

تأثیر اسانس‌های گیاهی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در سبزیجات برگ

مریم عزیزخانی^{۱*}، پاتریسیا الیزاکویویل^۲

۱- استادیار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

۲- دکترای میکروبیولوژی، پژوهشگر، گروه میکروبیولوژی و اکولوژی دانشگاه والنسیا، والنسیا، اسپانیا.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۰۳

چکیده

زمینه و هدف

تولید سبزیجات آماده مصرف با استفاده از مخلوط سبزیجات برگ یکی از پیشرفت‌های اخیر در صنایع مواد غذایی تازه به شمار می‌رود. هدف این مطالعه، بررسی توانایی اسانس‌های پونه کوهی، میخک و آویشن شیرازی در کنترل رشد پاتوژن‌های وارد شده از طریق آلودگی متقابل و میکروبیوتای درونی سالاد تجاری محصول یک شرکت تولیدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پس از مرحله شستشو، ۲۵ گرم از سبزیجات در پوشش‌های پلی‌اتیلنی استریل قرار گرفته و تحت شرایط استریل بطور جداگانه با غلظت‌های مختلف (۳، ۵ و ۱۰ درصد) از امولسیون اسانس‌ها توسط اسپری (۰/۸ میلی‌لیتر) تیمار شدند.

یافته‌ها

امولسیون ۳، ۵ و ۱۰ درصد اسانس آویشن شیرازی، جمعیت اشرشیاکلی O157:H7 را در مخلوط سبزیجات به میزان ۱/۷، ۲/۲ و ۳/۵ cfu/g، پس از ۵ روز ذخیره‌سازی در ۷°C، کاهش داد. بر خلاف آن، میزان کاهش جمعیت اشرشیاکلی در استفاده از غلظت‌های ۵ و ۱۰ درصد اسانس میخک، تقریباً مشابه بود (۲/۵ cfu/g کاهش). اسانس پونه کوهی (۱۰ درصد) جمعیت اشرشیاکلی تلقیح شده به مخلوط سبزیجات را ۰/۵ cfu/g، پس از ۵ روز ذخیره‌سازی در ۷°C، کاهش داد. آویشن شیرازی بیشترین تأثیر ضد میکروبی را در برابر اشرشیاکلی و نیز در برابر میکروبیوتای درونی سبزیجات ذخیره شده به مدت ۹ روز در ۷°C، نشان داد. فیلاین کلیسی ویروس، سویه‌ای از نوروویروس، در سالاد آلوده در طول نگهداری در یخچال (۹ روز در ۷°C) تحت تأثیر تیمار با اسانس‌ها قرار نگرفت. به نظر می‌رسد دمای نگهداری بطور کامل از اثر اسانس‌ها بر فیلاین کلیسی ویروس تلقیح شده به سالاد جلوگیری نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهد که اسانس‌ها، به خصوص آویشن شیرازی، واجد توانایی کاهش خطرات مربوط به آلودگی‌های میکروبی در سالاد سبزیجات برگ می‌باشند.

کلیدواژه‌ها

باکتری، اسانس گیاهی، پاتوژن‌های منتقله از غذا، سبزیجات

* نویسنده مسئول: دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، دانشکده دامپزشکی.

پست الکترونیک: Azizkhani.maryam@gmail.com

■ مقدمه

فعالیت‌های ضد میکروبی در برابر چند پاتوژن ناشی از مواد غذایی و باکتری‌های عامل فساد، در شرایط آزمایشگاهی و در ماتریسهای مواد غذایی، می‌باشند (۷، ۸).

ترکیب و فعالیت برخی اسانس‌ها مانند مرزنجوش، میخک، دارچین، سیر، گشنیز، رزماری، نعناع، ریحان و جعفری در مطالعات آزمایشگاهی گزارش شده (۹-۱۴) و اثرات ضد میکروبی آنها در برابر پاتوژن‌های مواد غذایی و عوامل فساد به اثبات رسیده است. اثر ضد باکتریایی برخی اسانس‌ها در کاهو نیز بررسی شده است. همه این مطالعات به بررسی کاهش تعداد باکتری‌های درون‌زا و یا بیماری‌زا در محصولات تازه، با استفاده از اسانس‌ها به عنوان عامل ضد عفونی‌کننده در طول شستشو پرداخته‌اند (۸).

مطالعه حاضر، به بررسی تأثیر اسانس‌های پونه کوهی^۱، میخک^۲ و آویشن شیرازی^۳ به عنوان نگهدارنده طبیعی ضد میکروبی که به روش پاشش (اسپری) در سالاد تجاری (مخلوط سبزیجات شامل کاهو، اسفناج، کلم و منداب) تهیه شده در یک واحد تولیدکننده سبزیجات آماده بکار رفت، پرداخته است.

تأثیر ضد میکروبی اسانس‌ها، ۱۵ دقیقه پس از کاربرد اسانس و نیز طی دوره نگهداری بر میکروبیوتای درونی سبزیجات، اشریشیاکلی O157:H7 و FCV، تلقیح شده بطور مصنوعی در سبزیجات، ارزیابی گردید.

■ مواد و روش‌ها

اسانس‌های گیاهی

اسانس‌های میخک و پونه کوهی بصورت آماده و تجاری از شرکت پرونارم^۴ و اسانس آویشن شیرازی^۵ به صورت خانگی تهیه گردید (۱۵). ترکیبات اصلی اسانس‌ها در جدول شماره ۱ آمده است. اسانس‌های میخک و پونه کوهی در اتانول ۷۰ درصد، مطابق دستورالعمل تولیدکننده، رقیق شده و تا زمان استفاده در دمای ۴°C نگهداری شدند. گیاه آویشن شیرازی در شیراز، جمع‌آوری گردید.

کاهو یکی از مهم‌ترین محصولات آماده برای مصرف است و در میان سبزیجات، از جنبه‌های تولید و اقتصادی حائز ارزش می‌باشد. تولید جهانی سالاد و به ویژه تولید کاهو و کاسنی تلخ (دو گیاهی که توسط FAO جهت بررسی و گزارشات انتخاب شد) ۲۳۶۲۳۶۶ تن در سال ۲۰۱۰ بوده است. افزایش مصرف محصولات تازه، آمار شیوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی به خصوص سبزیجات خام را افزایش داده است (۱). در میان پاتوژن‌های ناشی از مواد غذایی و محصولات تازه مانند اسفناج، کاهو، جوانه غلات و سالاد مخلوط سبزیجات، اشریشیاکلی O157:H7 به عنوان عامل حدود ۲۱ درصد از موارد شیوع بیماری‌ها شناخته شده است (۲، ۳).

ویروس‌های روده‌ای، و به ویژه نوروویروس، گروه دیگری از پاتوژن‌های حاصل از محصولات تازه گیاهی را تشکیل می‌دهند (۴). علاوه بر این، نوروویروس‌ها شایع‌ترین علت بیماری‌های ناشی از مواد غذایی هستند و در میان ۵ پاتوژن رتبه‌بندی شده عامل هزینه‌های مربوط به بیماری‌های ناشی از مواد غذایی در ایالات متحده می‌باشند (۵). آلودگی مواد غذایی به نورو ویروس از طریق تماس با مدفوع انسانی و یا تهیه غیر بهداشتی مواد غذایی توسط افراد آلوده به ویروس رخ می‌دهد.

در بسیاری از منابع موجود در خصوص آلودگی‌زدایی از سبزیجات تازه اظهار شده است که فرآیندهای شستشوی بهداشتی، جمعیت میکروبی در سطح سبزیجات را تنها به میزان ۲ تا ۳ cfu/g کاهش می‌دهند. علاوه بر این، علیرغم وجود تفاوت اولیه در بار باکتریایی سبزیجات شسته شده با آب معمولی و یا یک محلول بهداشتی، تعداد نهایی میکروارگانیسم‌ها پس از ذخیره‌سازی در هر دو گروه مشابه است. بنابراین، استفاده از عوامل بهداشتی برای حفظ کیفیت آب و جلوگیری از آلودگی در طول شستشو مفید به نظر می‌رسد. با این حال، این ترکیبات فاقد اثربخشی در جلوگیری از رشد میکروبی در طول مدت نگهداری محصول می‌باشند زیرا هیچ باقیمانده‌ای در محصول ندارند (۶). این امر باعث توجه و تمایل تولیدکنندگان به افزودن ترکیبات طبیعی و بی‌خطر با تأثیرات ضد میکروبی به میوه‌ها و سبزیجات فرایند شده در طول ذخیره‌سازی محصول گردیده است. اسانس‌های گیاهی از گذشته به عنوان عوامل طعم‌دهنده به مواد غذایی مانند گوشت افزوده شده و واجد طیف گسترده‌ای از

^۱ Origanum Compactum^۲ Eugenia caryophyllus^۳ Zataria Multiflora Boiss^۴ Pronarôm International, Ghislenghien, Belgium^۵ Z. multiflora Boiss



(GC/MS) مورد آنالیز قرار گرفت (۱۵). اسانس به نسبت ۱:۱۰ (حجمی-حجمی) در اتانول ۵۰ درصد رقیق و تا زمان استفاده در شیشه‌های تیره غیرقابل نفوذ به هوا در دمای ۴°C نگهداری شد.

اسانس از قسمت‌های هوایی خشک شده گیاه با استفاده از دستگاه کلونجر، به روش تقطیر با بخار به مدت دو ساعت، تهیه و جهت شناسایی ترکیبات در مؤسسه گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران، با استفاده از کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی

جدول شماره ۱- ترکیبات اصلی اسانس‌ها

گونه گیاهی	نام متداول	محل کشت	بخش‌های اسانس‌گیری شده	ترکیبات اصلی (درصد)
Origanum Compactum	پونه کوهی	مراکش	سرشاخه	کارواکول (۴۶/۸۸) تیمول (۱۵/۲۶) پارا-سیمین (۱۳/۱۰) گاما-ترپنین (۱۱/۶۱)
Eugenia Caryophyllus	میخک	ماداگاسکار	غنچه	اوژنول (۸۳/۹۶) اوژنیل استات (۱۰/۷۵) بتا-کاریوفیلین (۳/۲۵)
Zataria Multiflora Boiss	آویشن شیرازی	ایران	بخش‌های هوایی	کارواکول (۷۱/۱۲) گاما-ترپنین (۷/۳۴) آلفا-پینن (۴/۲۶) اوکالیپتول (۳/۳۷) گلوبولول (۳/۳۲)

این سویه در محیط TSB^۴ (Merk آلمان) در ۳۷°C به مدت ۱۸ ساعت کشت و به روش کشت در محیط TSA^۵ (Merk آلمان) در شرایط گرم‌خانه‌گذاری مشابه بالا شمارش شد. کشت‌های مورد نیاز برای انجام آزمایشات از طریق انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۱۸ ساعته به ۱۰ میلی‌لیتر TSB حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نالیدیکسیک اسید و گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷°C به مدت ۴ ساعت بدست آمد (حدود ۱۰^۸ cfu/ml). سپس، کشت‌ها بصورت متوالی در فسفات بافر سالین جهت بدست آوردن تراکم سلولی ۱۰^۶ cfu/ml رقیق سازی شدند.

سویه ویروسی

سویه سیتوپاتوژن FCV F9 (ATCC VR-782) در سلول‌های CRFK^۶ تکثیر و ارزیابی گردید. سپس استوک‌های نیمه‌خالص از طریق سانتریفوژ هضم شده سلول‌های آلوده در ۶۶۰g به مدت ۳۰ دقیقه تهیه شد.

سویه باکتریایی، شرایط کشت و تلقیح

اشرشیاکلی O157:H7 (CECT^۱ 5947) غیرتوکسیژنیک از مجموعه کشت‌های میکروبی اسپانیا تهیه و در این مطالعه به کار رفت. از آنجا که ژن stx2 (فاکتور ویرولانسی) با ژن cat جایگزین شده است استفاده از این سویه جهت ارزیابی‌های کنترل ایمنی مواد غذایی پیشنهاد می‌شود (۱۶).

سویه اشرشیاکلی O157:H7 مقاوم به نالیدیکسیک اسید^۲ از طریق انتقال متوالی ۲۴ ساعته از کشت BHI^۳ (ساخت کمپانی Merk آلمان) به BHI حاوی غلظت‌های صعودی Nal تا ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. سپس، کلنی‌های اشرشیاکلی O157:H7 مقاوم به نالیدیکسیک اسید، دو بار و بصورت متوالی، در ۵ میلی‌لیتر BHI حاوی نالیدیکسیک اسید (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در دمای ۳۷°C به مدت ۲۰ ساعت کشت داده شد.

^۴ Tryptic Soy Broth

^۵ Trypticaseine Soy Agar

^۶ سلول‌های کلیه گربه با سن ۱۰-۱۲ هفته

^۱ The Spanish type culture collection

^۲ Nalidixic Acid (Nal)

^۳ Brain Heart Infusion



آزمایشات میکروبی

قبل از انجام آزمایشات تلقیح، مخلوط سبزیجات جهت اطمینان از عدم وجود اشرشیاکلی O157:H7 و FCV مورد بررسی قرار گرفتند. ۲۵ گرم از مخلوط سبزیجات به ۲۲۵ میلی‌لیتر آب پیتون بافری شده (BPW) در کیسه‌های پلاستیکی استریل با فیلترهای جانبی اضافه (BagSystem فرانسه) و به مدت ۱۵ ثانیه با استفاده از پالسیفایر (Microgen انگلستان) همگن شد. مخلوط حاصل از سمت فیلتر برداشته و مطابق دستور کار مطالعه Sanchez و همکاران، تغلیظ گردید. بطور خلاصه، ۱۰ میلی‌لیتر از مایع فیلترشده به ۹۰ میلی‌لیتر پلی‌اتیلن‌گلیکول اضافه و یکنواخت شد، و پس از تکان دادن آرام به مدت ۱ ساعت در دمای 4°C ، به مدت ۳۰ دقیقه در $10000 \times g$ سانتریفیوژ گردید. رسوب بدست آمده از هر نمونه با یک میلی‌لیتر BPW مخلوط شد. سپس جهت شمارش اشرشیاکلی و ویروس رقت‌سازی انجام شد (۱۸).

شمارش گروه‌های باکتریایی درون‌زای مورد بررسی (مزوفیل‌ها، سایکروتروف‌ها، کلی‌فرم‌ها، باکتری‌های اسید لاکتیک، مخمر و کپک) و عوامل بیماری‌زای تلقیح شده (اشرشیاکلی O157:H7 و FCV) پس از صفر، ۲، ۵، ۷ و ۹ روز ذخیره‌سازی در 7°C انجام شد.

شمارش میکروارگانیزم‌ها با استفاده از محیط‌های آگار و گرم‌خانه-گذاری انجام شد. مزوفیل‌ها در TSA در 28°C به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، سایکروتروف‌ها در TSA در 7°C به مدت ۱۰ تا ۱۲ روز، کلی‌فرم کل در مک کانکی آگار (Sharlab، بارسلونا، اسپانیا) در 37°C به مدت ۲۴ ساعت، باکتری‌های اسید لاکتیک در MRS^۱ آگار (Conda، مادرید، اسپانیا) در 28°C به مدت ۴۸ ساعت، مخمرها و کپک‌ها در YGB^۲ در 28°C به مدت ۷ روز نگهداری شدند. اشرشیاکلی O157:H7 با استفاده از محیط CT-SMAC^۳ (Sharlab، بارسلونا، اسپانیا) حاوی نالیدیکسیک اسید (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در 37°C به مدت ۲۴ ساعت شمارش شد. آزمایشات دو مرحله تکرار شد و نتایج شمارش میکروبی به صورت cfu در گرم بافت بیان شد. FCV در سلول‌های CRFK با تعیین TCID₅₀ با هشت چاهک به ازای هر رقت و ۲۰ میکرولیتر مایه تلقیح در هر چاهک شمارش گردید.

تهیه سالاد (مخلوط سبزیجات)

سالادی متشکل از کاهو، اسفناج، کلم و منداب در یک واحد تولیدی سبزیجات تازه تهیه شد (وردیفرش، والنسیا، اسپانیا). برگ‌های دارای نقص از جمله سائیدگی، پارگی و تغییر رنگ با دست قبل از شستشو جداسازی شدند. سبزیجات مخلوط شده و سپس به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه در محلول کلرین ۱۰۰ mg/ml (که pH آن با استفاده از اسید فسفریک در ۶/۵ تنظیم شد) غوطه‌ور گردید. برگ‌ها به مدت ۳۰ ثانیه آبگیری و سپس با استفاده از آب معمولی به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه آبکشی شدند. رطوبت اضافی با استفاده از سانتریفیوژ حذف گردید. نمونه‌های ۱۰۰ گرمی بصورت مکانیکی در کیسه بسته‌بندی شده و در عرض ۱۵ دقیقه به محفظه‌ای با دمای یخچال منتقل شدند (۱۰).

تلقیح میکروارگانیزم‌ها به مخلوط سبزیجات، افزودن

اسانس‌ها، بسته‌بندی و ارزیابی کیفی

برای انجام آزمایشات تلقیح مصنوعی، ۲۵ گرم از مخلوط سبزیجات تهیه شده در واحد تولیدی مذکور، در کیسه‌های استریل در چهار سری مطابق روش Lou و همکاران آماده شد: A (تلقیح شده با اشرشیاکلی یا FCV، اسپری شده با آب معمولی به جای امولسیون اسانس)، B (تلقیح شده با اشرشیاکلی یا FCV، اسپری شده با امولسیون اسانس)، C (کنترل: عدم تلقیح، اسپری شده با آب معمولی به جای امولسیون اسانس)، D (کنترل: عدم تلقیح، اسپری شده با امولسیون اسانس). ۲۵۰ میکرولیتر از کشت اشرشیاکلی مقاوم به نالیدیکسیک اسید (حدود 1×10^5 cfu) و ۱۰۰ میکرولیتر از FCV (حدود 2×10^7 TCID₅₀) روی برگ نمونه‌های سری A و B، با استفاده از میکروپیپت، تلقیح شد. امولسیون‌های اسانس پونه کوهی (۵ و ۱۰ درصد حجمی-حجمی)، میخک (۵ و ۱۰ درصد حجمی-حجمی) و آویشن شیرازی (۳، ۵ و ۱۰ درصد حجمی-حجمی) روی برگ سبزیجات اسپری گردید. نمونه‌ها به مدت ۹ روز در 7°C نگهداری شدند. کیفیت حسی سبزیجات بسته‌بندی شده توسط شش شرکت‌کننده آموزش دیده مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

^۱ de Man, Rogosa and Sharpe

^۲ Yeast Glucose Broth

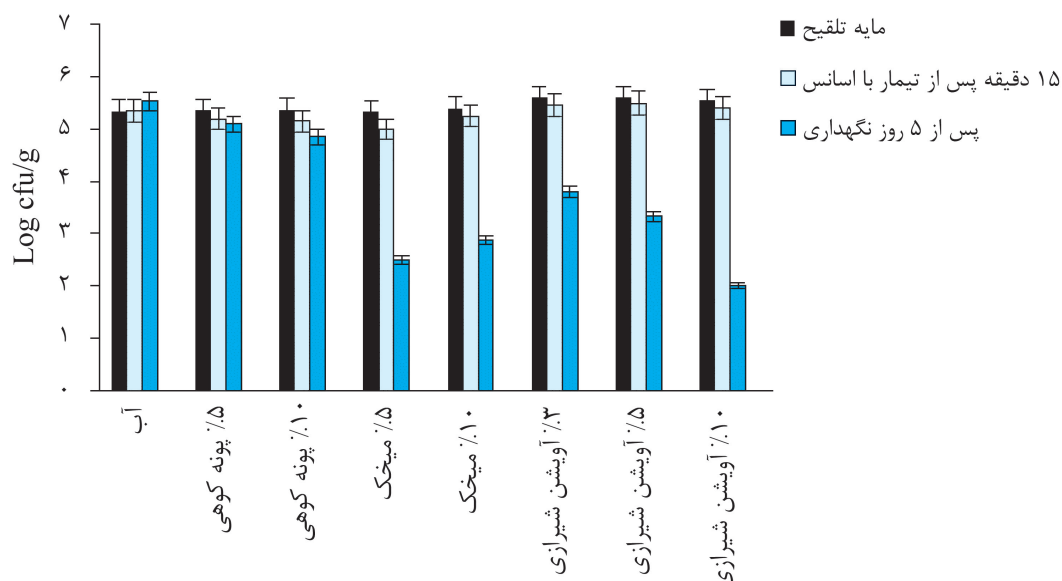
^۳ Cefixime Tellurite -Sorbitol MacConkey Agar

آنالیز آماری

دو مجموعه از آزمایش‌های مذکور که در آن مخلوط سبزیجات با اسانس‌های گیاهی تیمار گردید، دو بار و هر نمونه با سه تکرار به ازای هر تیمار و برای هر یک از زمان‌های نگهداری انجام شد. طرح مطالعه بر اساس نمونه‌گیری تصادفی بود. آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از این داده‌ها انجام شد و پس از آن آزمون توکی با سطح معنی‌داری $P < 0.05$ ، با استفاده از نرم‌افزار SPSS v.19 اعمال گردید.

یافته‌ها

تأثیر غلظت‌های مختلف پونه کوهی، میخک و آویشن شیرازی (۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) در شرایط آزمایشگاهی بر اشرشیاکلی O157:H7 مورد بررسی قرار گرفت. امولسیون‌های ۵ و ۱۰ درصد پونه کوهی، ۵ و ۱۰ درصد میخک و ۳، ۵ و ۱۰ درصد آویشن شیرازی بر اساس نتایج بدست آمده

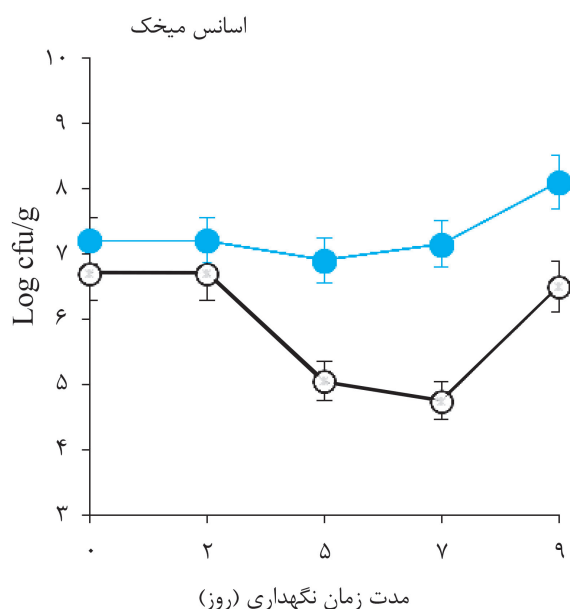


نمودار شماره ۱- کاهش جمعیت اشرشیاکلی O157:H7، تلقیح شده به مخلوط سبزیجات تیمار شده با امولسیون اسانس‌های پونه کوهی، میخک و آویشن شیرازی در مقایسه با آب (نمونه کنترل) طی نگهداری در دمای ۷°C

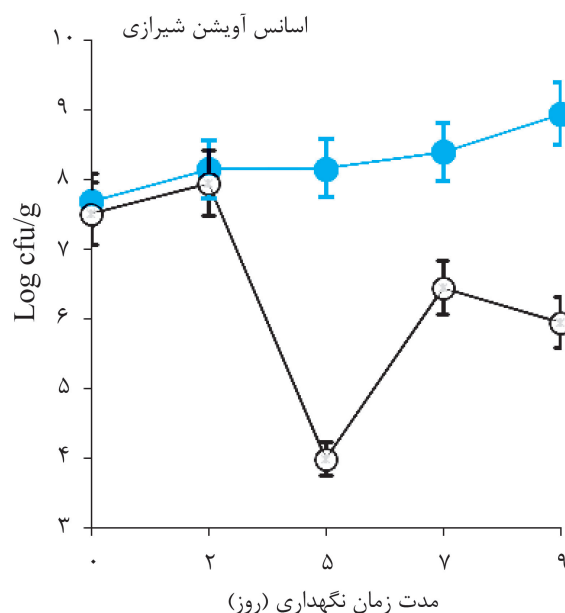
با حداکثر کاهش $0.7 \log \text{cfu/g}$ پس از ۵ روز نگهداری مخلوط سبزیجات تیمار شده با غلظت ۱۰ درصد اسانس نشان داد (نمودار شماره ۱). اسانس پونه کوهی در غلظت‌های بالاتر نیز مورد ارزیابی قرار گرفت، اما کاهش بیشتری در جمعیت باکتری در مقایسه با غلظت‌های پایین‌تر اسانس مشاهده نشد.

بنابراین، غلظت‌های ۳، ۵ و ۱۰ درصد اسانس آویشن شیرازی جمعیت اشرشیاکلی O157:H7 را، به ترتیب، 1.7 ، 2.2 و $3.5 \log \text{cfu/g}$ کاهش داد. در مقابل، اسانس میخک در غلظت ۱۰ درصد تأثیر باکتری‌کشی بیشتری در مقایسه با غلظت ۵ درصد نشان نداد ($2.5 \log \text{cfu/g}$). اسانس پونه کوهی نیز تأثیر معنی‌داری ($P < 0.01$) بر جمعیت اشرشیاکلی O157:H7 تلقیح شده،

O157:H7، در سری دوم آزمایشات استفاده نشد. رشد باکتری تلقیح شده، اشرشیاکلی O157:H7، در نمونه‌های اسپری شده با آب به عنوان شاهد، در ۷°C، آهسته بود و پس از ۹ روز نگهداری افزایش معنی‌دار آماری ($0.3 \pm 1.1 \log \text{cfu/g}$) مشاهده شد (نمودار شماره ۲).



بر اساس این نتایج، غلظت‌های ۱۰ درصد اسانس میخک و آویشن شیرازی جهت انجام سری دوم آزمایشات انتخاب شدند. در این آزمایشات به بررسی تأثیر اسانس‌های میخک و آویشن شیرازی بر اشرشیاکلی O157:H7، FCV و میکروبیوتای مخلوط سبزیجات در طول ۹ روز نگهداری در ۷°C پرداخته شد. از اسانس پونه کوهی، به دلیل عدم تأثیر قابل ملاحظه (کمتر از ۱ log کاهش) بر اشرشیاکلی



نمودار شماره ۲- بقای اشرشیاکلی O157:H7 تلقیح شده به مخلوط سبزیجات تیمار شده با امولسیون اسانس‌های میخک و آویشن شیرازی، نگهداری شده در ۷°C به مدت ۹ روز. ○: تیمار با اسانس‌ها (غلظت ۱۰ درصد) و ●: کنترل. عمر نگهداری تجاری محصول ۷ روز.

غلظت FCV بلافاصله پس از تلقیح به سبزیجات $\log \text{TCID}_{50}/\text{g}$ ۵/۳ ثبت شد (نمودار شماره ۳).

در نمونه‌های اسپری شده با آب (تیمار شاهد)، سطح FCV پس از ۲ روز نگهداری در ۷°C به میزان ۱ log کاهش یافت و سطح $\log \text{TCID}_{50}/\text{g}$ ۴/۳ تا قبل از روز هفتم نگهداری حفظ شد. طی ۲ روز پایانی نگهداری، عفونت‌زایی FCV به میزان $0.3 \log \text{TCID}_{50}/\text{g}$ کاهش یافت ($P < 0.01$).

دو اسانس مورد مطالعه، میخک و آویشن شیرازی، تأثیر معنی‌داری بر عفونت‌زایی FCV نشان ندادند، زیرا سطح FCV در نمونه‌های تیمار شده با اسانس، مشابه گروه شاهد بدست آمد (نمودار شماره ۳).

در مقابل، جمعیت اشرشیاکلی O157:H7 تلقیح شده به سبزیجات تیمار شده با اسانس‌های میخک و آویشن شیرازی کاهش یافت. حداکثر کاهش رشد باکتری طی تیمار مخلوط سبزیجات با اسانس آویشن شیرازی ($3.5 \log \text{cfu/g}$ کاهش) و میخک ($2.8 \log \text{cfu/g}$ کاهش)، به ترتیب، در روزهای ۵ و ۷ نگهداری در ۷°C بدست آمد (نمودار شماره ۲).

پس از روز هفتم، اشرشیاکلی O157:H7 شروع به رشد در نمونه‌های تیمار شده با میخک نمود و اختلاف آن با نمونه شاهد به سطح $1.7 \log \text{cfu/g}$ در پایان دوره نگهداری رسید. در مقابل، جمعیت باکتری در نمونه‌های تیمار شده با اسانس آویشن شیرازی به میزان $3 \log \text{cfu/g}$ کمتر از نمونه شاهد در پایان دوره نگهداری بود (نمودار شماره ۲).

پس از ۲ روز ذخیره‌سازی، کارآیی اسانس آویشن شیرازی در کاهش تعداد باکتری‌های مزوفیل آشکارتر شد ($2.5 \log \text{cfu/g}$ کمتر از نمونه شاهد).

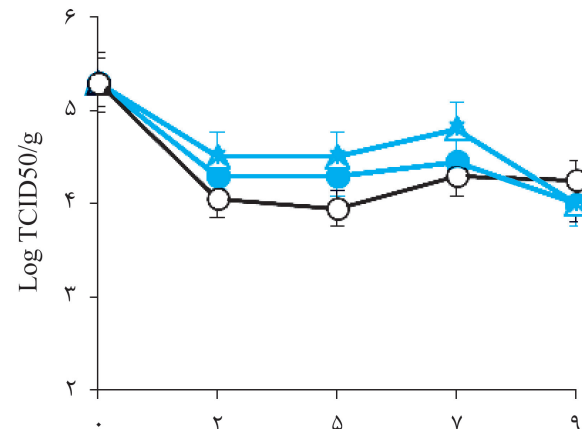
پس از گذشت دومین روز ذخیره‌سازی، باکتری‌های مزوفیل شروع به رشد در نمونه‌های تیمار شده با آویشن شیرازی نمودند لیکن تعداد آنها در کل دوره ذخیره‌سازی با نمونه شاهد متفاوت بود ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۴).

بر خلاف آویشن شیرازی، تأثیر میخک بر باکتری‌های مزوفیل تنها در روزهای هفتم و نهم ذخیره‌سازی معنی‌دار بود که تعداد باکتری‌های مزوفیل موجود $1.1 \pm 0.2 \log \text{cfu/g}$ کمتر از تعداد مزوفیل‌ها در نمونه شاهد بود.

همانند باکتری‌های مزوفیل، جمعیت باکتری‌های سرماگرا نیز در حضور آویشن شیرازی در دو روز اول ذخیره‌سازی کاهش یافت درحالی‌که تعداد آنها در حضور میخک و همچنین در گروه کنترل افزایش یافت (نمودار شماره ۴). بر این اساس، در روز دوم نگهداری تعداد باکتری‌های سرماگرا در نمونه‌های تیمار شده با آویشن شیرازی $3.2 \log \text{cfu/g}$ نسبت به گروه شاهد پایین‌تر بود.

پس از ۲ روز اول ذخیره‌سازی، جمعیت سرمادوست در نمونه تیمار شده با آویشن شیرازی افزایش یافت اما به غیر از روز نهم ذخیره‌سازی، همچنان با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان می‌داد ($P < 0.05$). در مقابل، تیمار با اسانس میخک موجب تعویق رشد باکتری‌های سرماگرا نگردید اما بیشینه تراکم میکروبی را در ۴ روز پایانی نگهداری در مقایسه با نمونه شاهد کاهش داد. در نتیجه، تعداد باکتری‌های سرماگرا، در روزهای هفتم و نهم، در نمونه‌های تیمار شده با میخک بطور قابل توجهی کمتر از نمونه شاهد بود.

تعداد کلی‌فرم کل ۱۵ دقیقه پس از تیمار با اسانس آویشن شیرازی و میخک به میزان قابل توجهی ($0.8 \log \text{cfu/g}$ و 1.1 کاهش) در مقایسه با نمونه شاهد کاهش یافت ($P < 0.05$). هر دو اسانس سطح کلی‌فرم را در طول دوره ذخیره‌سازی به میزان قابل توجهی ($P < 0.05$) پایین‌تر از نمونه شاهد حفظ نمودند (نمودار شماره ۴).

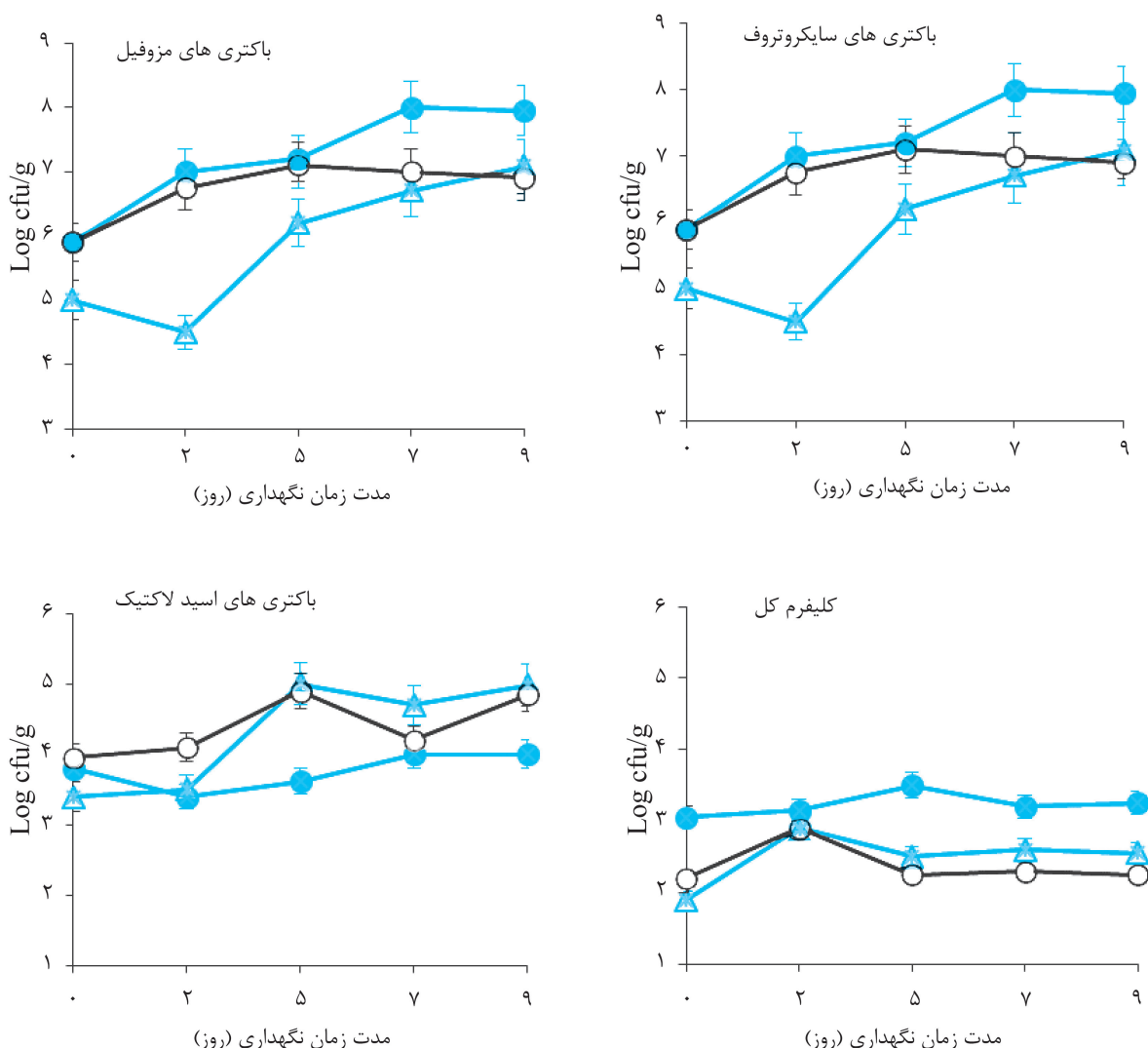


مدت زمان نگهداری (روز)

نمودار شماره ۳- بقای FCV تلقیح شده به مخلوط سبزیجات تیمار شده با امولسیون اسانس‌های میخک و آویشن شیرازی، نگهداری شده در 7°C به مدت ۹ روز. (○): تیمار با اسانس میخک ۱۰ درصد، (Δ): تیمار با اسانس آویشن شیرازی ۱۰ درصد، (●): کنترل. عمر نگهداری تجاری محصول ۷ روز.

در هر موعده نمونه‌گیری در آزمایشات سری سوم، کیفیت ظاهری محصولات تازه تیمار شده با امولسیون‌های ۱۰ درصد میخک و آویشن شیرازی در بسته‌بندی در طول ۹ روز نگهداری در 7°C بررسی شد. اگر چه کیفیت سبزیجات بسته‌بندی در طول دوره ذخیره‌سازی کاهش یافت، اما کیفیت آن طی ۷ روز اول نگهداری در 7°C مطلوب باقی ماند. بنابراین، ویژگی‌های کیفی محصولات تیمار شده با امولسیون ۱۰ درصد اسانس‌ها در طول ۷ روز اول نگهداری در حد قابل قبولی حفظ شد. در روز نهم، کیفیت نمونه‌های ذخیره شده در 7°C پایین‌تر از حد قابل قبول و رو به تنزل بود. با این حال، هیچ تأثیر منفی از تیمار با اسانس در مقایسه با گروه شاهد، بر ویژگی‌های ظاهری سبزیجات، مشاهده نشد. شمارش گروه‌های میکروبی درون‌زای مورد بررسی در مخلوط سبزیجات (مزوفیل-ها، سایکروتروف‌ها، کلی‌فرم‌ها، باکتری‌های اسید لاکتیک، مخمر و کپک) در روز صفر و سپس بعد از ۲، ۵، ۷ و ۹ روز از ذخیره‌سازی در 7°C انجام شد (نمودار شماره ۴).

در نمونه‌های تیمار نشده با اسانس (شاهد)، جمعیت باکتری‌های مزوفیل بطور قابل توجهی در طول دوره ذخیره‌سازی افزایش یافت. در مقابل، تعداد باکتری‌های مزوفیل پس از تیمار با آویشن شیرازی، در مقایسه با نمونه شاهد، کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد ($P < 0.05$).



نمودار شماره ۴- تأثیر اسانس‌های میخک و آویشن شیرازی بر گروه‌های مختلف باکتریایی در مخلوط سبزیجات نگهداری شده در ۷°C به مدت ۹ روز. (○): تیمار با اسانس میخک ۱۰ درصد، (Δ): تیمار با اسانس آویشن شیرازی ۱۰ درصد و (●): کنترل. عمر نگهداری تجاری محصول ۷ روز.

بحث

یکی از علل شیوع اشرشیاکلی O157:H7 مصرف کاهو (۱۹) و یا اسفناج آلوده (۲۰، ۲۱) است. نتایج این مطالعه نشان داد اشرشیاکلی O157:H7 یکی از باکتری‌های بیماری‌زاست که قادر به رشد در مخلوط سبزیجات ذخیره شده در دمای یخچال، به عنوان مثال، ۷°C می‌باشد.

اسانس‌های گیاهی منابعی غنی از ترکیبات ضد میکروبی برای حفظ محصولات تازه به شمار می‌روند و بسیاری از اجزای این اسانس‌ها بی‌خطر^۱ اعلام شده‌اند. مقایسه نتایج گزارش شده در مطالعات مختلف به دلیل تفاوت‌های موجود در مواد غذایی، روش‌های بکار

در مقایسه با دیگر گروه‌های میکروبی درون‌زای مورد بررسی، تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک در نمونه‌های تیمار شده با اسانس آویشن شیرازی و میخک تفاوت معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان نداد. حداکثر تراکم باکتری‌های اسید لاکتیک ۴ log cfu/g در نمونه‌های کنترل پس از ۷ روز ذخیره‌سازی ثبت شد، درحالی‌که جمعیت این باکتری‌ها در نمونه‌های تیمار شده با اسانس میخک و آویشن شیرازی، به ترتیب، ۴/۷ و ۴/۲ log cfu/g بود. هیچ رشدی از کپک یا مخمر در محیط YGB، در نمونه‌های تیمار شده با اسانس یا شاهد، مشاهده نشد.

^۱ Generally Recognised as Safe: GRAS

در مطالعه Elizaquivel و همکاران تأثیر ضدویروسی اسانس‌ها با استفاده از روش‌های کشت سلولی در ۴ و ۳۷°C بررسی شد (۳۲). اسانس پونه کوهی (۲ درصد) تیترا FCV را $3/75 \log TCID_{50}/ml$ در ۳۷°C کاهش داد و هیچ تأثیری در ۴°C نداشت. تأثیر اسانس میخک و آویشن شیرازی بر FCV گرم‌خانه‌گذاری شده در ۴°C روند مشابهی با اسانس پونه کوهی در کاهش تیترا ویروس نشان داد. حداکثر کاهش تیترا زمانی بدست آمد که سوسپانسیون FCV در ۳۷°C با غلظت ۰/۱ درصد اسانس آویشن شیرازی تیمار شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که FCV می‌تواند روی برگ سبزیجات طی نگهداری در دمای یخچال (۹ روز در ۷°C) بقاء یابد. علاوه بر این، چنانکه در سوسپانسیون FCV مشاهده شد، در مخلوط سبزیجات آلوده به FCV، نگهداری در درجه حرارت یخچال موجب کاهش قابل توجه اثر ضدویروسی اسانس‌ها گردید. علت این امر ممکن است به دلیل تغییر ساختار کپسید ویروس در مواجهه با دمای پائین و کاهش دسترسی و نفوذ اسانس‌ها به برخی از مناطق ویروسی باشد. مطالعات متعددی تأثیر تیمارهای ضدعفونی‌کننده را بر ویروس‌های موجود در نمونه‌های سبزیجات، ارزیابی و گزارش نمودند که این تیمارها حذف یا غیرفعالسازی کامل ویروس‌های روده‌ای در محصولات غذایی را تضمین نمی‌کنند (۳۳).

در دهه گذشته، تأثیر ترکیبات طبیعی بکار رفته در محلول‌های مورد استفاده در تیمارهای شستشو بر نورویروس‌ها بررسی شده است. تاکنون، میزان فعالیت ضدویروسی (علیه نورویروس‌ها) اسانس‌های پونه کوهی، آویشن شیرازی و میخک (۳۲)، کیتوزان (۳۴)، آب آلبالو و پروآنتوسیانیدین‌های آلبالو (۳۵)، آب انار و پلی فنول‌های انار (۳۶، ۳۷)، آب تمشک سیاه و سفید (۳۸)، عصاره جینسنینگ قرمز کره‌ای و جینسنوزید (۳۹) مورد بررسی قرار گرفته است.

در مطالعه‌ای نیز تأثیر عصاره دانه انگور در نمونه سبزیجات مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از این بود که پس از یک دقیقه شستشو با این عصاره، غلظت ۱ تا ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی - لیتر موجب $2-3 \log$ کاهش در تیترا FCV گردید (۴۰). نتایج به پتانسیل کاربرد توأم ترکیبات طبیعی و یا سایر تیمارها جهت کاهش ویروس‌های روده‌ای در محصول غذایی اشاره می‌کند. میکروبیوتای سبزیجات شامل انواع مختلف باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشد. آویشن شیرازی بالاترین قدرت مهارکنندگی را در برابر جمعیت مزوفیل‌ها نشان داد.

رفته، سویه‌های باکتریایی و منابع ترکیبات ضد میکروبی دشوار است (۲۲). نتایج ما در خصوص اسانس آویشن شیرازی نشان داد که این اسانس واجد فعالیت ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای در برابر اشرشیاکلی O157:H7 در محیط کشت (۲۳) و نیز در مخلوط سبزیجات می‌باشد.

با توجه به آنالیز شیمیایی اسانس در این مطالعه و مطالعه میثاقی و همکاران (۲۴)، ترکیبات اصلی فعال در اسانس آویشن شیرازی شامل کارواکرول (۷۱/۱۲ درصد)، γ -ترپنین (۷/۳۴ درصد) و α -ترپنین (۴/۲۶ درصد) می‌باشد. مطالعات قبلی قدرت بازدارندگی بالای این اسانس را در برابر هر دو باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در محیط کشت (۲۵، ۲۶) و مدل‌های مواد غذایی (۲۷، ۲۸) گزارش نموده‌اند. همچنین مطالعاتی اثر باکتری‌کشی اسانس میخک (حاوی ۸۳/۹۶ درصد اوژنول و ۱۰/۷۵ درصد اوژنیل استات) را در غلظت‌های پائین گزارش کرده‌اند (۱۲، ۲۹). بطور مشابه، در مطالعه حاضر نیز اسانس میخک در برابر اشرشیاکلی O157:H7 و میکروبیوتای درون‌زا در مخلوط سبزیجات مؤثر بوده است. اسانس پونه کوهی، با ۴۶/۸ درصد کارواکرول و ۱۵/۲۶ درصد تیمول، فعالیت باکتری‌کشی بالایی در محیط کشت نشان داد. با این حال، پونه کوهی دارای فعالیت ضد میکروبی معنی‌دار از لحاظ آماری ($P < 0/05$) اما اندک (حداکثر $0/5 \log cfu/g$ کاهش) در برابر اشرشیاکلی O157:H7 در مخلوط سبزیجات تلقیح شده بصورت مصنوعی بود که از دیدگاه میکروب شناسی مواد غذایی قابل ملاحظه نمی‌باشد. بنابراین، اسانس پونه کوهی فاقد کاربرد عملی علیه اشرشیاکلی O157:H7 در مخلوط سبزیجات می‌باشد. به نظر می‌رسد که تفاوت در فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها با غلظت و ماهیت اجزای اسانس، فراریت، استخلاف‌ها و گروه‌های عامل و ساختار اجزای تشکیل‌دهنده و تعاملات سینرژیستی مرتبط باشد. تفاوت بین اسانس‌ها به شرایط زیست محیطی و عوامل رشد گیاه نیز بستگی دارد (۳۰).

ترکیبات شیمیایی اصلی این اسانس‌ها بطور عمده شامل مونوترپن - های فنولیک و هیدروکربن‌های مونوترپنی می‌باشد. اوژنول، کارواکرول و تیمول ترکیبات فنلی هستند که فعالیت قابل ملاحظه آنها در برابر باکتری‌های بیماری‌زا اثبات شده است. نویسندگان دیگر (۳۱) مشاهده نمودند که کارواکرول فعال‌ترین ترکیب در ۱۱ اسانس مورد مطالعه بوده و اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در مطالعه حاضر حاوی غلظت بالایی از این ترکیب بود.

در عین حال سطوح جمعیت میکروبی برای آویشن شیرازی و میخک پس از ۷ و ۹ روز ذخیره‌سازی مشابه بود. ترکیبات فنلی مسئول فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها بوده و این ویژگی عامل قدرت بالای ضدباکتریایی اسانس به شمار می‌رود زیرا این ترکیبات از فاز آبی خارج شده و می‌توانند در بخش آب‌گریز غشاء سیتوپلاسمی حل شوند. این فرایند باعث افزایش نفوذپذیری غشاء و اختلال در نیروی محرک پروتون، و در نتیجه آسیب کشنده به سلول باکتری می‌گردد (۷).

سرد کردن اغلب تنها عامل کنترل رشد پاتوژن‌های بیماری‌زا در محصولات تازه می‌باشد. تولیدکنندگان این گروه از محصولات اغلب نگهداری در دمای 3°C - 1°C را جهت حفظ تازگی مواد غذایی تازه توصیه می‌کنند. با این حال، این دامنه دمایی اغلب طی توزیع محصول تازه و نیز عرضه در خرده فروشی تأمین نمی‌گردد (۱۷). درجه حرارت‌های نامناسب سرد کردن، از جمله 7°C ، امکان رشد برخی از عوامل بیماری‌زا مانند اشرشیاکلی O157:H7 را فراهم می‌آورد. لذا، یافتن راه حل‌های جایگزین و بی‌خطر مانند تیمارهای کاهش‌دهنده یا از بین برنده عوامل بیماری‌زا ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر، پس از مرحله شستشو بهداشتی، اسانس-ها از طریق اسپری کردن به سبزیجات اضافه، و پس از آن توانایی آنها در کنترل رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای تلقیح شده و میکروبیوتای درون‌زا بررسی شد. نتایج نشان داد که اسانس‌ها، به ویژه آویشن شیرازی، واجد پتانسیل قابل ملاحظه‌ای جهت کاربرد به عنوان مانعی برای کاهش خطرات مربوط به آلودگی در محصولات تازه می‌باشد. همچنین اسانس‌های میخک و آویشن شیرازی واجد فعالیت ضدباکتریایی در برابر اشرشیاکلی O157:H7 تلقیح شده به سبزیجات بوده و غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی رشد باکتری‌های مختلف را کنترل نموده است. مطالعه حاضر اطلاعاتی قابل مقایسه و کمی، در خصوص فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها و کاربرد آنها به عنوان مواد نگهدارنده در مواد غذایی ارائه نمود. هنگامی که ادویه‌جات و گیاهان دارویی به عنوان افزودنی و طعم-دهنده در مواد غذایی آماده بکار می‌روند میزان ترکیبات فعال آنها برای اعمال تأثیرات ضد میکروبی کافی نیست. در مقابل، اسانس-های فرار، که اغلب شامل اجزای اصلی معطر و طعم‌دهنده گیاهان و ادویه‌جات می‌باشند، حتی زمانی که به مقدار کم به مواد غذایی افزوده شوند، بدون ایجاد تغییر نامطلوب در خواص حسی می-توانند آلودگی باکتریایی را کاهش دهند. استفاده از اسانس آویشن

شیرازی برای نگهداری ماهی نیز گزارش شده است (۴۱). در مطالعه انجام شده توسط اختیارزاده و همکاران فیله ماهی با اسانس آویشن شیرازی تیمار شده و نتایج ارزیابی حسی پس از آن نشان داد که طعم نمونه‌ها طی استفاده از غلظت‌های ۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵ درصد اسانس مطلوب و در غلظت ۰/۸۱۰ درصد نامطلوب می‌باشد (۲۷). مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که در آن اسانس آویشن شیرازی در سبزیجات بکار برده شده و غلظت کل اسانس در محصول (درصد V/W) ۰/۰۹۶، ۰/۱۶۰ و ۰/۳۲۰ بدون اثرات منفی بر خواص حسی بوده است.

■ نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهد که اسانس‌ها، به خصوص آویشن شیرازی، واجد توانایی کاهش خطرات مربوط به آلودگی‌های میکروبی در سالاد و مخلوط‌های سبزیجات برگی می‌باشند. لیکن، مطالعات بیشتری برای تعیین غلظت مؤثر اسانس‌ها در برابر میکروارگانیسم‌ها در سایر مواد غذایی، و همچنین تأثیر غلظت‌ها بر طعم و ویژگی‌های حسی نیاز است. علاوه بر به تأخیر انداختن فساد، بهبود خواص حسی میوه‌ها و سبزیجات تازه برش خورده می‌تواند از نقطه نظر تجاری نیز جالب توجه باشد. در این راستا، می‌توان جهت افزایش تأثیر سینرژیستی ضد میکروبی، اسانس‌هایی که به عنوان ادویه بکار نمی-روند یا با عطر و طعم تند همراه نیستند را در تولید محصولات تازه بکار برد. هنگامی که شیوه‌های مناسب بهداشتی در سراسر زنجیره تولید سبزیجات تازه اعمال شود، استفاده از اسانس‌ها به عنوان مواد نگهدارنده می‌تواند موجب بهبود ایمنی و کیفیت مواد غذایی گردد. محدودیت‌هایی همچون عدم امکان استفاده از انواع اسانس‌های دیگر به علت ایجاد طعم نامطلوب و قوی برای مصرف‌کننده و نیز روشن نبودن تأثیر برخی اسانس‌ها بر عملکرد فیزیولوژیک بدن در مطالعاتی از این دست مشاهده می‌شود که نیاز به بررسی‌های بیشتر جهت امکان جداسازی و تفکیک ترکیبات اسانس‌ها و مطالعه تأثیر ترکیبات عمده اسانس‌ها در بدن دارد.

■ تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر با استفاده از امتیاز پژوهشی شماره AGL2009-08603 از طرف وزارت علوم و ابداعات کشور اسپانیا و امتیاز پژوهشی اعطایی ACOMP/2010/279 و ACOMP/2012/199 از طرف فرمانداری شهر والنسیا، اسپانیا، انجام شد.

■ References

1. Warriner K, Huber A, Namvar A, Fan W, Dunfield K. Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Adv Food Nutr Res.* 2009;57:155-208.
2. Olaimat AN, Holley RA. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol.* 2012;32(1):1-19.
3. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swardlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:603-9.
4. Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, Tauxe RV. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Prot.* 2004;67(10):2342-53.
5. Scharff RL. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J Food Prot.* 2012;75(1):123-31.
6. Gil MI, Selma MV, Lopez-Galvez F, Allende A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *Int J Food Microbiol.* 2009;134:37-45.
7. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):223-53.
8. Ponce A, Roura SI, Moreira MR. Essential oils as biopreservatives: different methods for the technological application in lettuce leaves. *J Food Sci.* 2011;76(1):34-40.
9. Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M, et al. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J Agri Food Chem.* 2004;52:3530-5.
10. Elizaquivel P, Sanchez G, Aznar R. Application of propidium monoazide quantitative PCR for selective detection of live *Escherichia coli* O157:H7 in vegetables after inactivation by essential oils. *Int J Food Microbiol.* 2012;159(2):115-21.
11. Karagözlü N, Ergönül B, Özcan D. Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* O157:H7 and *S. typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane. *Food Control.* 2011;22(12):1851-5.
12. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 2007;18(5):414-20.
13. Piskernik S, Klancnik A, Tandrup Riedel C, Brondsted L, Smole-Mozina D. Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. *Food Control.* 2011; 22(5):718-24.
14. Tsigarida E, Skandamis P, Nychas GJ. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 degrees C. *J Appl Microbiol.* 2000;89(6):901-9.
15. Azizkhani M, Misaghi A, Basti AA, Gandomi H, Hosseini H. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Int J Food Microbiol.* 2013;163(2-3):159-65.
16. Schmidt H, Bielaszewska M, Karch H. Transduction of Enteric *Escherichia coli* Isolates with a Derivative of Shiga Toxin 2-Encoding Bacteriophage ϕ 3538 Isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(9):3855-61.
17. Luo Y, He Q, McEvoy JL, Conway WS. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of indigenous microorganisms on commercially packaged baby spinach, as impacted by storage temperature and time. *J Food Prot.* 2009;72(10):2038-45.
18. Sanchez G, Elizaquivel P, Aznar R. A single method for recovery and concentration of enteric viruses and bacteria from fresh-cut vegetables. *Int J Food Microbiol.* 2012;152(1-2):9-13.

19. Soderstrom A, Osterberg P, Lindqvist A, Jonsson B, Lindberg A, Blide US, et al. A large Escherichia coli O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. *Foodborne Pathogens Dis.* 2008;5(3):339-49.
20. Grant J, Wendelboe AM, Wendel A, Jepson B, Torres P, Smelser C, et al. Spinach-associated Escherichia coli O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(10):1633-6.
21. Wendel AM, Johnson DH, Sharapov U, Grant J, Archer JR, Monson T, et al. Multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August–September 2006: the Wisconsin investigation. *Clin Infect Dis.* 2009;48(8):1079-86.
22. Jerkovic I, Mastelic J, Milos M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare*. L. spp. *Hirtum* grown wild in Croatia. *Int J Food Sci Technol* [Serial on the Internet]. 2001;36(6):649-54. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2621.2001.00502.x/abstract>.
23. Elizaquivel P, Azizkhani M, Sanchez G, Aznar R. Evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil activity against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* by Propidium Monoazide quantitative PCR in vegetables. *Food Control.* 2013;34(2):770-6.
24. Misaghi A, Basti AA. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control.* 2007;18(9):1043-9.
25. Basti AA, Misaghi A, Khaschabi D. Growth response and modeling of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *LWT-Food Sci Technol.* 2007;40(6):973-81.
26. Saei-Dehkordi SS, Tajik H, Moradi M, Khalighi-Sigaroodi F. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(6):1562-7.
27. Ekhtiarzadeh H, Basti AA, Misaghi A, Sari A, Khanjari A, Rokni N, Abbaszadeh S, Partovi R. Growth response of on *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in salted fish fillets as affected by *Z. multiflora* Boiss. essential oil, nisin and their combination. *J Food Safety* 2012 Dec; 32: 263–69.
28. Moradi M, Tajik H, Razavi Rohani SM, Oromiehie AR. Effectiveness of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract impregnated chitosan film on ready-to-eat mortadella-type sausages during refrigerated storage. *J Sci Food Agric.* 2011;91(15):2850-7.
29. Leuschner RG, Lelsch V. Antimicrobial effects of garlic, clove and red hot chilli on *Listeria monocytogenes* in broth model systems and soft cheese. *Int J Food Sci Nutr.* 2003;54(2):127-33.
30. Chang ST, Chen PF, Chang, SC. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol.* 2001;77(1):123-7.
31. Kim J, Marshall MR, Wei Ch. Antimicrobial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J Agri Food Chem.* 1995;43(11):2839-45.
32. Elizaquivel P, Azizkhani M, Aznar R, Sanchez G. The effect of essential oils on norovirus surrogates. *Food Control.* 2013;32(1):275-8.
33. Baert L, Debevere J, Uyttendaele M. The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *Int J Food Microbiol.* 2009;131(2-3):83-94.
34. Su X, Zivanovic S, D'Souza DH. Effect of chitosan on the infectivity of murine norovirus, feline calicivirus, and bacteriophage MS2. *J Food Prot.* 2009;(12):2448-681.
35. Su X, Howell AB, D'Souza DH. Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborne viral surrogates-a time dependence study in vitro. *Food Microbiol.* 2010;27(8):985-91.
36. Su X, Sangster MY, D'Souza DH. In vitro effects of pomegranate juice and pomegranate polyphenols on foodborne viral surrogates. *Foodborne Pathogens Dis.* 2010;7(12):1473-9.



37. Su X, Sangster MY, D'Souza DH. Time-dependent effects of pomegranate juice and pomegranate polyphenols on foodborne viral reduction. Foodborne Pathogens Dis. 2011;8(11):1177-83.
38. Oh M, Bae SY, Lee JH, Cho KJ, Kim KH, Chung MS. Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) juice on foodborne viral surrogates. Foodborne Pathogens Dis. 2012;9(10):915-25.
39. Lee MHL, Lee BH, Jung JY, Cheon DS, Kim KT, Choi C. Antiviral effect of Korean red ginseng extract and ginsenosides on murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus. J Ginseng Res. 2011;35(4):429-35.
40. Su X, D'Souza DH. Grape seed extract for foodborne virus reduction on produce. Food Microbiol. 2013;34(1):1-6.
41. Choobkar N, Soltani M, Mousavi HE, Basti A, Matinfar A. Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* in the light salted fillets of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Iran J Fish Sci. 2010;9:352-9.



The Effect of Essential Oils on Foodborne Pathogens in Leafy Vegetables

Maryam Azizkhani^{*1}, Patricia Elizaquivel²

1- Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

2- PhD of Microbiology, Researcher, Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Valencia, Spain.

Received Date: 24/12/2014

Accepted Date: 02/03/2015

Abstract

Background and Aims

Prepared vegetables mixes are one of the most promising developments in the fresh-cut food industry. The aim of this study was to investigate the ability of *Origanum compactum* (oregano), *Eugenia caryophyllus* (clove), and *Zataria multiflora* Boiss (zataria) essential oils (EOs) to control the growth of potentially cross contaminating pathogens and endogenous microbiota in commercial vegetable leaves, processed in a fresh-cut produce company.

Materials and Methods

After the sanitizing washing step, 25 grams of vegetables were packed in sterile poly-ethylen bags and sprayed by various concentrations (3, 5 and 10 percent) of emulsions of EOs (0.8 ml).

Results

Zataria EO emulsions of 3 percent, 5 percent and 10 percent reduced *Escherichia coli* O157:H7 by 1.7, 2.2 and 3.5 log cfu/g in vegetables after 5 days of storage at 7 °C. By contrast, reductions in *E. coli* O157:H7 counts remained the same when clove was applied at concentrations of 5 percent and 10 percent (2.5 log cfu/g reduction). Oregano (10 percent) reduced inoculated *E. coli* O157:H7 counts in vegetables by a maximum of 0.5 log cfu/g after 5 days of storage at 7 °C. *Zataria* showed strong antimicrobial efficacy against *E. coli* O157:H7 and also against the endogenous microbiota of vegetables stored for 9 days. Feline calicivirus (FCV), anorovirus surrogate, survived on inoculated vegetables during refrigerated storage (9 days at 7 °C) regardless of treatment. Refrigeration temperatures completely annulled the effectiveness of the EOs against FCV.

Conclusion

This study shows that EOs, and *zataria* in particular, have great potential use as an additional barrier to reduce contamination-related risks in salads.

Keywords

Bacteria, Volatile Oils, Foodborne Diseases, Vegetables

* Corresponding Author: Amol University of Special Modern Technologies, Faculty of Veterinary Medicine.

E-mail: Azizkhani.maryam@gmail.com