

بررسی اثر ضدباکتریایی تیمول، کارواکرول، اوژنول و منتول بر چهار باکتری مولد فساد در محصولات کشاورزی و لبنیات

سپیده عباس زاده^۱، عقیل شریف زاده^۲، محبوبه باقری^{۳*}

۱- مرکز تحقیقات بهداشت و دانشکده بهداشت، پژوهشکده سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات قارچ شناسی، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۷/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۷/۲۳)

چکیده

بالا رفتن سطح آگاهی مردم نسبت به اثرات منفی نگهدارنده های شیمیایی منجر به انجام تحقیقات بیشتر در زمینه اثر ضد میکروبی اسانس های گیاهی و پتانسیل آنها برای استفاده به عنوان ترکیبات نگهدارنده شده است. در این مطالعه اثر ضد میکروبی ترکیبات تیمول، کارواکرول، اوژنول و منتول که از مواد موثره شناخته شده و فراوان در اسانس های گیاهی مختلف هستند بر باکتری های باسیلوس سرئوس (PTCC 1154)، سودوموناس نیگریفاسینس (ATCC19375)، اروینیا کاروتوورا (PTCC 1675) و زانتوموناس کامپستریس (PTCC 1473) به روش میکرودايلوشن و انتشار دیسک بررسی شد. در روش میکرودايلوشن، کمترین غلظت بازدارنده رشد ۵۰ پی پی ام گزارش شد که مربوط به اثر ترکیب تیمول بر سودوموناس نیگریفاسینس، اروینیا کاروتوورا و باسیلوس سرئوس بود. در حالیکه بیشترین غلظت بازدارنده رشد برای سودوموناس نیگریفاسینس مربوط به ترکیب منتول (۱۰۰ پی پی ام) و برای باسیلوس سرئوس، اروینیا کاروتوورا و زانتوموناس کامپستریس مربوط به ترکیب اوژنول (به ترتیب ۱۲۵، ۱۲۵ و ۱۰۸ پی پی ام) تعیین شد. بزرگترین هاله مهار رشد با قطر ۸/۸ میلی متر مربوط به اثر منتول بر سودوموناس نیگریفاسینس بود و کوچکترین هاله مهار رشد با قطر ۵/۸ میلی متر مربوط به اثر اوژنول بر اروینیا کاروتوورا بود. منتول نسبت به سایر ترکیبات اثر ضد میکروبی قویتری نشان داد و اوژنول ضعیف ترین اثر را داشت ($p\text{-value} < 0.05$). این در حالیست که هر چهار ترکیب درجات مختلفی از اثر ضد میکروبی بر میکروارگانیسم های مولد فساد را داشتند و پتانسیل آنها برای استفاده به عنوان ترکیبات نگهدارنده نشان داده شد.

کلید واژگان: تیمول، کارواکرول، اوژنول، منتول، ضد میکروبی

*مسئول مکاتبات: ma.bagheri@uk.ac.ir

۱- مقدمه

مواد غذایی سرشار از مواد مغذی برای رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشند و به ندرت استریل هستند. تنوع میکروب‌های موجود در آنها بستگی به میکروارگانیسم‌هایی دارد که به غذا دسترسی پیدا کرده‌اند [۱]. باکتری‌های باسیلوس سرئوس، سودوموناس نیگریفاسینس، اروینیا کاروتورا و زانتوموناس کامپستریس از گونه‌هایی هستند که در مواد غذایی یافت می‌شوند. باسیلوس سرئوس در خاک، سبزی‌ها و مواد غذایی خام و فراوری شده یافت می‌شود و آلودگی شیر و لبنیات به آن رایج است [۲]. این میکروارگانیسم می‌تواند موجب ایجاد طعم تلخ در لبنیات شود و توکسین آن برای انسان بیمارزا است. گونه‌های جنس سودوموناس در شیر و محصولات لبنی ایجاد فساد می‌کنند و موجب بو و طعم نامطلوب، تغییر رنگ، تولید گاز و لزجی محصول می‌شوند، به عنوان مثال سودوموناس نیگریفاسینس در کره عامل تغییر رنگ سیاه می‌باشد [۳]. اروینیا کاروتورا و زانتوموناس کامپستریس نیز از گونه‌های پراهمیت مولد فساد در محصولات کشاورزی هستند. اروینیا کاروتورا عامل بیماری فساد نرم باکتریایی در سبزی‌ها مثل هویج، پیاز، سیب‌زمینی، گوجه و کاهو می‌باشد و زانتوموناس کامپستریس با آلوده کردن بافت سبزی، میوه و گیاه و مهار رشد جوانه موجب خسارات چشمگیر در کشاورزی می‌شود [۴، ۵]. برای حفاظت مواد غذایی در برابر میکروارگانیسم‌ها از مواد متنوع سنتزی و یا طبیعی به عنوان نگهدارنده و یا ضدعفونی‌کننده استفاده می‌شود. از آنجا که سبزی‌ها معمولاً با حداقل فراوری مصرف می‌شوند، شستشو و ضدعفونی آنها بسیار اهمیت دارد تا بتوان احتمال انتقال بیماری را به حداقل رساند و ماندگاری محصول را افزایش داد [۶]. هیپوکلریت‌ها از ترکیبات رایج مورد استفاده برای ضدعفونی سبزی‌ها هستند ولی به خاطر احتمال تولید ترکیبات کلرینه و مضرات این ترکیبات، استفاده از اسانس‌های گیاهی و مواد طبیعی برای ضدعفونی مورد توجه قرار گرفته است [۷]. از طرفی، امروزه مصرف‌کنندگان نسبت به اثرات منفی احتمالی افزودنی‌های شیمیایی در مواد غذایی آگاهی بیشتری کسب کرده‌اند، به طوریکه شاهد افزایش

روزافزون تقاضا برای مواد غذایی تازه و فاقد مواد شیمیایی می‌باشیم. این رویکرد مصرف‌کنندگان به همراه نیاز به فراورده‌های غذایی با ماندگاری طولانی، موجب علاقه به انجام پژوهش‌های بیشتر در زمینه اثر ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی و پتانسیل آنها برای استفاده به عنوان ترکیبات نگهدارنده شده است.

اسانس‌های گیاهی دارای ترکیبات متعددی هستند و مونوترپن‌ها حدود ۹۰ درصد این ترکیبات را تشکیل می‌دهند [۸]. تیمول، کارواکرول، اوژنول و متول از مواد موثره شناخته شده و فراوان در اسانس‌های گیاهی مختلف هستند. تیمول مولکولی فنولی و از ترکیبات اصلی اسانس گیاه مرزنجوش^۱ و آویشن^۲ می‌باشد و خاصیت ضد میکروبی این اسانس‌ها عمدتاً مربوط به این ترکیب است [۹، ۱۰]. کارواکرول نیز از ترکیبات اصلی اسانس گیاه مرزنجوش می‌باشد. بر اساس مطالعات انجام شده، این ترکیب خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد حشره‌ای دارد و هیچ اثر سمی‌ای برای آن گزارش نشده است [۱۱، ۱۲]. اوژنول ترکیب اصلی اسانس گیاه میخک^۳ است و به میزان کمتر در دارچین دیده می‌شود. این ترکیب یک آنتی‌اکسیدان فنولی و از ترکیبات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی است [۱۳]. متول نیز ترکیبی است که در اسانس گیاهان خانواده نعنائیان وجود دارد و اثرات ضد قارچی و ضد مخمری آن در مطالعات متعددی گزارش شده است [۱۴، ۱۵]. مطالعات زیادی اثرات این ترکیبات را بر باکتری‌های بیماری‌زای غذا-زاد^۴ و قارچ‌ها و توانایی تولید توکسین توسط این میکروارگانیسم‌ها مورد بررسی قرار داده‌اند، ولی این تحقیقات عمدتاً محدود به قارچ‌های مولد فساد و باکتری‌های بیماری‌زای پرحدت و یا شایع بوده است و در خصوص اثر ضدباکتریایی ترکیبات ذکر شده بر باکتری‌های مولد فساد در سبزی‌ها تحقیقات کمتری انجام شده است. در این مطالعه اثر تیمول، کارواکرول، اوژنول و متول بر چهار میکروارگانیسم بیماری‌زا و یا مولد فساد بررسی شده است.

1. *Origanum vulgare*2. *Thymus vulgaris*3. *Eugenia caryophyllata*

4. Food-borne pathogens

۲- مواد و روش کار

۲-۱- تهیه سویه های میکروبی و اجزاء اسانس

باکتری های باسیلوس سرئوس (PTCC 1154)، سودوموناس نیگریفاسینس (ATCC 19375)، اروینیا کاروتوورا (PTCC 1675) و زانتوموناس کامپسترینس (PTCC 1473) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران و گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند. باکتری ها در آگوست BHI کشت داده شده و ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردیدند. از این کشت ها برای تهیه سوسپانسیون سلولی با جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (حاوی 10^8 واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر) (BioPhotometer, Eppendorf, Germany) استفاده شد. اجزاء شیمیایی اسانس های گیاهی شامل تیمول، کارواکرول، اوژنول و منتول از شرکت سیگمای آلمان خریداری شدند.

۲-۲- بررسی خواص ضدباکتریایی اجزاء

اسانس به روش میکرودايلوشن^۵ (ریزرت)

حداقل غلظت بازدارنده (MIC) چهار ترکیب تیمول، کارواکرول، اوژنول و منتول برای هر چهار سویه به روش میکرودايلوشن تعیین شد. بدین منظور، غلظت های مختلف اجزاء شیمیایی (۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ پی پی ام) در حضور ۰/۵٪ دی متیل سولفوکساید (DMSO) در آگوست BHI تهیه شد و از هر رقت ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه ای اضافه شد. سپس به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی افزوده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. کمترین غلظتی که در آن ۱۰۰٪ مهار رشد باکتری در مقایسه با چاهک کنترل (فاقد اسانس) مشاهده شد به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) تعیین گردید. آزمون ها به صورت دوگانه^۶ انجام شد و هر یک سه مرتبه تکرار شدند.

۲-۳- بررسی خواص ضدباکتریایی اجزاء

اسانس با استفاده از روش انتشار دیسک

ابتدا ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف اجزاء شیمیایی (۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ پی پی ام) به روی دیسک ها ریخته شد و در زیر هود میکروبی خشک شدند. سپس پلیت های حاوی آگار BHI با استفاده از سواب آغشته به سوسپانسیون سلولی باکتری های مختلف با 10^8 OD تلقیح شده و دیسک ها در مرکز پلیت ها قرار داده شد. گرمخانه گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت انجام شد و قطر هاله مهار رشد اطراف دیسک اندازه گیری شد و نتیجه بر حسب میلی متر گزارش گردید. آزمون ها به صورت دوگانه انجام شد و هر یک سه مرتبه تکرار شدند.

۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

میانگین و انحراف معیار داده ها محاسبه شد. سپس آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد و $p\text{-value} < 0.05$ به عنوان معنی دار تلقی گردید.

۳- نتایج و بحث

نتایج مربوط به اندازه گیری حداقل غلظت بازدارنده رشد هر یک از اجزاء اسانس برای چهار سویه باکتریایی مورد بررسی در جدول ۱ نمایش داده شده است. بر این اساس بیشترین غلظت بازدارنده رشد (کمترین حساسیت به ترکیب) برای سودوموناس نیگریفاسینس مربوط به ترکیب منتول (۱۰۰ پی پی ام) و برای باکتری های باسیلوس سرئوس، اروینیا کاروتوورا و زانتوموناس کامپسترینس مربوط به ترکیب اوژنول (به ترتیب ۱۲۵، ۱۲۵ و ۱۰۸ پی پی ام) بود. همچنین کمترین MIC (بیشترین حساسیت به ترکیب) در خصوص سودوموناس نیگریفاسینس و اروینیا کاروتوورا برای ترکیب تیمول (۵۰ پی پی ام) گزارش شد، در حالیکه برای زانتوموناس کامپسترینس کمترین MIC مربوط به منتول (۵۸ پی پی ام) و برای باسیلوس سرئوس، مربوط به تیمول و منتول (۵۰ پی پی ام) بود.

5. microdilution
6. duplicate

Table 1 Minimum inhibitory concentration (ppm) of essential oil components for studied bacterial indicators

	<i>Pseudomonas nigrifaciens</i>	<i>Xanthomonas campestris (PTCC1473)</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Bacillus cereous (PTCC1154)</i>
Thymol	^a 50±0.0	75±0.0 ^{b**}	50±0.0 ^a	50±0.0 ^a
Carvacrol	67±14.4 ^{ab}	67±14.4 ^b	100±0.0 ^b	75±0.0 ^B
Menthol	100±0.0 ^c	58±14.4 ^a	100±0.0 ^b	50±0.0 ^a
Eugenol	92±14.4 ^b	108±14.4 ^c	125±0.0 ^c	125±0.0 ^b

*mean value±standard deviation

**Dissimilar letters indicate significant differences (p-value<0.05)

در جدول شماره ۲ نتایج بررسی اثر ضدباکتریایی اجزاء اسانس به روش انتشار دیسک نمایش داده شده است. بزرگترین هاله مهار رشد با قطر ۸/۸ میلی متر مربوط به اثر ضد میکروبی اروینیا کاروتوورا بود. کوچکترین هاله مهار رشد با قطر ۵/۸ مربوط به اثر اوژنول بر ترکیب منتول در برابر سودوموناس نیگریفاسینس بود و

Table 2 growth inhibitory zone (millimeter) of essential oil components by disk diffusion method

Disk(mm)	<i>Pseudomonas nigrifaciens</i>	<i>Xanthomonas campestris(PTCC1473)</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Bacillus cereous(PTCC1154)</i>
Thymol	7.7±0.29 ^{*a}	7.3±0.50 ^{ab**}	6.5±0.29 ^{ab}	7.2±0.29 ^a
Carvacrol	7.7±0.29 ^a	6.8±0.76 ^a	6.8±0.29 ^{ab}	7.3±0.29 ^a
Menthol	8.8±0.76 ^b	7.8±0.76 ^b	7.2±0.29 ^a	7.7±0.29 ^a
Eugenol	7±0.50 ^a	6.5±0.50 ^a	5.8±0.29 ^b	6±0.50 ^b

standard deviation±*mean value

**Dissimilar letters indicate significant differences (p-value<0.05)

منتول ایجاد شده بود. این نتایج حاکی از آن است که منتول یک ترکیب ضدباکتریایی قوی است و پتانسیل زیادی برای استفاده در مواد غذایی دارد. اثرات ضدقارچی و ضدخمیری آن نیز در مطالعات متعددی گزارش شده است [۱۸].

سویه‌های سودوموناس نیگریفاسینس، اروینیا کاروتوورا و باسیلوس سرئوس بیشترین حساسیت را به ترکیب تیمول نشان دادند. اثر ضد میکروبی این ترکیب بر میکروارگانیسم‌های متعددی نشان داده شده است [۱۹-۲۵]. در سال ۲۰۱۰ ماستروماتئو و همکاران از تیمول در بسته‌بندی فعال میگوی پوست کنده شده استفاده کردند و نشان دادند که استفاده از تیمول در پوشش محصول می‌تواند اثر ملایم ضد میکروبی بر باکتری‌های مزوفیل و سایکروفیل داشته باشد و این اثر وابسته به دوز بود [۹]. تیمول ماهیت آبگریز دارد؛ بنابراین با لیپیدهای غشاء سیتوپلاسمی وارد تعامل می‌شود و منجر به از دست رفتن یکپارچگی و نشت مواد سلولی مانند یون‌ها، اسیدهای نوکلئیک و ATP به خارج سلول می‌گردد [۲۵].

از سوی دیگر، هر چهار سویه مورد بررسی درجات متوسطی از حساسیت به ترکیب کارواکرول نشان دادند. در تحقیقات

ترکیبات اسانس‌ها عمدتاً بر غشاء سلول اثر می‌گذارند و میزان نفوذپذیری غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها به ترکیبات اسانس عمدتاً بستگی به هیدروفوب بودن این ترکیبات و ساختار دیواره سلولی دارد. بنابراین میکروارگانیسم‌های مختلف، بر اساس ساختار متفاوت غشاء سلولی و گرم مثبت یا گرم منفی بودن، می‌توانند به اسانس‌ها و ترکیبات آنها پاسخ متفاوتی نشان دهند [۱۶]. در باکتری‌های گرم منفی، ترکیبات هیدروفوب موجود در اسانس‌ها از طریق پروتئین‌های پورین موجود در غشاء سیتوپلاسمی قادرند به پری‌پلاسم باکتری دسترسی پیدا کنند و یکپارچگی غشاء را خدشه‌دار کنند. آسیب‌های بیشتر به میکروارگانیسم می‌تواند مربوط به ایجاد اختلال در جذب مواد مغذی، سنتز اسید نوکلئیک، فعالیت ATPase، هموستاز سلول باشد [۱۷]. بر اساس نتایج در هر چهار سویه باکتریایی مورد بررسی، دیسک حاوی منتول بزرگترین هاله مهار رشد را ایجاد کرده بود (p-value<0.05). کمترین MIC برای زانتوموناس کامپسترئیس و باسیلوس سرئوس مربوط به ترکیب منتول بود. از سوی دیگر بزرگترین هاله مهار رشد در روش انتشار دیسک برای هر چهار میکروارگانیسم توسط ترکیب

۴- نتیجه گیری

رشد باکتری‌های مولد فساد و باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی موجب خسارات اقتصادی و سلامتی فراوانی می‌شود؛ بنابراین نیاز است که با استفاده از ترکیبات مناسب فعالیت میکروارگانیسم‌ها را در مواد غذایی کنترل نمود تا بتوان ضمن افزایش ماندگاری مواد غذایی، امنیت و ایمنی غذایی جامعه را تامین نمود. اسانس‌های گیاهی بر دامنه وسیعی از ارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها، پروتوزوآها، لاروها، حشرات، کرم‌ها، نرم‌تنان و سلول‌های پستانداران تأثیرگذار هستند. در این تحقیق ما اثر ضدباکتریایی برخی اجزاء اسانس‌های گیاهی را بر چهار میکروارگانیسم مولد فساد و یا بیماری‌زا در مواد غذایی که کمتر مورد توجه سایر محققین قرار گرفته بودند نشان دادیم. از میان ترکیبات مورد بررسی، متول قویترین اثر ضد میکروبی و اوژنول ضعیف‌ترین اثر ضد میکروبی را داشتند. با این وجود، هر چهار ترکیب مورد بررسی در این مطالعه درجات مختلفی از اثر ضد میکروبی بر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی را نشان دادند و این امر نمایان‌کننده پتانسیل آنها برای استفاده به عنوان ترکیبات ضد میکروبی یا نگهدارنده و افزایش ماندگاری محصول با استفاده از این ترکیبات طبیعی می‌باشد.

۵- منابع

- [1] Jay, J.M., M. Loessner, and D. Golden, 2005, Modern food microbiology 7 th., New York, NY: Springer Since Business Media, LLC.
- [2] Ultee, A., M. Bennik, and R. Moezelaar, 2002, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and environmental microbiology. 68(4): 1561-1568.
- [3] Van Tassel, J.A., et al., 2012. Evaluation of various selective media for the detection of *Pseudomonas* species in pasteurized milk. Journal of Dairy Scienc. 95(3):1568-1574.
- [4] Zhang, Y., et al., 2018, Essential oil components inhibit biofilm formation in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* via anti-quorum sensing activity. LWT. 92: 133-139.
- [5] Amini, L., et al., 2018, Effect of essential oil from *Zataria multiflora* on local strains of

مختلفی اثر این ترکیب بر باکتری‌های بیماری‌زای غذا-زاد (سالمونلا/تتریکا، اشریشیا کلی وروتوکسیژنیک و غیره) مورد مطالعه قرار گرفته است و کاهش شمارش سلول‌های زنده گزارش شده است [۲۲، ۲۶-۳۰]. اولتی و اسمید در سال ۲۰۰۱ اثر کارواکرول را بر باکتری باسیلوس سرئوس مورد مطالعه قرار دادند و کاهش شمارش باکتری‌های زنده و کاهش معنادار تولید توکسین توسط باکتری را در غلظت‌های مختلف گزارش نمودند [۳۱]. در تحقیق حاضر نیز کارواکرول دومین ترکیب اثرگذار بر باسیلوس سرئوس بود. اگرچه برای کارواکرول هیچ اثر سمی ای گزارش نشده است، ولی میزان مورد نیاز برای ایجاد اثر ضد میکروبی در سیستم‌های غذایی ممکن است موجب بو و طعم غیر قابل قبول در ماده غذایی شود. سوزا و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که استفاده ترکیبی از کارواکرول و سایر ترکیبات اسانس با ساختار متفاوت، در مقادیر کمتر از MIC می‌تواند منجر به توازن میان ایجاد ایمنی میکروبی و مقبولیت ارگانولپتیک شود [۸]. آنها از کارواکرول و ۸۰۱ سینئول بطور همزمان استفاده نمودند و هم‌افزایی آنها را گزارش کردند. ساز و کار اصلی عملکرد کارواکرول مشخص نیست، ولی بیشتر مطالعات به پاره شدن غشاء سیتوپلاسمی میکروارگانیسم اشاره دارند [۱۲].

بر اساس نتایج، در هر چهار سویه مورد بررسی در تحقیق حاضر، اوژنول کوچکترین هاله مهار رشد را ایجاد کرده بود ($p\text{-value} < 0.05$). میچلز و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ مشاهده کردند که از میان چهار ترکیب اوژنول، تیمول، کارواکرول و سینامالدهید، اوژنول اثر ضدباکتریایی کمتری داشت که مشابه نتایج تحقیق حاضر است [۳۲]. از سوی دیگر، در تحقیقی اثر ضدقارچی و کاهش تولید توکسین‌های قارچی توسط اوژنول در پنیر تایید شد [۱۴]. همچنین چنگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر اوژنول را بر قارچ‌های فاسد کننده چوب بررسی کردند و اثر ضدقارچی قوی اوژنول را مشاهده کردند [۳۳]. امیری و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر اوژنول را بر ۴ قارچ بیماری‌زا برای محصول سیب پس از برداشت بررسی کردند و مشاهده کردند که اوژنول روی ظاهر و طعم فرآورده تأثیر منفی نداشت و موجب مهار رشد قارچ‌ها شد. این نتایج نویدبخش پتانسیل استفاده از این ترکیب در طول دوره انبارداری برای کنترل توسعه میکروب‌های بیماری‌زای اصلی میوه سیب بود [۳۴].

- [16] Lambert, R. J. W., et al., 2001, A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91(3): 453-462.
- [17] Trombetta, D., et al., 2005, Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(6): 2474.
- [18] Dambolena, J.S., et al., 2010, Effects of menthol stereoisomers on the growth, sporulation and fumonisin B1 production of *Fusarium verticillioides*. *Food chemistry*. 123(1): 165-170.
- [19] Botelho, M., et al., 2007, Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of medical and biological research*. 40(3): 349-356.
- [20] Ettayebi, K., J. El Yamani, and B.-D.J.F.M.L. Rossi-Hassani, 2000, Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology*. 183(1): 191-195.
- [21] Del Nobile, M., et al., 2008, Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of food engineering*. 89(1): 57-63.
- [22] Engel, J.B., et al., 2017, Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*. 252: 18-23.
- [23] Guarda, A., et al., 2011, The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*. 146(2): 144-150.
- [24] Wang, Y. and K.L. Yam, 2018, Inhibitory effect of thymol via different modes of delivery on growth of *Escherichia coli* DH5 α . *Food Packaging and Shelf Life*. 16: 92-96.
- [25] Xue, J., P.M. Davidson, and Q. Zhong, 2017, Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* growth in milk and cantaloupe juice by thymol nanoemulsions prepared with gelatin and lecithin. *Food Control*. 73: 1499-1506.
- [26] Burt, S.A., et al. 2007, Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour. *International journal of food microbiology*. 119(3): 346-350.
- Xanthomonas campestris*: An efficient antimicrobial agent for decontamination of seeds of *Brassica oleracea* var. capitata. *Scientia Horticulturae*. 236: 256-264.
- [6] Prakash, A., et al., 2018, Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. *Food Research International*. 111: 509-523.
- [7] Rico, D., et al., 2007, Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 18(7): 373-386.
- [8] de Sousa, J.P., et al., 2012, Synergies of carvacrol and 1, 8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International journal of food microbiology*. 154(3): 145-151.
- [9] Mastromatteo, M., et al. 2010, Shelf life of ready to use peeled shrimps as affected by thymol essential oil and modified atmosphere packaging. *International journal of food microbiology*. 144(2): 250-256.
- [10] Janczyk, P., et al. 2008, Effect of thymol on microbial diversity in the porcine jejunum. *International journal of food microbiology*. 126(1-2): 258-261.
- [11] de Sousa, J.P., et al., 2012, Carvacrol and 1, 8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. *International journal of food microbiology*. 158(1): 9-13.
- [12] Inamuco, J., et al., 1998, Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella Typhimurium* motility and invasion of porcine epithelial cells. *Veterinary microbiology*. 157(1-2): 200-207.
- [13] Blaszyk, M. and R.A.J.I.J.o.f.m. Holley, 2001, Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *International journal of food microbiology*. 39(3): 175-183.
- [14] Vazquez, B.I., et al., 2001, Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International journal of food microbiology*. 67(1-2): 157-163.
- [15] Karapinar, M. and Ş.E.J.I.J.o.F.M. Aktuğ, 1987, Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *International journal of food microbiology*. 4(2): 161-166.

- [31] Ultee, A. and E.J.I.J.o.F.M. Smid, 2001, Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. international journal of food microbiology. 64(3): 373-378.
- [32] Michiels, J., et al., 2007, In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora.. Livestock Science. 109(1-3): 157-160.
- [33] Cheng, S.-S., et al., 2008, Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. Bioresource technology. 99(11): 5145-5149.
- [34] Amiri, A., et al., 2008, In vitro and in vitro activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. international journal of food microbiology. 126 (1-2): 13-19.
- [27] Guarda, A., et al., 2011, The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. international journal of food microbiology. 146(2): 144-150.
- [28] Rivas, L., et al., 2010, Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. international journal of food microbiology. 139(1-2): 70-78.
- [29] da Silva Luz, I., et al., 2012, Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. food research. 48(2): 667-672.
- [30] Windiasti, G., et al., 2019, Investigating the synergistic antimicrobial effect of carvacrol and zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. Food Control. 96: 39-46.

The study of antimicrobial effect of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol on food spoilage bacteria in agricultural crops and dairy products

Abbaszade, S. ¹, Sharifzadeh, A. ², Bagheri, M. ^{3*}

1. Health research center, life style institute, Baqiyatallah university of medical science, Tehran, Iran

2. Mycology research center, department of microbiology and immunology, faculty of veterinary medicine, university of Tehran, Tehran, Iran

3. Department of food science and technology, Agricultural faculty of Bardsir, Shahid Bahonar university of Kerman, Kerman, Iran

(Received: 2018/09/24 Accepted:2019/10/15)

Currently, consumers are aware of the side-effects of chemical additives and are more interested in natural antibacterial compounds as food preservatives, like herbal essential oils and extracts. In this study, the antimicrobial effect of some main components of the essential oils, including thymol, carvacrol, menthol and eugenol has been evaluated against *Bacillus cereus* (PTCC 1154), *Pseudomonas nigrifaciens* (ATCC 19375), *Erwinia carotorova* (PTCC 1675) and *Xanthomonas campestris* (PTCC 1473) by broth microdilution method and agar disc diffusion method. According to the results, the lowest MIC was reported for Thymol which was 50 ppm (*Pseudomonas nigrifaciens*, *Erwinia carotorova* and *Bacillus cereus*) and the maximum MIC for *Pseudomonas nigrifaciens* was 100 ppm due to menthol and 125, 125 and 108 ppm for *Bacillus cereus*, *Erwinia carotorova* and *Xanthomonas campestris* respectively due to Eugenol. Menthol presented the broadest growth inhibitory zone (8.9 mm) for *Pseudomonas nigrifaciens* and the narrowest inhibitory zone was reported for Eugenol against *Erwinia carotorova* (5.9 mm). Menthol and eugenol were the strongest and weakest antimicrobial agents respectively (p-value<0.05). However, all tested components inhibited the microorganisms at different levels and are potent to be used as food preservatives.

Key words: Thymol, Carvacrol, Eugenol, Menthol, antimicrobial

* Corresponding Author E-Mail Address: ma.bagheri@uk.ac.ir