدیس* را افزایش می‌دهد (۲۱-۲۳). اگرچه به کار بردن تخم‌مرغ غیرپاستوریزه از سال ۱۹۷۰ ممنوع شده است، با این وجود پاتوژن‌هایی از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا اینتریتیدیس* در مقادیر کم در تخم‌مرغ پاستوریزه می‌توانند وجود داشته باشند. استفاده از تخم‌مرغ پاستوریزه احتمال خطر با *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا اینتریتیدیس* را به حداقل می‌رساند.

همان‌گونه که از جدول ۴ مشخص است در انتهای دوره نگهداری هیچ‌گونه رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا اینتریتیدیس* مشاهده نشد. بنابراین مایونزی که تحت شرایط خوب تولید شده باشد ریسک خطر پاتوژن‌ها را ندارد (۲۴). برخی فاکتورها از جمله pH، مواد مغذی مانند چربی، پروتئین و کربوهیدرات‌ها، مقدار آب، درجه حرارت و حضور لیزوزیم در تخم‌مرغ کامل مسئول غیر فعال شدن سریع باکتری‌ها در مایونز است (۲۲، ۲۵). اولین فاکتور بازدارنده pH است. در این بررسی، pH حدود ۴ نمونه‌های مایونز، نزدیک حد تحمل بیشتر پاتوژن‌ها می‌باشد. اثر اسید استیک، با کاهش pH افزایش می‌یابد (۲۲). اثرات سینرژیستی اسید استیک و pH پایین در جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها نقش دارد. اثر این شرایط در غیر فعال‌سازی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا اینتریتیدیس* در مایونز قبلاً گزارش شده است (۲۱، ۲۶). حضور لیزوزیم در تخم‌مرغ به‌کار رفته در مایونز اثرات ضد میکروبی به ویژه علیه باکتری‌های گرم‌منفی دارد. نتایج مشابهی نیز از اثرات لیزوزیم علیه باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شده است (۲۲). اثرات سینرژیستی اسید استیک با لیزوزیم و دیگر مواد ضد میکروبی موجود در سفیده تخم‌مرغ در غیر فعال‌سازی *سالمونلا* در مایونز تأیید شد. نتایج مشابهی در مقایسه با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق گزارش شده است. این نتایج بیان می‌کنند فاکتورهای متعددی در بقاء باکتری‌ها مؤثر هستند که به‌طور مستقل یا سینرژیستی با ترکیبات دیگر فرآورده عمل می‌کنند (۲۲).

در مورد *اشریشیاکلی* بقا میکروبی تا پایان ماه اول در مایونزهای پرچرب و کم‌چرب مشاهده شد و بعد از ۱ ماه به سطوح غیرقابل تشخیص رسید، در حالی که *سالمونلا اینتریتیدیس* حساس‌ترین پاتوژن بود و کلونی‌های آن فقط ۷۲ ساعت پس از تولید

مایونز مشاهده شدند و پس از آن از بین رفتند. به عبارت دیگر، زمانی که *اشریشیاکلی* تلقیح شد، بقاء آن طولانی‌تر از زمان تلقیح *سالمونلا اینتریتیدیس* بود. بیشترین زمان بقاء، زمان تلقیح *استافیلوکوکوس اورئوس* به مایونزها مشاهده شد (۴/۵ و ۷/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). ترتیب مقاومت باکتریایی در نمونه کنترل به شرح زیر است: *استافیلوکوکوس اورئوس*> *اشریشیاکلی* > *سالمونلا اینتریتیدیس*

بنابراین *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به سایر پاتوژن‌ها مقاوم‌تر بود. از طرف دیگر *اشریشیاکلی* مقاوم‌تر از *سالمونلا اینتریتیدیس* بود. نتایج مشابهی در مورد بقاء *اشریشیاکلی* و *سالمونلا اینتریتیدیس* در مایونز گزارش شده است (۲۵، ۲۷). لاک و بورد در سال ۱۹۹۴ نتایج مشابهی در مورد بقاء *سالمونلا اینتریتیدیس* در مایونز بدست آوردند (۲۸-۲۹). بقاء بیشتر *اشریشیاکلی* در مایونز در دمای یخچال قبلاً گزارش شده است. دلیل این اختلافات می‌تواند شرایط تولید، نوع ترکیبات به‌کار رفته از جمله تخم‌مرغ پاستوریزه و غیر پاستوریزه، میزان تلقیح، نوع میکروارگانیسم‌ها، a_w، pH و غیره باشد (۲۳، ۲۵).

pH و اسیدیته اثر مهمی در کاهش این ارگانیسم‌ها دارند. برخی مطالعات تأیید می‌کند که فعالیت ضد باکتریایی اسید استیک بر روی *سالمونلا* و *استافیلوکوکوس* در مایونز بیشتر از اسید سیتریک (لیمو) است (۲۴، ۲۵). نمک و شکر نقش کمتری دارند اما یک اثر تعاملی با اسید استیک یا سرکه در جلوگیری از رشد پاتوژن‌های بیماری‌زا دارند. لشنر و زامپارینی مایونزهای تجاری را با *سالمونلا اینتریتیدیس* آلوده کردند و در معرض pH پایین قرار دادند و مرگ سلولی را مشاهده کردند (۸). بنابراین جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم‌منفی در مایونز در ترکیب با فاکتورهای نامبرده از جمله میزان pH ، اسیدیته و غلظت نمک می‌باشد (۲۵، ۳۰). اثرات pH، درجه حرارت، عوامل ضد میکروبی، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ماده غذایی، موقعیت فیزیکی اجزا و میکروارگانیسم‌ها در مایونز در این امر دخالت دارند (۳۰). همچنین تحقیقات نشان داده است که پودر خردل دارای اثرات باکتری‌کش علیه باکتری‌های پاتوژن است. آلیل ایزو تیوسیانات، ترکیب اصلی پودر خردل دارای پتانسیل ضد میکروبی است. برای مثال زمانی که خردل با اسید استیک ترکیب می‌شود اثرات آنها در کشتن یا جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن بیماری‌زا در محیط‌های مختلف افزایش می‌یابد (۲۵، ۲۷، ۳۱).

گزارشات بسیاری درباره تحمل مقاومت اسیدی *سالمونلا* و *اشریشیاکلی* بیان شده است. برخی محققین نیز گزارش کردند که به طور معمول گونه‌های *اشریشیاکلی* در مقایسه با *سالمونلا* در شرایط اسیدی زمان طولانی‌تری بقا می‌یابند و بنابراین می‌تواند در مواد غذایی اسیدی شامل مایونز هفته‌ها زنده باقی بماند (۲۲، ۲۴، ۲۷). مکانیسم دقیق تحمل محیط اسیدی در مورد *اشریشیاکلی* به درستی شناخته نشده است. بسیاری از گونه‌های *اشریشیاکلی* کلونی‌های موکوئید مرئی با لایه لزج پلی‌ساکارید متشکل از اسیدهای کلونیک تشکیل می‌دهند. این مسأله دلیل تحمل محیط اسیدی را توسط *اشریشیاکلی* روشن می‌کند. لایه لزج یک مرز فیزیکی محافظ در شرایط محیطی ایجاد می‌کند که نفوذ عوامل ضد میکروبی را به داخل سلول به تعویق می‌اندازد. از آنجا که بسیاری از پاتوژن‌های بیماری‌زا پلی ساکاریدهای خارجی تولید می‌کنند، لایه لزج *اشریشیاکلی* احتمالاً دارای امکانات شیمیایی یا ساختاری ویژه است که مقاومت به اسید را افزایش می‌دهد (۳۲).

از نقطه نظر پایداری میکروبی دو نوع مایونز تولید شده در این مطالعه، مایونزهای پرچرب در مقایسه با مایونزهای کم چرب، پایداری کمتری

نشان دادند که اشاره به حمایت چربی از رشد میکروارگانیسم‌ها دارد. مقاومت به غیر فعال شدن میکروارگانیسم‌ها در مایونز پرچرب نسبت به مایونز کم‌چرب، بیشتر به نظر می‌رسد. دلیل این امر در ترکیبات و فرمولاسیون هر دو نوع مایونز می‌باشد. pH کمتر مایونز کم‌چرب یک اثر کشنده در میکروارگانیسم‌های حساس به اسید مانند *اشریشیاکلی* دارد (۲۵). ژاو و دویل نشان دادند که *اشریشیاکلی*در مایونزهای پرچرب بیشتر از مایونز کم‌چرب بقا پیدا می‌کند. آنها نتیجه گرفتند که مایونز کم‌چرب حاوی ترکیبی با خاصیت ضد *E. Coli* است که در مایونز پرچرب موجود نمی‌باشد (۲۳).

سوربات پتاسیم اثر چندانی بر باکتری‌ها ندارد، اما بنزوات سدیم سرعت نابودی باکتری را تسریع می‌کند. سرعت بالای غیر فعال شدن میکروارگانیسم‌ها ناشی از واکنش‌های ضد میکروبی سینرژیستی بین ترکیبات سفیده تخم‌مرغ (لیزوزیم)، pH اسیدی، اسید استیک، بنزوات و سوربات است. (۳۲). هاتکاکس و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که افزودن بنزوات سدیم سرعت غیر فعال‌سازی *اشریشیاکلی* را در مایونزهای پرچرب و کم‌چرب افزایش داد (۲۵). ژاو و دویل در سال ۱۹۹۴ گزارش کردند اگرچه سوربات پتاسیم به تنهایی اثر کمی بر روی *اشریشیاکلی* در آب سیب دارند، حضور همزمان سوربات و بنزوات در کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها مؤثر است (۲۳). اثر ضد میکروبی اسید بنزوئیک روی دیواره سلولی و آنزیم‌های سیکل کربس ظاهر می‌شود. اسید پس از ورود به سلول یونیزه می‌شود و پروتون آزاد می‌کند و سبب ایجاد اختلال در تبادل مواد از دیواره سلولی می‌شود.

همان‌طور که قبلاً مشاهده شد فعالیت ضد میکروبی اسانس بومادران با کمترین MIC علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شد. در این مطالعه، حساسیت میکروارگانیسم‌ها به اسانس در شرایط آزمایشگاهی با مایونز متفاوت بود. برای مثال در شرایط آزمایشگاهی، باکتری‌های گرم‌مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم‌منفی به اسانس حساس‌تر بودند، ولی در مایونز از رشد هر دو گروه میکروبی جلوگیری شد. اثرات ضد میکروبی اسانس در مایونز، به ویژه علیه باکتری‌های گرم‌منفی بستگی به pH دارد. درصد چربی نسبت به pH تأثیر بیشتری بر اثر ضد باکتریایی اسانس می‌گذارد (۲۰). میزان پروتئین ماده غذایی نیز یک فاکتور مؤثر در اثرگذاری اسانس‌ها می‌باشد. برخی واکنش‌ها بین ترکیبات فنولیک و پروتئین‌ها و یا دیگر ترکیبات سلولی احاطه‌کننده غشای سلولی رخ می‌دهد که به عنوان مکان هدف اولیه برای اسانس هستند (۳۳). به نظر می‌رسد کربوهیدرات همانند چربی و پروتئین، باکتری‌ها را از عملکرد اسانس حفاظت نمی‌کند (۲۰)، ولی گوتیرز و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند کارایی اسانس در غلظت‌های بالای نشاسته کاهش می‌یابد. نشاسته موجود در مایونز مواد مغذی کافی برای رشد میکروارگانیسم‌ها فراهم نمی‌کند. سطح آب و یا نمک بالا عملکرد اسانس در مواد غذایی را تسهیل می‌کند. نمک، در شرایط مختلف به عنوان سینرژیسم یا آنتاگونیسم با اسانس یا ترکیبات آنها عمل می‌کند. ساختار فیزیکی ماده غذایی فعالیت ضد باکتریایی اسانس را محدود می‌کند. در امولسیون‌های روغن در آب بسته به اندازه ذرات امولسیون، باکتری می‌تواند در فیلم‌ها، کلونی‌ها یا به عنوان سلول‌های پلانکتونیک رشد کند (۲۰).

نتایج این پژوهش بیانگر اثرات مثبت اسانس بومادران بر سویه‌های میکروبی بوده و با توجه به این نتایج می‌توان به ساخت نگهدارنده‌هایی مناسب جهت از بین بردن میکروارگانیسم‌ها با استفاده از اسانس مذکور امیدوار بود.

References

1- Fisher K., Phillips K. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. Trends Food Sci Technol. 2008; 19 (3): 156-164.

2- Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiol. 2009; 26: 142–150.

3- Applequist W., Moerman D. Yarrow (Achillea millefolium L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity and Biomedical Research. Econ Botan. 2011; 65 (2): 209–225.

4- Manios S., Lambert R., Skandamis P.A. Generic model for spoilage of acidic emulsified foods: Combining physicochemical data, diversity and levels of specific spoilage organisms. Int J Food Microbiol. 2014; 170: 1–11.

5- Tayfur M., Cakır S., Orkun T., Ercan A., Yabanc N. Microbial quality of retail mayonnaise-base salads. African. J Microbiol Res. 2013; 20: 2269-2273.

6- Xiong R., Xie G., Edmondson A.S. The fate of *Salmonella enteritidis* PT4 in home-made mayonnaise papered with citric acid. Letter appl microbial. 1999; 28: 36-40.

7- Radford S.A., Board R.G. Review: fate of pathogens in home-made mayonnaise and related products. Food Microbiol. 1993; 10: 269–278.

8- Leuschner R.G.K., Zamparini J. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli 0157* and *Salmonella enterica serovar Enteritidis* in broth model systems and mayonnaise. Food Control. 2002; 13: 399–404.

9- Silva L., MeloFranco B.D.G. Application of oregano essential oil against *salmonella enteritidis* in mayonnaise salad. Int J Food Sci Nutr Eng. 2012; 2 (5): 70-75.

10- Sinaeyan S., Sani A.M. Antimicrobial activity of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and extract on *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae* in low fat mayonnaise. BTAIJ. 2014; 10 (24).

11- Hajmohammadi B., Ahmadi-Dastgerdi A. The Effect of Thyme *(Zataria multiflora* boiss*)* Essential Oil against Bacterial and Fungal strains in Vitro and in Mayonnaise. J Food Microbiol. 2020; In Press. [In Persian].

12- Adams R.P. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois, USA, 2007.

13- Bozin B., Mimica-Dukic N, Bogavac M., Suvajdzic L., Simin N., Samojlik I., Couladis M. Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerls.l. and *A. pannonica* Scheele Essential oils. Molecules. 2008; 13: 2058-2068.

14- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A., Akpulat H.A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium subsp. millefolium Afan.* (Asteraceae). J Ethnopharmacol. 2003; 87: 215–220.

15- Iran National Organization of Standardization. Mayonnaise & Salad dressings – Specifications and test methods. INSO 2454. 2nd Revision. 2014. [In Persian].

16- Ahmadi-Dastgerdi A, Ezzatpanah H, Asgary S, Dokhani S, Rahimi E, Gholami-Ahangaran M. Oxidative Stability Of Mayonnaise Supplemented With Essential Oil of *Achillea millefolium* Ssp *Millefolium* During Storage. Food Sci Technol. 2019; 13, 1: 34-41

17- Iran National Organization of Standardization. Microbiology of mayonnaise and salad sauce- Specifications and test methods. INSO 2965. 3rd. Revision. 2017. [In Persian].

18- Holley R.A., Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 2005; 22 (4): 273–292.

19- Ahmadi-Dastgerdi A., Ezzatpanah H., Asgary S., Dokhani S., Rahimi, E. Phytochemical, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil from flowers and leaves of *Achillea millefolium* subsp. millefolium. J Essent Oil Bear Pla. 2017; 20 (2): 395-409.

20- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. J Food Microbiol. 2004; 94: 223–253.

21- Gomez-Lucia E., Goyache J., Orden J., Domenech A., Javier Hernandez F., Ruiz-Santa-Quiteria J., Suarez G. Influence of temperature of incubation on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in home made mayonnaise. J Food Protect. 1990; 53(5): 386-390.

22- Raghubeer E., Ke J., Campbell M., Meyer R. Fate of Escherichia coli 0157:H7 and Other Coliforms in Commercial Mayonnaise and Refrigerated Salad Dressing. J Food Protect. 1994; 58(1): 13-18.

23- Zhao T., Doyle M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli O157:H7* in commercial mayonnaise. J Food Protect. 1994; 57: 780–783.

24- Smittle R.B. Microbiological safety of mayonnaise, salad dressings, and sauces produced in the United States: A Review. J Food Protect. 2000; 63(8):1144–1153.

25- Hathcox A., Beuchat L., Doyle M. Death of enterohemorrhagic *Escherichia coli O157:H7* in real mayonnaise and reduced-calorie mayonnaise dressing as influenced by initial population and storage temperature. Appl Environ Microbiol. 1995; 4172–4177.

26- Perales I., Garcia S.M. The influence of pH and temperature on the behaviour of Salmonella enteritidis phage type 4 in home-made mayonnaise.

Lett Appl Microbiol. 1990; 10: 19-22.

27- Rhee M.S., Lee S.Y., Dougherty R.H., Kang, D.H. Antimicrobial effects of mustard flour and acetic acid against *Escherichia coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica Serovar Typhimurium*. Appl Environ Microbiol. 2003; 2959–2963.

28- Lock J.L., Board R.G. The fate of *Salmonella enteritidis* PT4 in deliberately infected commercial mayonnaise. Food Microbiol. 1994; 11, 499–504.

29- Lock J.L., Board R.G. The fate of *Salmonella enteritidis* PT4 in home-made mayonnaise prepared from artificially inoculated eggs. Food Microbiol. 1995; 12, 181–186.

30- Hwang C., Marmer, B. Growth of *Listeria monocytogenes* in egg salad and pasta salad formulated with mayonnaise of various pH and stored at refrigerated and abuse temperatures. Food Microbiol. 2007; 24: 211–218.

31- Adeli Milani M., Mizani M., Ghavami M., Eshratabadi P. Comparative analysis of antimicrobial characteristics of mustard paste and powder in mayonnaise. Europ J Exper Biol. 2014; 4 (2): 412-418.

32- Erickson J., Stamer J., Hayes M., Mckenna D., Van Alstine L. An assessment of *Escherichia coli 0157:H7* contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior in low-pH dressings. J Food Protect. 1995; 58 (10):1059-1064.

33- 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, 463-470.

34- Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. Int J Food Microbiol. 2008; 124: 91–97.

The Evaluation of Antibacterial Effects of Essential Oil of Achillea *in vitro* and Food Model

Asiye Ahmadi-Dastgerdi[*1], Paniz Zinsaz[2], Neda Zohoorian[2]

1 - Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.Department of Bioinformatics, University of Zabol, Zabol.
2. Department of Food Science and Technology, Mamaghan Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Receive: June 10, 2019; Revise: September 16, 2019; Accept: September 27, 2019

Summary

The importance of food-borne disease and consumer demands for avoiding synthetic food preservatives shifted the research interest to natural food preservatives such as essential oils isolated from medicinal plants which have antimicrobial activity. The aim of this study was to evaluate the efficiency of *Achillea millefolium* essential oil as natural food preservative against foodborn pathogens such as *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, and Salmonella enteritidis* which were inoculated into high fat mayonnaise (65%) and low fat mayonnaise (30%) and kept during storage at 4 ºC for 6 months. The results showed that essential oils of *Achillea millefolium* had influence against all of the tested microorganisms *in vitro*, while Gram-positive bacteria was more sensitive to essential oil than Gram-negative bacteria. All of the pathogens did not grow in mayonnaise, whereas in the control sample, all of the microorganisms grew. The maximum cell counts of bacteria in low fat mayonnaise were approximately lower than the high fat mayonnaise and resistance to inactivation of microorganisms appeared to be greater in high fat mayonnaise than in low fat mayonnaise. Also low fat and high fat mayonnaise in BS samples exhibited antimicrobial properties against tested species during storage. By way of conclusion, the essential oil of *Achillea millefolium* would lead to control food pathogen organisms as a natural food preservative and therefore, it can be used as natural preservative in food industry.

Keywords: *Achillea, Antimicrobial properties, Essential oil, Mayonnaise*