

Antibacterial Effects of Cinnamaldehyde and Organic Acids, Alone and In Combination, against *Listeria monocytogenes*

Zolaikha Shiravani¹,
Javad Aliakbarlu²,
Hossein Tajik³

¹ MSc Student in Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

² Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

³ Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine Urmia University, Urmia, Iran

(Received January 11, 2016 ; Accepted March 15, 2016)

Abstract

Background and purpose: Recently, natural antimicrobials attracted a lot of attention due to increasing preference of consumers for organic products which are free of chemical additives. The aim of this study was to investigate the antibacterial activity of cinnamaldehyde in combination with acetic and lactic acids against *L.monocytogenes*.

Materials and methods: The antibacterial effects of cinnamaldehyde, acetic and lactic acids were determined using minimum inhibitory concentration (MIC). Fractional inhibitory concentration (FIC) was also used to evaluate the combined antibacterial activity.

Results: Based on our results, MIC values for cinnamaldehyde, acetic acid and lactic acid were 0.312, 2.5 and 5 µl/ml, respectively. FIC results showed that cinnamaldehyde combination with the organic acids had no interaction effects (1.0<FIC<4.0).

Conclusion: Cinnamaldehyde, acetic and lactic acids were found effective in inhibiting the growth of *L. monocytogenes*. Meanwhile, organic acids can reduce the required amount of cinnamaldehyde.

Keywords: cinnamaldehyde, acetic acid, lactic acid, antibacterial, *Listeria monocytogene*

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(138): 77-84 (Persian).

اثرات ضد باکتریایی سینامالدئید و اسیدهای آلی، به تنهایی و ترکیبی، علیه لیستریا مونوسیتوژنز

زلیخا شیروانی^۱

جواد علی اکبرلو^۲

حسین تاجیک^۳

چکیده

سابقه و هدف: اخیراً ترکیبات ضد میکروبی طبیعی به خاطر علاقمندی فزاینده مصرف کنندگان به محصولات ارگانیک که عاری از افزودنی‌های شیمیایی هستند، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. هدف این مطالعه بررسی فعالیت ضد باکتریایی سینامالدئید در ترکیب با اسید استیک و اسید لاکتیک علیه لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد.

مواد و روش‌ها: اثرات ضد باکتریایی سینامالدئید، اسید استیک و اسید لاکتیک با استفاده از روش حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین شد. هم‌چنین برای ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی ترکیبی از روش غلظت مهاری سهمی استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج این تحقیق، مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی به تنهایی برای سینامالدئید، اسید استیک و اسید لاکتیک به ترتیب ۰/۳۱۲، ۲/۵ و ۵ میکرولیتر بر میلی لیتر بود. روش غلظت مهاری سهمی نشان داد که سینامالدئید در ترکیب با اسیدهای آلی بدون اثر متقابل ($FIC < ۰/۴$) ($FIC < ۱/۰$) می‌باشد.

استنتاج: سینامالدئید، اسید استیک و اسید لاکتیک در ممانعت از رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز موثر بوده‌اند و استفاده از اسیدهای آلی، میزان مورد نیاز سینامالدئید را کاهش می‌دهند.

واژه های کلیدی: سینامالدئید، اسید استیک، اسید لاکتیک، ضد باکتریایی، لیستریا مونوسیتوژنز

مقدمه

گرفته‌اند (۲) و نیز استفاده از اسانس‌ها، به عنوان آنتی باکتریال‌هایی که ایمن Generally Regarded As Safe (GRAS) شناخته شده‌اند، مورد پذیرش گسترده مصرف کنندگان قرار گرفته است (۳). سینامالدئید یک آروماتیک آلدئیدی و جزء اصلی عصاره پوست دارچین (حدود ۶۵ درصد) است (۴، ۵) و با داشتن ساختار آلدئیدی، از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کند (۳). غشای باکتری‌ها شامل تعدادی از آنزیم‌ها با فعالیت

لیستریا مونوسیتوژنز، باکتری گرم مثبتی است که به طور گسترده در طبیعت یافت می‌شود و به دلیل توانایی رشد آن در دمای یخچال و غذاهای یخ زده، یک مشکل مهم برای تولیدکنندگان مواد غذایی محسوب می‌شود و لذا به عنوان پاتوژن غذایی مهم در سطح جهان شناخته شده است (۱). اخیراً به دلیل اولویت استفاده از محصولات ارگانیک عاری از مواد افزودنی برای مصرف کنندگان، ترکیبات ضد میکروبی طبیعی مورد توجه بیش تری قرار

E-mail: z.shiravani682@yahoo.com

مؤلف مسئول: زلیخا شیروانی - ارومیه گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۱۱/۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۲/۲۵

حداقل غلظت مهارکنندگی^۲ (MIC)، حداقل غلظت کشندگی^۳ (MBC) و غلظت مهاري سهمي^۴ (FIC) به روش استاندارد رقيق سازی در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سینامالدئید ۹۹ درصد از شرکت سیگما آلدریج (St. Louis, Mo. USA)، اسید استیک ۱۰۰ درصد، اسید لاکتیک ۹۰ درصد و دی متیل سولفوکسید^۵ (DMSO) از شرکت مواد شیمیایی مرک آلمان^۶ (Darmstadt, Germany)، محیط‌های کشت میکروبی Brain Heart Infusion Agar-BHIA و Brain Infusion Broth- BHIB Heart از شرکت بیولایف (Milano, Italia) بودند. باکتری مورد مطالعه باکتری لیستریا مونوسیتوزنز (ATCC 1163) از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری

ابتدا یک گرانول باکتری لیستریا مونوسیتوزنز از لوله‌های کرایو^۷ مورد نظر در شرایط سترون خارج و به ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI برآث منتقل شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. باکتری قبل از استفاده به‌طور متوالی دو بار تجدید کشت گردید. برای این منظور، ۴-۵ کلنی باکتری از BHI آگار به ۱۰ میلی‌لیتر BHI برآث منتقل شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. کشت دوم با انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به ۱۰ میلی‌لیتر BHI برآث تهیه و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ساعت نگهداری گردید. سپس از کشت ۲۰ ساعته، رقت لازم را تهیه و تعداد باکتری روی استاندارد ۰/۵ مک فارلند

ATPase و F₁F₀-ATPase است که در تولید ATP و تنظیم pH سلولی دخالت دارد^(۶). مکانیسم اثر سینامالدئید بر آنزیم F₁F₀-ATPase می‌باشد و تولید یون پتاسیم ATP را مهار می‌کند^(۷). سینامالدئید، فعالیت آنزیم ATPase غشا را در لیستریا مونوسیتوزنز مهار می‌کند^(۶)، اگرچه مهار این فعالیت‌ها بقای سلول را مختل خواهد کرد، ولی به‌عنوان یک علت مرگ ثانویه شناخته شده است^(۸). با این حال، مهار آنزیم نقش مهمی در کاهش رشد باکتری و در غلظت کشنده سینامالدئید دارد. هم‌چنین مهار غیر اختصاصی آنزیم‌های غشا می‌تواند توسط مولکول‌های کوچک آب‌گریز سینامالدئید باشد که احتمالاً به علت تغییرات در ساختار پروتئین‌ها به‌عنوان یک پیامد تعاملات آب‌گریزی می‌باشد^(۹). مزیت اصلی سینامالدئید این است که به‌عنوان فعالیت ضد میکروبی، نیازی به تماس مستقیم آن نیست^(۱۰) و به‌عنوان GRAS، توسط سازمان غذا و دارو ایالات متحده طبقه‌بندی شده است و برای استفاده در غذا تایید شده است^(۱۱، ۱۲) (21 CFR 182.60). اسیدهای آلی از جمله اسید استیک و اسید لاکتیک در سراسر طبیعت یافت می‌شوند. یکی از مهم‌ترین کاربردهای آن در صنایع غذایی است. آن‌ها به‌طور کلی در غذاهای مختلف به‌عنوان تنظیم‌کننده اسیدیته، عامل ضد میکروبی، طعم‌دهنده در ترشی یا طعم و بوی میوه اضافه می‌شوند^(۱۳). اثرات ضد میکروبی اسیدهای آلی به علت کاهش pH به‌کم‌تر از حداقل مورد نیاز برای رشد و بازدارندگی متابولیکی ناشی از مولکول‌های تفکیک نشده اسید می‌باشد^(۱۴). در این مطالعه، اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف سینامالدئید (۰/۰۳۹، ۰/۰۷۸، ۰/۱۵۶، ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵) و ۰/۰۱۹ میکرولیتر در میلی‌لیتر، اسید استیک (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۳۹/۰، ۱۵۶/۰، ۳۱۲/۶۲۵، ۰/۰۳۹/۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و اسید لاکتیک (۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) به‌تنهایی و ترکیبی در محیط آبگوشت مغز و قلب^۱ (BHI broth) جهت تعیین

2. Minimum inhibitory concentration
3. Minimum Bactericidal Concentration
4. Fractional inhibitory concentration
5. Dimethyl sulfoxide
6. Merck chemical company
7. Cryo tube

1. Brain Heart Infusion broth

معادل $10^8 \times 0.32$ cfu/ml تنظیم گردید و با رقیق سازی به 10^6 در محیط کشت BHI broth تهیه گردید. ابتدا یک گرانول باکتری لیستریا مونوسیتوژنز از لوله های کرایو Cryo tube مورد نظر در شرایط سترون خارج و به ۱۰ میلی لیتر محیط BHI برآث منتقل شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. باکتری قبل از استفاده به طور متوالی دو بار تجدید کشت گردید. برای این منظور، ۴-۵ کلنی باکتری از BHI آگار به ۱۰ میلی لیتر BHI برآث منتقل شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. کشت دوم با انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از سوپانسیون باکتری به ۱۰ میلی لیتر BHI برآث تهیه و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ساعت نگهداری گردید. سپس از کشت ۲۰ ساعته، رقت لازم را تهیه و تعداد باکتری روی استاندارد ۰/۵ مک فارلند معادل $10^8 \times 0.32$ cfu/ml تنظیم گردید و با رقیق سازی به 10^6 در محیط کشت BHI broth تهیه گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش رقیق سازی در میکروپلیت ۹۶ خانه ای

برای 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 سینامالدئید در دی متیل سولفو کسید (DMSO)، اسید استیک و اسید لاکتیک در آب مقطر استریل حل شدند و توسط صافی میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند. دامنه غلظتی سینامالدئید $0.19 - 2/5 \mu\text{l/mL}$ ، اسید استیک $0.39 - 10 \mu\text{l/mL}$ و برای اسید لاکتیک $0.156 - 20 \mu\text{l/mL}$ بود. در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه ای، ۹۵ μl محیط کشت BHI برآث و ۵ μl باکتری ریخته شد و ۱۰۰ μl از محلول استوک سینامالدئید، اسید استیک و اسید لاکتیک به اولین چاهک افزوده شدند، سپس ۱۰۰ μl از رقت های سریالی در ۷ چاهک پی در پی انتقال یافت. آخرین ستون به وسیله ۱۹۵ μl از BHI برآث و ۵ μl از باکتری پر شد و به عنوان شاهد منفی در

نظر گرفته شد. از اریترومیسین به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. حجم نهایی در هر چاهک ۲۰۰ μl بود. سپس میکروپلیت به وسیله پارافیلیم 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 به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. بعد از اتمام گرمخانه گذاری، کدورت یا عدم کدورت در چاهک ها به صورت چشمی مشاهده شد. اولین چاهک شفاف به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تست MBC از چاهک هایی که شفاف بودند و نشان دهنده عدم رشد باکتری بودند، به مقدار ۵ میکرولیتر برداشته شد و بر روی BHI آگار کشت سطحی داده شد (۱۵).

غلظت مهارتی سهمی (FIC)

در این آزمایش اثر ترکیبی سینامالدئید، اسید استیک و اسید لاکتیک در برابر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز مورد بررسی قرار گرفت. دامنه غلظتی این ترکیبات از دو برابر بیش تر از مقدار MIC تا حداقل چهار برابر کم تر از مقدار MIC برای این باکتری انتخاب گردید و چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه ای به شرح زیر پر گردید:

در ردیف اول، هر چاهک محتوی ۹۵ میکرولیتر BHI برآث، ۵ میکرولیتر باکتری (که تعداد آن روی 10^6 cfu/ml تنظیم گشته بود) و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف سینامالدئید بود. در ستون اول، هر چاهک محتوی ۹۵ میکرولیتر BHI برآث، ۵ میکرولیتر باکتری و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف اسید استیک یا اسید لاکتیک است. بقیه چاهک ها حالات ترکیبی سینامالدئید با اسید استیک یا اسید لاکتیک بودند. پس محتوی ۹۵ میکرولیتر BHI برآث، ۵ میکرولیتر باکتری و ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف سینامالدئید و ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف اسید استیک یا اسید لاکتیک بودند. سپس به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید و بر اساس مشاهدات چشمی و میزان

بحث

برآوردهای اخیر نشان می‌دهد که میانگین هزینه سالانه بیماری‌های ناشی از مواد غذایی در ایالات متحده برای لیستریا مونوسیتوژنز، ۲/۰۴ میلیارد دلار و برای تیپ اشریشیا کولای O₁₅₇:H₇، ۶۳۵ میلیون دلار بوده است (۱۷). شیوع بیماری لیستریوز با شیر خام یا غیر پاستوریزه و محصولات لبنی در ارتباط بوده است (۱۸). بنابراین استراتژی‌های مداخله گر موثر در صنایع غذایی برای کنترل رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن و فاسد کننده برای اطمینان از کیفیت میکروبی و ایمنی غذاهای مصرف کننده، کارآمد و مقرون به صرفه است (۱۹). برای حداقل فرآیند مواد غذایی، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی گزینه‌ای قابل دسترس است (۲۰).

گزارش‌ها حاکی از آن است که بسیاری از اسانس‌های گیاهی، دارای اثر بازدارندگی قابل توجهی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند (۲۱). مطالعات بسیاری جهت مشخص کردن اثرات ترکیبات به دست آمده از اسانس ادویه‌ها و گیاهان معطر بر روی میکروارگانیسم‌های مختلف صورت گرفته است.

Sanla-Ead و همکاران در سال ۲۰۱۲، اثر ضد باکتریایی سینامالدئید علیه لیستریا مونوسیتوژنز را بررسی کردند. MIC سینامالدئید علیه باکتری مذکور برابر با ۶/۲۵ µl/mL بود (۲۲).

Shen و همکاران در سال ۲۰۱۵، اثر ضد باکتری سینامالدئید علیه *E. coli* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را بررسی کردند. MIC سینامالدئید علیه باکتری‌های مورد مطالعه ۰/۳۱ mg/mL به دست آمد (۲۳).

Ye و همکاران در سال ۲۰۱۳، اثر ضد باکتری سینامالدئید را بر *E. coli* بررسی کردند. MIC سینامالدئید علیه باکتری مورد مطالعه ۰/۳۱ mg/mL به دست آمد (۲۴). در مطالعه دیگری، Pei و همکاران در سال ۲۰۰۹، اثر ضد باکتری سینامالدئید علیه *E. coli* را بررسی کردند. MIC سینامالدئید علیه باکتری مورد مطالعه ۴۰۰ mg/L به دست آمد (۲۵). اثر ضد باکتریایی سینامالدئید، تیمول

کدورت FIC تعیین گردید. در این آزمایش، $FIC > 0.5$ جز سینرژیک‌ها، $0.75 < FIC < 0.5$ سینرژیک نسبی، $1.0 < FIC < 0.75$ دارای اثر افزایشی، $4.0 < FIC < 1.0$ بی‌اثر و $FIC < 4.0$ جز آنتاگونیست‌ها تقسیم گردید (۱۶).

یافته‌ها

نتایج MIC و MBC مواد ضد باکتریایی به‌تنهایی

نتایج این مطالعه نشان داد که سینامالدئید اثر ضد باکتریایی قوی‌تری نسبت به دو اسید آلی دارد و هم‌چنین اسید استیک نشان داد که اثر ضد باکتریایی قوی‌تری نسبت به اسید لاکتیک دارد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: نتایج MIC به‌تنهایی و MBC سینامالدئید، اسید استیک و اسید لاکتیک بر لیستریا مونوسیتوژنز

ترکیب استفاده شده	MIC (µl/mL)	MBC (µl/mL)
سینامالدئید	۰/۳۱۲	۰/۳۱۲
اسید استیک	۲/۵	۵
اسید لاکتیک	۵	۵
اریترومايسين (µg/mL)	۸	-

نتایج MIC ترکیبی و FIC مواد ضد باکتریایی به صورت ترکیبی

جدول شماره ۲، MIC ترکیبی و FIC سینامالدئید در ترکیب با اسیدهای آلی را نشان می‌دهد. MIC ترکیبی سینامالدئید + اسید استیک نسبت به سینامالدئید + اسید لاکتیک قوی‌تر بود. مقادیر MIC ترکیبی این مواد نسبت به MIC آن‌ها به‌تنهایی نشان می‌دهد که نیاز به غلظت‌های کم‌تری از سینامالدئید و اسیدهای آلی برای مهار رشد لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد. FIC ترکیبات ضد باکتریایی سینامالدئید + اسید استیک و سینامالدئید + اسید لاکتیک نشان می‌دهد که این ترکیبات بدون اثر متقابل نسبت به هم علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز هستند.

جدول شماره ۲: MIC ترکیبی و FIC سینامالدئید، اسید استیک و اسید لاکتیک بر لیستریا مونوسیتوژنز

ترکیب استفاده شده (A)	ترکیب استفاده شده (B)	MIC ترکیبی (µl/mL)	FIC (µl/mL)	شاخص عملکرد
A	B	A	B	
سینامالدئید	اسید استیک	۰/۳۱۲	۰/۱۵	۱/۰۶۳
سینامالدئید	اسید لاکتیک	۰/۳۱۲	۰/۳۱	۱/۰۶۳

پاتوژن‌های ناشی از مواد غذایی شامل /شریشیاکولای O₁₅₇: H₇، لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و دیگر باکتری‌های توکسین‌زا در محصولات غذایی وجود دارد (۲۹، ۳۰).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در تحقیق حاضر اثر ضد باکتریایی سینامالدئید و اسیدهای آلی روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده توان بالای فعالیت ضد باکتریایی سینامالدئید علیه رشد لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد. بنابراین با توجه به عوارض منفی و شناخته شده نگه‌دارنده‌های شیمیایی، می‌توان از این ترکیبات در جهت محافظت از غذا و کنترل میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن به جای نگه‌دارنده‌های شیمیایی استفاده کرد. استفاده از اسیدهای آلی می‌تواند میزان مورد نیاز سینامالدئید را کاهش دهد.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مراتب سپاس خود را از همکاری مسئولین محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به دلیل تامین بودجه پژوهشی این مطالعه اعلام می‌دارند. هم‌چنین از همکاری آقای علی کاظم نیا (کارشناس آزمایشگاه) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

و کارواکرول به تنهایی و ترکیبی علیه سالمونلا تیفی موریوم بررسی شده است. نتایج نشان داد که این مواد در حالت ترکیبی دارای اثر سینرژیستی می‌باشند و در حالت ترکیبی در مقایسه با حالت استفاده تکی نیاز به دوز کم‌تری از این مواد ضد باکتریایی می‌باشد (۲۶). Jang و همکاران در سال ۲۰۰۷، اثر اسید استیک را علیه لیستریا مونوسیتوژنز بررسی کردند. MIC اسید استیک برابر با ۲۵۰۰ ppm از رشد این باکتری جلوگیری کرد (۲۷). این یافته با MIC تحقیق حاضر یکسان است. Zhou و همکاران در سال ۲۰۰۷، نشان دادند که رشد سالمونلا تیفی موریوم در محیط کشت مولر-هیتون براث حاوی تیمول، کارواکرول، EDTA، استیک اسید، لاکتیک اسید و سیتریک اسید با غلظت‌های به ترتیب ۴۰۰ mg/L، ۴۰۰ µl/L، ۴۰۰ mg/L، ۳۰۰ mg/L، ۰/۲ درصد حجمی / حجمی، ۰/۲ درصد حجمی / حجمی، ۰/۲ درصد حجمی / حجمی به‌طور معنی‌داری مهار شد و تمامی نتایج ترکیبی تیمول یا کارواکرول با استیک اسید کاهش معنی‌داری در رشد سالمونلا تیفی موریوم داشتند (۲۸). Ahn و Shin در سال ۱۹۹۹، انواع متفاوتی از اسیدهای آلی که اثرات مهارتی ضد میکروبی در برابر میکروارگانیسم‌های مختلف دارند را گزارش کردند. فعالیت‌های ضدباکتریایی اسیدهای آلی در برابر

References

- James MJ, Martin JL, David AG. Modern food microbiology. 7th ed. New York: Springer US, 2005.
- Cho KH, Park SC. Antibacterial effects on *Bacillus stearothermophilus* by adding natural grapefruit seed extracts in soymilk. J Korean Ind Eng Chem 2005; 16(1): 139-143.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -- a review. Int J Food Microbiol 2004; 94(3): 223-253.
- Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology 2005; 22(4): 273-292.
- Lens-Lisbonne C, Cremieux A, Maillard C, Balansard G. Methods for evaluation of antibacterial activity of essential oils: application to essences of thyme and cinnamon. J Pharm Belg 1987; 42(5): 297-302.
- Shabala L, Budde B, Ross T, Siegmund H, Jakobsen M, McMeekin T. Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability revealed by a novel

- combination of fluorescence microscopy and microelectrode ion-selective techniques. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(4): 1794-1802.
7. Gill AO, Holley RA. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol* 2006; 111(2): 170-174.
 8. Gill AO, Holley RA. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol* 2006; 108(1): 1-9.
 9. Sikkema J, De Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 1995; 59(2): 201-222.
 10. Amalaradjou MA, Baskaran SA, Ramanathan R, Johny AK, Charles AS, Valipe SR, et al. Enhancing the thermal destruction of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef patties by trans-cinnamaldehyde. *Food Microbiol* 2010; 27(6): 841-844.
 11. Sivakumar D, Wijeratnam RW, Abeyesekere M, Wijesundera RLC. Combined effect of Generally Regarded As Safe (GRAS) compounds and *Trichoderma harzianum* on the control of postharvest diseases of rambutan. *Phytoparasitica* 2002; 30(1): 43-51.
 12. Mani-Lopez E, García HS, López-Malo A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International* 2012; 45(2): 713-721.
 13. Pomeranz Y. Wheat: chemistry and technology, 3rd ed. USA: American Association of Cereal Chemists, 1988.
 14. Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(5): 2001-2005.
 15. Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J Ethnopharmacol* 2008; 116(3): 403-406.
 16. Murdock C, Cleveland J, Matthews KR, Chikindas ML. The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7. *Lett Appl Microbiol* 2007; 44(3): 255-261.
 17. Scharff RL. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J Food Prot* 2012; 75(1): 123-131.
 18. Control CfD, Prevention. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/082712/indexhtml> Accessed on. 2011; 30(11): 2012.
 19. Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001; 91(3): 453-462.
 20. Tserennadmid R, Takó M, Galgóczy L, Papp T, Pesti M, Vágvölgyi C, et al. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int J Food Microbiol* 2011; 144(3): 480-486.
 21. Zheng L, Bae Y-M, Jung K-S, Heu S, Lee S-Y. Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. *Food Control* 2013; 32(2): 665-672.
 22. Sanla- Ead N, Jangchud A, Chonhenchob V, Suppakul P. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-

- based Packaging Films. *Packaging Technology and Science* 2012; 25(1): 7-17.
23. Shen S, Zhang T, Yuan Y, Lin S, Xu J, Ye H. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. *Food Control* 2015; 47: 196-202.
24. 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): 619-623.
25. 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): 379-383.
26. Zhou F, Ji B, Zhang H, Jiang H, Yang Z, Li J, et al. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Safety* 2007; 27(2): 124-133.
27. 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. *Kor J Env Hlth* 2007; 33(5): 403-407.
28. Zhou F, Ji B, Zhang H, Jiang H, Yang Z, Li J, et al. Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against *Salmonella Typhimurium*. *J Food Prot* 2007; 70(7): 1704-1709.
29. Dubal ZB, Paturkar AM, Waskar VS, Zende RJ, Latha C, Rawool DB, et al. Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. *Meat Sci* 2004; 66(4): 817-821.
30. 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): 1178-1183.