**مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران**
**سال شانزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، صفحات ۹۶-۸۵**

# اثر پوشش کیتوزان حاوی تیمول و اوژنول بر *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ تلقیح شده در فیله گوشت مرغ

امین میریان[۱]، مجید امین زارع[۲]، سیده سمیرا یوسفی زاده[۳]، حسن حسن‌زاد آذر[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران
۲- دانشیار گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران
۳- کارشناسی ارشد گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران
۴- نویسنده مسئول، دانشیار گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران. پست الکترونیکی: hassanzadazar_h@zums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۱۱

## چکیده

**سابقه و هدف:** با توجه به نبود مطالعه‌ای در مورد اثرات ضد میکروبی پوشش‌های خوراکی حاوی ماده مؤثره‌های تیمول و اوژنول در مدل مواد غذایی، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر پوشش کیتوزان حاوی تیمول و اوژنول بر کنترل پاتوژن‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ در فیله گوشت مرغ نگهداری شده در دمای یخچال بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، فعالیت ضد میکروبی تیمول و اوژنول علیه برخی پاتوژن‌های غذایی با استفاده از متدهای میکرودایلوشن و دیسک دیفیوژن و اثر ترکیبی آن ها در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش چکر بورد و هم چنین اثر پوشش کیتوزان حاوی تیمول و اوژنول بر مهار رشد *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ و مخلوط سویه‌های مختلف باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و تلقیح شده به مدل غذایی (فیله گوشت مرغ) در طول دوره نگهداری در دمای یخچال و شمارش آنها در روزهای ۰، ۴، ۸ و ۱۲ مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی تیمول روی باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ به ترتیب ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر و حداقل غلظت مهارکنندگی اوژنول بر باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ به ترتیب ۰/۶ و ۱/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود. ارزیابی ترکیب هم زمان تیمول و اوژنول، فعالیت سینرژیستی آن‌ها را روی باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد. میانگین تعداد باکتری‌های تلقیح‌شده در گوشت مرغ پوشش داده شده با کیتوزان حاوی هریک از مواد مؤثره و حالت ترکیبی آن‌ها در طول دوره ۱۲روزه کاهش معنی‌داری داشت ($P<0/05$).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به اثرات ضد میکروبی خوب تیمول و اوژنول هر کدام به‌تنهایی و در ترکیب با هم، پوشش کیتوزان غنی‌شده با این دو ترکیب می‌تواند در جلوگیری از رشد پاتوژن‌های سطح مواد غذایی و به‌ویژه گوشت مرغ کاربرد داشته و مورد استفاده صنایع غذایی قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** تیمول، اوژنول، *لیستریا مونوسیتوژنز* ، *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ ، پوشش کیتوزان

## • مقدمه

گوشت مرغ یکی از غذاهای پرمصرف پروتئینی است، که با وجود پروتئین‌هایی با قابلیت هضم بالا، خوش طعم و کم کالری بودن، منبع بالقوه‌ای در انتقال باکتری‌های بیماری‌زا شناخته شده است. در بسیاری از کشورها، یکی از چالش‌های بزرگ آلودگی این محصول با میکروارگانیسم‌های بیماریزایی مانند، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌باشد که می‌توانند باعث مسمومیت‌های ناشی از مصرف گوشت مرغ شوند (۱). *لیستریا مونوسیتوژنز* پاتوژنی گرم مثبت، هوازی تا بی هوازی اختیاری، میله‌ای شکل و داخل سلولی است که درصورت انتقال از طریق غذا، می‌تواند منجر به بیماری لیستریوزیس و در مواردی سبب مرگ شود. عفونت غذایی این باکتری می‌تواند منجر به عوارضی مانند مننژیت، و سپتی سمی در نوزادان و افراد با نقص ایمنی و سقط جنین در زنان شود (۲). *لیستریا مونوسیتوژنز* قادر به رشد در دمای ۴۵-۱ درجه سلسیوس، pH بین ۴/۵-۹/۶، و غلظت‌های بالای نمک بوده و قادر است به خوبی در سطح

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

گوشت و فراورده‌های آن رشد کند (۳). *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ نیز به عنوان یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های روده‌ای گرم منفی و میله‌ای شکل، از عوامل اصلی مسمومیت غذایی و بیماری‌هایی مانند اسهال،کولیت خونریزی دهنده، سندروم اورمیک همولتیک و حتی مرگ در انسان است. *اشریشیا کلی* جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش است و معمولا همراه مدفوع دفع می‌شود. این باکتری پتانسیل آلوده کردن گوشت قرمز و گوشت مرغ را دارد. و اغلب عفونت‌های بالینی ناشی از آن با مصرف گوشت چرخ کرده نپخته در ارتباط است (۴).

امروزه فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی بر پایه پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، لیپیدها یا ترکیبی از آن ها علاوه بر رفع مسائل زیست محیطی و اقتصادی استفاده از پلاستیک‌ها در صنعت، در قالب بسته بندی فعال به عنوان حاملی برای افزودنی‌ها و ترکیبات مختلف مانند مواد ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان‌ها و غیره مورد استفاده قرار گرفته و قادر هستند ایمنی، ماندگاری،کیفیت و ویژگی‌های حسی ماده ی غذایی را بهبود بخشند (۶، ۵). کیتوزان پلی‌ساکاریدی کاتیونی است که از فرآیند استیل‌زدایی کیتین در شرایط قلیایی به دست می‌آید و به دلیل ویژگی‌های مختلفی مثل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، عدم سمیت و خواص ضد میکروبی دارای مزایای زیادی در صنایع مختلف است (۸، ۷). در حال حاضر نگهدارنده‌های شیمیایی به منظور افزایش زمان ماندگاری و حفظ کیفیت، به طور متداول در مواد غذایی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. از آنجایی که اثرات جانبی این نگهدارنده‌ها به طور کامل شناخته شده نبوده و به علت مضرات احتمالی استفاده مداوم از آنها در مواد غذایی، کاربرد نگه دارنده‌های طبیعی مانند اسانس‌های روغنی و عصاره‌های گیاهی و ماده مؤثره آنها از جمله تیمول و اوژنول رو به افزایش است (۹). امروزه از اسانس‌های روغنی (EOs) حاصل از گیاهان به عنوان ترکیبات نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود و اثرات بسیار مناسبی از آنها در کنترل باکتری‌های عامل فسادزا و بیماری‌زا و افزایش طول عمر نگهداری مواد غذایی گزارش شده است (۱۰). این ویژگی‌ها به دلیل ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌ها بوده بطوری‌که نقش ترکیبات فعال اسانس‌های روغنی مانند اوژنول، تیمول، کارواکرول در افزایش نگهداری مواد غذایی به اثبات رسیده است (۱۲، ۱۱).

تیمول (Thymol) (۵-متیل ۲-ایزوپروپیل فنول) یک ترکیب فنولی مونوترپنی بوده و منبع طبیعی اصلی آن گیاه آویشن (*Thymus Vulgaris L*) است. این ماده دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهاب، ضد عفونی کننده، ضد باکتریایی و ضد قارچی است که اثرات ضد میکروبی آن در برابر پاتوژن‌های مواد غذایی به اثبات رسیده است (۱۴، ۱۳). اوژنول (Eugenol) (۴-آلیل-۲-متوکسی فنول) نیز که ترکیب اصلی موجود در اسانس گیاه میخک (*Syzygium aromaticum*) است یک فنول آمفی پاتیک آلی بوده و اثر ضد میکروبی آن بر طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به اثبات رسیده است (۱۵). مکانیسم اثر ترکیبات فنلی ایجاد اختلال در غشای سیتوپلاسمی، بر هم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی و انعقاد محتویات سلولی می‌باشد (۱۷، ۱۶). تیمول فعالیت آنزیمی را کاهش و یکپارچگی غشا را مختل می‌کند (۱۸)، و اوژنول نیز از طریق اختلال در غشای سیتوپلاسمی و اتصال به پروتئین ها، از عملکرد آنزیمی جلوگیری می‌کند (۱۶). تاکنون مطالعات بسیاری در رابطه با اثرات ضد میکروبی پوشش‌های خوراکی حاوی اسانس‌های مختلف صورت گرفته است. Fernandez و همکاران (۲۰۱۴) اثرات ضد میکروبی پوشش‌های خوراکی حاوی اسانس میخک و پونه را گزارش نموده‌اند. مطالعه Bazargani-Gilani و همکاران (۲۰۱۵) نیز در مورد اثر غوطه وری آب انار و پوشش کیتوزان غنی شده با اسانس روغنی آویشن شیرازی تایید کننده اثرات ضدمیکروبی گیاه آویشنی بوده است که ماده مؤثره اصلی ترکیب آن تیمول بوده است (۲۰، ۱۹). بررسی‌های حسی انجام شده در مطالعات مختلف بیانگر اثرات منفی اسانس‌ها بر ویژگی‌های ارگانولپتیک مواد غذایی و بسته-بندی آنها است. از این‌رو رویکرد به سوی استفاده از ماده مؤثره اصلی موجود در این دسته از ترکیبات مورد توجه قرار گرفته است (۲۲، ۲۱). تاکنون مطالعه ای در مورد اثرات ضد میکروبی پوشش‌های خوراکی حاوی ماده مؤثره‌های تیمول و اوژنول در مدل مواد غذایی صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر پوشش کیتوزان حاوی تیمول و اوژنول برماندگاری *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ در فیله گوشت مرغ می باشد.

## • مواد و روش‌ها

**مواد:** محیط کشت های EMB agar[1] ، BHI broth[2] ، BHI agar[3]، مولرهینتون آگار[4] و پپتون واتر[5] از شرکت CONDA اسپانیا، محیط کشت Listeria CHROMagar™ (شرکت

[1]Eosin Methylene- Blue Lactose Sucrose Agar
[2]Brain Heart Infusion Broth
[3]Brain Heart Infusion Agar
[4]Muller Hinton Agar
[5]Pepton Water

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

CHOROM agar فرانسه) و اوژنول، کیتوزان، تیمول، اتانول۹۶٪، دی متیل سولفو اکساید، قطره کلرامفنیکل، دیسک کلرامفنیکل، و سایر مواد شیمیایی (شرکت‌های SIGMA- ALDRICH آمریکا و Merck آلمان و با واسطه شرکت آرتابای ارومیه، ایران خریداری شدند. ویال‌های لیوفلیزه *لیستریامونوسیتوژنز* سویه‌های ( ATCC 19115, ATCC 19114 ,ATCC 13932)، *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ سویه(NCTC 12900 )، *اشریشیا کلی* سویه‌های ( ATCC 25922 ,ATCC 15224 ,10536) و *استافیلوکووس اورئوس* سویه های( ATCC 29213, ATCC ATCC 25923, 9144) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

**روش آماده‌سازی میکروارگانیسم‌ها**: سوسپانسیون سویه‌های مورد مطالعه موجود در آزمایشگاه دانشکده بهداشت، بر اساس دستورالعمل سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و سپس مخلوطی از سویه‌های مشابه هر نوع باکتری با حجم مساوی آماده‌سازی شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی مورد نظر به محیط BHI broth انتقال داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از تهیه رقت سریال، جذب نوری آن‌ها به وسیله دستگاه طیف‌سنج نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر، قرائت شد. جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱ معادل تقریبی $10^8$ CFU/ml در نظر گرفته شد و جهت تعیین دوز تلقیح باکتری از لوله حاوی $10^8$ با آب پپتونه ۰/۱ ٪ رقت مورد نظر تهیه شد. شمارش تاییدی باکتریایی به روش کشت سطحی در محیط آگار صورت گرفت (۲۳).

**آماده سازی غلظت‌های تیمول و اوژنول:** برای آماده‌سازی غلظت‌های تیمول از حلال DMSO[1] ۵ ٪ استفاده شد. برای تهیه غلظت‌های مورد نظر، به ترتیب، ۱۰میلی‌گرم تیمول با ۱سی‌سی حلال مخلوط شده تا غلظت ۱۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر حاصل شود و به همین ترتیب غلظت‌های ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶، ۰/۳، ۰/۱۵ و ۰/۰۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. برای غلظت‌های اوژنول نیز ۱۰میلی‌لیتر اوژنول را با ۱سی‌سی حلال تا غلظت ۱میلی‌گرم در میلی‌لیتر مخلوط و برای تهیه سایر غلظت‌ها به ترتیب ۵ و ۲/۵میلی‌گرم در میلی-لیتر اوژنول نیز تهیه شد.

**روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC[2]) و حداقل غلظت کشندگی (MBC[3])**: برای تعیین MIC و MBC از آزمایش میکرودایلوشن (Microdilution) بر اساس متد حسن‌زاد آذر و همکاران (۲۰۱۹) استفاده گردید. بطور خلاصه، در میکرو پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای: ۱۶۰ میکرو لیتر BHI براث ، ۲۰ میکرولیتر باکتری و ۲۰ میکرولیتر ماده بیواکتیو در غلظتهای مورد نظر(در مجموع ۲۰۰ میکرولیتر) ریخته شد و در آخر میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند، در این آزمایش از آنتی بیوتیک کلرامفنیکل، به عنوان گروه کنترل منفی و حلال مواد بیواکتیو مورد نظر، به عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شد.کمترین غلظتی از ماده بیواکتیو که باکتری‌ها در آن کاهش جمعیتی نشان داده باشند و کدورت چاهک کاهش یافته باشد، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی از همه چاهک‌های فاقد کدورت، در محیط مولرهینتون‌آگار کشت داده شد. محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شده و کم‌ترین غلظتی از ماده بیواکتیو که باعث کشته شدن حداقل ۹۹٪ باکتری‌ها شود به عنوان حداقل غلظت کشندگی(MBC) گزارش شد(۲۴).

**ارزیابی اثر ترکیبی تیمول و اوژنول در خاصیت ضدمیکروبی:** به منظور بررسی برهم‌کنش ضد میکروبی تیمول و اوژنول، غلظت بازدارنده افتراقی FIC( Fractional Inhibitory Concentration) تعیین گردید. یکی از روشهای ارزیابی اثر هم‌افزایی داروها و مواد مؤثره دارویی در مقایسه با اثر هر یک از آنها، ارزیابی به روش چکر بورد ( Checkerboard Assay) است. این مقایسه با استفاده از تعیین شاخص غلظت بازدارندگی افتراقی صورت می‌گیرد. مقدار شاخص FIC، ترکیبی از مواد مؤثره را در نظر می گیرد که بیشترین تغییر را نسبت به MIC هر ماده مؤثره به‌تنهایی نشان می‌دهد. شاخص FIC از رابطه زیر محاسبه گردید. برای تعیین MIC غلظت‌های ترکیبی دو ماده از غلظت ۰/۳۱ تا ۰/۰۷ میلی‌گرم/میلی لیتر برای تیمول و غلظت ۰/۶۲ تا ۰/۱۵ میلی‌گرم/میلی لیتر برای اوژنول که جمعا ۹ غلظت ترکیبی از آن‌ها به دست آمد طبق روش میکرودایلوشن بر روی باکتری‌ها انجام گرفت (۲۴).

$$FIC\ (A) = \frac{\text{حداقل غلظت مهاری ماده A در حالت ترکیبی}}{\text{حداقل غلظت مهاری ماده A به تنهایی}}$$

$$FIC\ (B) = \frac{\text{حداقل غلظت مهاری ماده B در حالت ترکیبی}}{\text{حداقل غلظت مهاری ماده B به تنهایی}}$$

$$FIC_{index} = FIC_A + FIC_B$$

[1]Dimethyl sulfoxide
[2]Minimum Inhibitory Concentration
[3]Minimum Bacteriocidal Concentration

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

پس از محاسبه $FIC_{index}$ نتایج بدین صورت تفسیر می گردد: در $FIC_{index}$ کوچک تر یا مساوی با ۰/۵ بر هم کنش از نوع هم افزایی (Synergism)، بزرگتر از ۰/۵ تا ۱ از نوع افزایشی (Additive)، بزرگ تر از ۱ تا کوچک‌تر از ۲ از نوع عدم تأثیر (Indifferent) و مساوی یا بزرگ تر از ۲ از نوع متضاد (Antagonism) (۲۶، ۲۵).

**آماده‌سازی فیله و روش‌های تلقیح باکتری‌ها به گوشت-مرغ**: فیله مرغ در شرایط استریل به آزمایشگاه دانشکده بهداشت انتقال داده شد. فیله‌ها با آب مقطر شسته، ۳۰ دقیقه آبکشی شده، و به قطعات ۲۵ گرمی ، ۴ در ۴ سانتی متر با ضخامت ۱ سانتی‌متر تقسیم و به‌مدت ۵-۳ دقیقه در اتانول ۷۰٪ غوطه‌ور شد (برای حذف فلورمیکروبی نرمال). نمونه‌های گوشت مرغ استریل شده در زیر هود استریل قرارداده شده و پس از تبخیر اتانول از سطح نمونه‌ها، مورد تیمار مختلف قرار گرفتند. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آماده شده از سویه-های مختلف *لیستریا مونوسیتوژنز* حاوی $10^6$ سلول در هر میلی‌لیتر از سویه‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ که حاوی $10^4$ سلول در هر میلی لیتر بر سطح نمونه‌های ۲۵گرمی فیله مرغ در دو گروه تلقیح شد. سپس فیله‌ها، به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه زیر هود استریل و درکنار شعله قرار داده شد تا اتصال باکتری به سطح نمونه انجام بگیرد (۲۷) .

**پوشش‌دهی فیله‌مرغ و تهیه تیمارهای مختلف**: در ابتدا محلول پوشش کیتوزان با انحلال ۲ گرم کیتوزان در ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک ۱ درصد (حجمی/حجمی) درشرایط استریل تهیه گردید. جهت انحلال کامل محلول فوق به مدت ۲ ساعت روی همزن مغناطیسی در شرایط استریل قرار داده شد. سپس به عنوان منعطف کننده به ازای هر گرم کیتوزان، ۰/۷۵میلی لیتر گلیسرول به محلول افزوده شد. محلول فوق برای اختلاط کامل به مدت ۱۰ دقیقه با همزن مغناطیسی مخلوط گردید. سپس، نمونه‌های فیله‌مرغ تلقیح شده با باکتری‌ها را به منظور پوشش دهی به مدت ۳۰ثانیه در پوشش کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف تیمول، اوژنول و حالت ترکیبی آنها برمبنای MIC و MBC به دست آمده از غلظت-های مورد نظر ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶ میلی‌گرم/میلی لیتر تیمول و غلظت‌های ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر اوژنول غوطه‌ور و بعد خارج گردیده و پس از ۲دقیقه مجددا ۳۰ ثانیه در هر دو محلول، غوطه‌ور شدند (جدول ۳ و ۴). فیله‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۰درجه، فیله مرغ با پوشش کیتوزان و بدون ماده بیو اکتیو، در شرایط استریل آویزان شده تا لایه کیتوزان تشکیل گردد. ده تیمار کنترل (فیله بدون پوشش و بدون ماده مؤثره)، فیله مرغ با پوشش کیتوزان حاوی تیمول ۰/۶ میلی‌گرم/میلی لیتر ، فیله مرغ با پوشش کیتوزان حاوی تیمول ۱/۲۵ میلی‌گرم/میلی لیتر ،فیله مرغ با پوشش کیتوزان حاوی تیمول ۲/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر، فیله مرغ با پوشش کیتوزان حاوی تیمول ۵ میلی‌گرم/میلی لیتر، فیله مرغ با پوشش کیتوزان حاوی اوژنول ۲/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر، فیله مرغ با پوشش کیتوزان حاوی اوژنول ۵ میلی‌گرم/میلی لیتر، فیله مرغ با پوشش کیتوزان حاوی (تیمول ۲/۵ و اوژنول ۵) میلی‌گرم/میلی لیترفیله مرغ با پوشش کیتوزان حاوی(تیمول۵ و اوژنول ۵) میلی‌گرم/میلی لیترتهیه و آماده شد. تیمارها در شرایط استریل، در دمای ۴ درجه سلسیوس، نگهداری و نمونه ها در روزهای (۰، ۴، ۸، ۱۲) به طور تصادفی به منظور ارزیابی میکروبی، انتخاب شدند (۲۹، ۲۸).

**آنالیزهای میکروبی**: نمونه‌ها در روزهای صفر (بلافاصله پس از تلقیح)، ۴، ۸، ۱۲ از یخچال خارج‌شده و ابتدا از نمونه‌های (۲۵گرمی) تلقیح شده، ۱۰ گرم در شرایط استریل جداگردیده و به همراه ۹۰ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده پپتون واتر ۰/۱ ٪، با استفاده از دستگاه بگ میکسر، هموژن شده و از مخلوط حاصل، از هر نمونه به میزان ۱ میلی‌لیتر برداشته و رقت‌سازی سریال انجام گردید. برای شناسایی و شمارش باکتری‌ها از محیط اختصاصی لیستریا کروم آگار برای *لیستریا مونوسیتوژنز* و از محیط EMB آگار برای کشت *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ به صورت دراپ پلیت (Plate Drop) کشت داده شد و به‌ترتیب مدت ۴۸ و ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه گرمخانه-گذاری شده و در نهایت مورد شمارش قرار گرفتند. آنالیز و شمارش باکتری‌ها در ۳ تکرار انجام شد (۳۰).

**آنالیزهای آماری**: میانگین تعداد هر دو باکتری در روزهای (۰، ۴، ۸، ۱۲) به شیوه MEAN±SD تعیین شد. روند تغییرات لگاریتم تعداد باکتری و مقایسه لگاریتم تعداد باکتری بین گروه‌ها در دوره ۱۲ روزه و مقایسه روزها و نیز مقایسه تیمارها در یک روز، توسط آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) و Tukey در سطح ۰/۰۵ و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

## • یافته‌ها

در جدول ۱ حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تیمول و اوژنول بر باکتری‌های، *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ ، *لیستریا مونوسیتوژنز* ، *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده شده است. پایین‌ترین

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

MIC و MBC تیمول، مربوط به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌گرم/میلی لیتر، در حالی که بالاترین MIC وMBC تیمول، مربوط به باکتری *اشریشیا کلی* به ترتیب در غلظت‌های ۱/۲۵ و۲/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر بود. هم چنین در مورد اوژنول، پایین‌ترین MIC و MBC، مربوط به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب در غلظت‌های ۰/۶ و ۱/۲۵ میلی‌گرم/میلی لیتر ، و بالاترین MIC وMBC مربوط به باکتری *اشریشیا کلی* به ترتیب در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/میلی لیتر، بود.

**جدول۱.** نتایج آزمایشات MIC و MBC

| ترکیبات فنلی | سویه | MIC(mg/ml) | MBC(mg/ml) |
|---|---|---|---|
| تیمول | *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ | ۰/۶ | ۱/۲۵ |
| | *لیستریا مونوسیتوژنز* | ۰/۳ | ۰/۶ |
| | *اشریشیاکلی* | ۱/۲۵ | ۲/۵ |
| | *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۰/۶ | ۲/۵ |
| | *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ | ۱/۲۵ | ۲/۵ |
| اوژنول | *لیستریا مونوسیتوژنز* | ۰/۶ | ۱/۲۵ |
| | *اشریشیاکلی* | ۲/۵ | ۵ |
| | *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۱/۲۵ | ۲/۵ |

در جدول۲ نتایج شاخص FIC، باکتری‌های *اشریشیا کلی* ، *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* برای ترکیبات تیمول و اوژنول نشان داد که از میان باکتری‌های گرم منفی مورد مطالعه، باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ حساسیت بیشتری نسبت سویه‌های *اشریشیا کلی* در برابر قدرت هم افزایی تیمول و اوژنول نشان داد. و در میان باکتری‌های گرم مثبت، باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای حساسیت بیشتری در برابر اثر هم‌افزایی تیمول و اوژنول بود.

اثر ضدمیکروبی پوشش‌های کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف تیمول، اوژنول و ترکیب این ماده مؤثره بر پاتوژن‌های *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده به گوشت مرغ به عنوان مدل ماده غذایی در طی دوره نگهداری ۱۲ روزه در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است.

مقایسه نتایج روزهای مختلف تیمارهای پوشش کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اوژنول در جدول ۴ و نمودارهای ۱ و ۲ آمده است.

**جدول ۲.** شاخص FIC در مورد تیمول و اوژنول

| سویه باکتریایی | | MIC in combination | FIC | FIC index | نتایج |
|---|---|---|---|---|---|
| *اشریشیاکلی* | تیمول | ۰/۱۵ | ۰/۱۲ | ۰/۳۶۸ | سینرژیستی |
| | اوژنول | ۰/۶۲ | ۰/۲۴ | | |
| *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ | تیمول | ۰/۰۷ | ۰/۱۱ | ۰/۳۶۰ | سینرژیستی |
| | اوژنول | ۰/۳۱ | ۰/۲۴ | | |
| *استافیلوکوکوس اورئوس* | تیمول | ۰/۱۵ | ۰/۲۴ | ۰/۴۸۹ | سینرژیستی |
| | اوژنول | ۰/۳۱ | ۰/۲۴ | | |
| *لیستریا مونوسیتوژنز* | تیمول | ۰/۰۷ | ۰/۲۲ | ۰/۴۶۷ | سینرژیستی |
| | اوژنول | ۰/۱۵ | ۰/۲۴ | | |

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

**جدول ۳.** لگاریتم شمارش باکتری *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه‌های گوشت مرغ پوشش‌داده شده با کیتوزان حاوی تیمول و حالت‌های ترکیبی آن با اوژنول (Mean±SD)

| تیمارmg/ml | روز ۰ | روز ۴ | روز ۸ | روز۱۲ |
|---|---|---|---|---|
| *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ | | | | |
| کنترل | ۴/۰۳±۰/۰۱$^{aA}$ | ۳/۸۴±۰/۰۱$^{aA}$ | ۳/۷۹±۰/۰۲$^{aA}$ | ۳/۷۶±۰/۰۱$^{aA}$ |
| پوشش کیتوزان ٪۲ | ۳/۶۵±۰/۰۱$^{aB}$ | ۳/۵۲±۰/۰۲$^{aB}$ | ۳/۳۴±۰/۰۳$^{aB}$ | ۳/۲۳±۰/۰۳$^{aB}$ |
| کیتوزان+ تیمول(۰/۶) | ۳/۳۱±۰/۰۲$^{aC}$ | ۳/۱۱±۰/۰۳$^{aC}$ | ۳/۰۸±۰/۰۲$^{aB}$ | ۳/۰۶±۰/۰۲$^{aB}$ |
| کیتوزان+تیمول(۱/۲۵) | ۲/۹۹±۰/۰۴$^{aC}$ | ۲/۷۷±۰/۰۷$^{aD}$ | ۲/۵۹±۰/۱$^{aC}$ | ۲/۴۱±۰/۱$^{bC}$ |
| کیتوزان+تیمول(۲/۵) | ۳/۱۷±۰/۰۵$^{aC}$ | ۲/۶۳±۰/۱$^{bD}$ | ۲/۱۳±۰/۱۵$^{cD}$ | ۱/۸۳±۰/۱۵$^{cD}$ |
| کیتوزان+تیمول(۵) | ۳/۰۳±۰/۰۵$^{aC}$ | ۲/۳±۰/۱$^{bE}$ | ۱/۲۷±۰/۲۵$^{cE}$ | ND |
| کیتوزان(تیمول ۲/۵+ اوژنول ۵) | ۳/۲۵±۰/۲$^{aC}$ | ۲/۱±۰/۱۷$^{bE}$ | ۲/۱±۰/۱۷$^{bD}$ | ۱/۶۷±۰/۱۷$^{cD}$ |
| کیتوزان(تیمول ۵ + اوژنول۵) | ۳/۱۶±۰/۱۵$^{aC}$ | ۱/۸۳±۰/۲$^{bE}$ | ۱/۱±۰/۱۷$^{cE}$ | ND |
| *لیستریا مونوسیتوژنز* | | | | |
| کنترل | ۶/۰۲±۰/۰۱$^{aA}$ | ۵/۸۰±۰/۰۱$^{aA}$ | ۵/۷۶±۰/۰۱$^{aA}$ | ۵/۶۸±۰/۰۲$^{aA}$ |
| پوشش کیتوزان٪۲ | ۵/۷۸±۰/۰۲$^{aA}$ | ۵/۶۶±۰/۰۲$^{aA}$ | ۵/۴۳±۰/۰۲$^{aB}$ | ۵/۳۳±۰/۰۳$^{aB}$ |
| کیتوزان+تیمول (۰/۶) | ۵/۷۳±۰/۰۲$^{aA}$ | ۵/۲۳±۰/۰۲$^{bB}$ | ۵/۱۰±۰/۰۲$^{bC}$ | ۵/۰۴±۰/۰۳$^{bC}$ |
| کیتوزان+تیمول( ۱/۲۵) | ۵/۶۳±۰/۰۶$^{aA}$ | ۴/۷۹±۰/۱۱$^{bC}$ | ۴/۶۳±۰/۰۵$^{bD}$ | ۴/۴۳±۰/۰۶$^{cD}$ |
| کیتوزان+تیمول( ۲/۵) | ۵/۵۳±۰/۰۶$^{aA}$ | ۴/۶۳±۰/۱۱$^{bC}$ | ۴/۴۷±۰/۰۶$^{bD}$ | ۴/۳۶±۰/۱$^{bD}$ |
| کیتوزان+تیمول( ۵) | ۵/۵±۰/۱$^{aA}$ | ۴/۴۳±۰/۰۶$^{bC}$ | ۴/۱۳±۰/۱۵$^{cE}$ | ۳/۶۷±۰/۱۷$^{dE}$ |
| کیتوزان(تیمول۲/۵ + اوژنول ۵) | ۳/۹۵±۰/۰۵$^{aB}$ | ۳/۳۵±۰/۲$^{bD}$ | ۳/۲±۰/۱۷$^{bF}$ | ۳/۱±۰/۱۷$^{bF}$ |
| کیتوزان(تیمول ۵ + اوژنول ۵) | ۳/۲۵±۰/۲۴$^{aC}$ | ND | ND | ND |

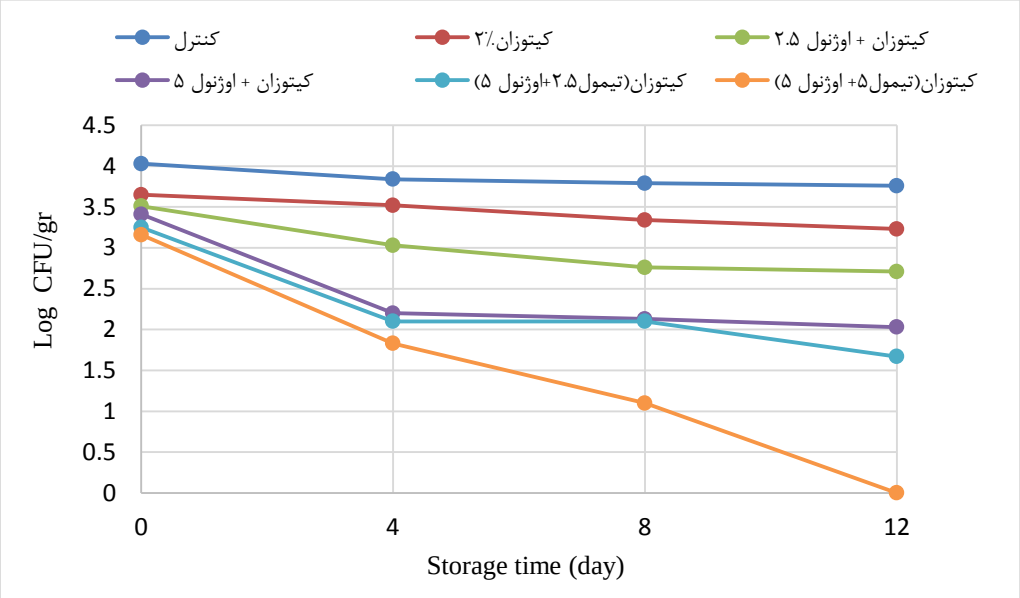
*در هر ردیف حروف کوچک و در هر ستون حروف بزرگ غیرهمسان، نشان‌دهنده ی اختلاف معنادار در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

**جدول ۴.** لگاریتم شمارش باکتری *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه‌های گوشت مرغ پوشش‌داده شده با کیتوزان حاوی اوژنول و حالت‌های ترکیبی با تیمول (Mean±SD)

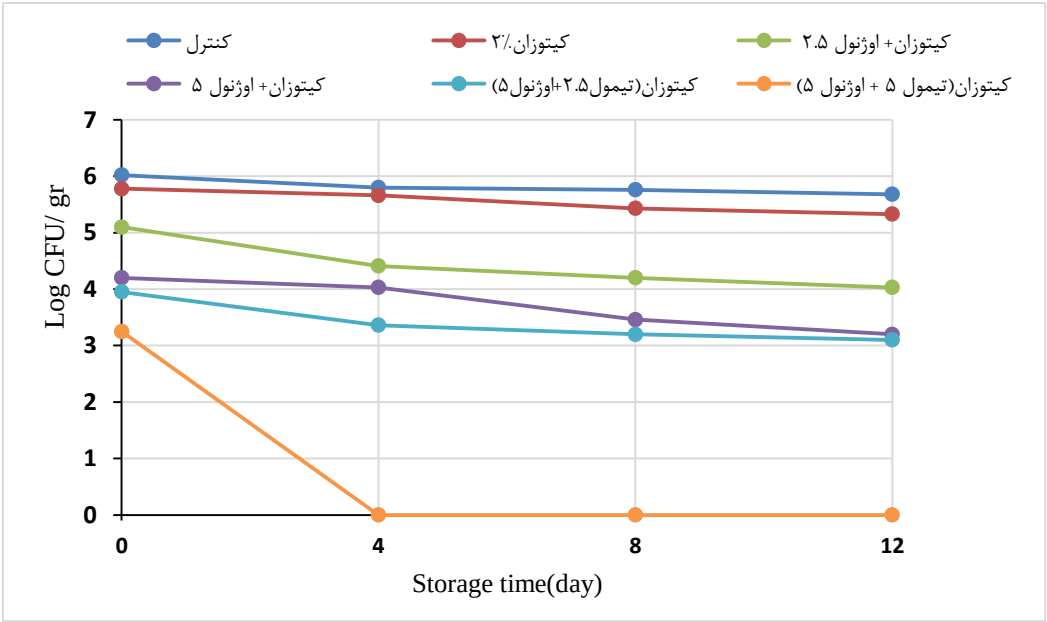
| تیمارmg/ml | روز ۰ | روز ۴ | روز ۸ | روز ۱۲ |
|---|---|---|---|---|
| *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ | | | | |
| کنترل | ۴/۰۳±۰/۰۱$^{aA}$ | ۳/۸۴±۰/۰۱$^{aA}$ | ۳/۷۹±۰/۰۲$^{aA}$ | ۳/۷۶±۰/۰۱$^{aA}$ |
| پوشش کیتوزان٪۲ | ۳/۶۵±۰/۰۱$^{aB}$ | ۳/۵۲±۰/۰۲$^{aA}$ | ۳/۳۴±۰/۰۳$^{aB}$ | ۳/۲۳±۰/۰۳$^{aB}$ |
| کیتوزان+ اوژنول(۲/۵) | ۳/۵۱±۰/۳۲$^{aB}$ | ۳/۰۳±۰/۰۵$^{bB}$ | ۲/۷۶±۰/۰۷$^{bC}$ | ۲/۷۱±۰/۰۴$^{bC}$ |
| کیتوزان+ اوژنول(۵) | ۳/۴۱±۰/۱$^{aB}$ | ۲/۲±۰/۱۷$^{bC}$ | ۲/۱۳±۰/۱۵$^{bD}$ | ۲/۰۳±۰/۰۵$^{bD}$ |
| کیتوزان(تیمول ۲/۵ + اوژنول ۵) | ۳/۲۵±۰/۲۳$^{aB}$ | ۲/۱±۰/۱۷$^{bC}$ | ۲/۱±۰/۱۷$^{bD}$ | ۱/۶۷±۰/۱۷$^{cD}$ |
| کیتوزان(تیمول ۵ + اوژنول ۵) | ۳/۱۶±۰/۱۵$^{aC}$ | ۱/۸۳±۰/۲$^{bC}$ | ۱/۱±۰/۱۷$^{cE}$ | ND |
| *لیستریا مونوسیتوژنز* | | | | |
| کنترل | ۶/۰۲±۰/۰۱$^{aA}$ | ۵/۸۰±۰/۰۱$^{aA}$ | ۵/۷۶±۰/۰۱$^{bA}$ | ۵/۶۸±۰/۰۲$^{bA}$ |
| پوشش کیتوزان٪۲ | ۵/۷۸±۰/۰۲$^{aA}$ | ۵/۶۶±۰/۰۲$^{aA}$ | ۵/۴۳±۰/۰۲$^{aA}$ | ۵/۳۳±۰/۰۳$^{aA}$ |
| کیتوزان+ اوژنول(۲/۵) | ۵/۱±۰/۱۷$^{aB}$ | ۴/۴۱±۰/۱$^{bB}$ | ۴/۲±۰/۱۷$^{bB}$ | ۴/۰۳±۰/۰۶$^{bB}$ |
| کیتوزان+اوژنول (۵) | ۴/۲±۰/۱۷$^{aC}$ | ۴/۰۳±۰/۰۶$^{aC}$ | ۳/۴۶±۰/۱۵$^{bC}$ | ۳/۲±۰/۱۷$^{bC}$ |
| کیتوزان(تیمول ۲/۵+ اوژنول ۵) | ۳/۹۵±۰/۰۵$^{aC}$ | ۳/۳۶±۰/۳$^{bD}$ | ۳/۲±۰/۱۷$^{bC}$ | ۳/۱±۰/۱۷$^{bC}$ |
| کیتوزان(تیمول ۵ + اوژنول ۵) | ۳/۲۵±۰/۲۴$^{aD}$ | ND | ND | ND |

*در هر ردیف حروف کوچک و در هر ستون حروف بزرگ غیرهمسان، نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح (P<۰/۰۵) می باشد.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]




**نمودار ۱.** نمودار لگاریتم مقدارمتوسط باکتری اشریشیا کلی $O_{157}:H_7$ برای نمونه‌های مختلف تیمار شده با اوژنول وحالت‌های ترکیبی بر حسب زمان




**نمودار۲.** نمودار لگاریتم مقدارمتوسط باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* برای نمونه‌های مختلف تیمار شده با اوژنول وحالت‌های ترکیبی بر حسب زمان

## • بحث

بر اساس نتایج بدست آمده باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیا کلی* و *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$) در برابر تیمول و اوژنول مقاوم‌تر از باکتری‌های گرم مثبت (*لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) هستند (جدول۱).نتایج نشان داد که تیمول و اوژنول دارای اثرات ضد میکروبی مطلوبی بر *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی* O157:H7، اشریشیا کلی و *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند. نتایج بدست آمده با نتایج Djenane و همکاران(۲۰۱۱) مبنی بر این که باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$) مقاوم تر از باکتری گرم مثبت (*لیستریا مونوسیتوژنز*)است، و نتایج گزارش شده بوسیله Piletti و همکاران( ۲۰۱۷ ) که غلظت MIC میکروکپسول اوژنول، برای باکتری *اشریشیا کلی* را ۲۵۰۰µg/ml و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۶۲۵µg/ml گزارش کرده‌اند، مطابقت

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

دارد (۳۲، ۳۱). Elizaquivel و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که براساس MIC بدست آمده از اسانس آویشن شیرازی علیه باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا مونوسیتوژنز*، باکتری گرم مثبت *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به اسانس حساس‌تر بودند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد (۳۳). درمطالعه ای دیگر Modjinou و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که اوژنول باعث مهار رشد دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* گردیده است که با مطالعه حاضر مبنی بر تأثیر ضد میکروبی، بر روی هر دو باکتری گرم منفی و مثبت، مطابقت دارد (۳۴).

در پژوهش حاضر، تأثیر ترکیب غلظت‌های مختلف تیمول و اوژنول روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت حالت سینرژیستی نشان داد، به عبارت دیگر حالت بازدارندگی ترکیبی بیشتر از حالت بازدارندگی هرکدام از عوامل ترکیب به تنهایی است. هم‌چنین مشخص شد، قدرت هم افزایی این دو ترکیب در برابر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت (شاخصFIC کمتر) بیشتر بود (جدول ۲). نتایج هم‌افزایی مطالعه حاضر با نتایج Sharma و همکاران (۲۰۱۷)، مبنی بر اثر سینرژیستی حالت ترکیبی سینامالدئید با تیمول بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*، مطابقت دارد (۳۵).

مقایسه نتایج روزهای مختلف تیمارهای پوشش کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف تیمول (جدول ۳-۱)، بر روی باکتری‌های *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا مونوسیتوژنز*، طی دوره نگهداری، نشان دهنده کاهش تعداد باکتری‌ها در انتهای دوره نسبت به ابتدا دوره است و در مقایسه با گروه کنترل، سرعت رشد روند کاهشی، و در باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ در تمامی تیمارها، و در باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به جز روز صفر، اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$). هم چنین مقایسه‌ی تیمارهای پوشش دار مختلف تیمول، نشان داد که با افزایش غلظت تیمول، رشد باکتری، روند کاهشی بیشتری دارد. به طوری‌که در پایان دوره نگهداری بهترین نتیجه در کاهش جمعیت باکتری‌های *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا مونوسیتوژنز*، در تیمار پوشش کیتوزان حاوی تیمول ۵ میلی‌گرم/میلی لیتر مشاهده شد. در باکتری *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ در روز ۱۲ نگهداری، رشد میکروبی مشاهده نشد و در باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* باعث کاهش Log ۲/۳۳ در جمعیت باکتریایی شد، که دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر و سایرتیمارها بودند ($P<۰/۰۵$). میزان تلقیح اولیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریامونوسیتوژنز* به گوشت مرغ به ترتیب ۴ و ۶ Log CFU/g بود.

مقایسه نتایج بدست آمده در تیمارهای پوشش کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اوژنول (جدول ۴ و نمودارهای ۱ و ۲) نشان‌دهنده کاهش تعداد باکتری‌های تلقیح شده *اشریشیاکلی* O157:H7 و *لیستریا مونوسیتوژنز* در انتهای دوره نگهداری نسبت به ابتدای دوره است و در مقایسه با گروه کنترل، سرعت رشد روند کاهشی و اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$). مقایسه تیمارهای اوژنول در شمارش باکتری تلقیح شده *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ نشان از اختلاف معنی‌دار روز صفر با سایر روزها دارد ($P<۰/۰۵$). هم چنین مقایسه‌ی تیمارهای پوشش‌دار مختلف اوژنول، نشان داد که با افزایش غلظت اوژنول نیز مانند تیمول، رشد باکتری‌ها روند کاهشی دارد. به طوری‌که در پایان دوره نگهداری بهترین نتیجه در کاهش جمعیت باکتری‌های *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا مونوسیتوژنز*، در تیمار پوشش کیتوزان حاوی اوژنول ۵ میلی-گرم/میلی‌لیتر مشاهده شد، که به ترتیب باعث کاهش ۱/۹۷ و ۲/۸ Log CFU/g در جمعیت باکتری‌ها شد.

در این مطالعه هم تیمول و هم اوژنول روی باکتری‌های تلقیح شده در مدل غذایی (فیله گوشت مرغ) اثر ضد میکروبی داشتند. پوشش کیتوزان حاوی اوژنول روی باکتری گرم مثبت تأثیر بیشتری نسبت به باکتری گرم منفی داشت. ولی پوشش کیتوزان حاوی تیمول، برخلاف شرایط آزمایشگاهی که، بر روی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*(گرم مثبت) مؤثرتر بود، در مدل غذایی نیز روی باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ (گرم منفی) تأثیر بیشتری نسبت به *لیستریا مونوسیتوژنز* (گرم مثبت) از خود نشان داد. و این می تواند به دلیل وجود فاکتورهای داخلی ماده غذایی ( چربی، پروتئین، فعالیت آبی ماده غذایی، آنتی‌اکسیدان‌ها، pH ، نمک و سایر افزودنی‌ها)، فاکتورهای خارجی (دما، خصوصیات میکروارگانیسم ها و نوع بسته بندی) باشد، که می تواند بر روی حساسیت میکروبی نسبت به ماده مؤثره و اسانس تأثیرگذار باشد (۱۶). Burt در سال (۲۰۰۴) گزارش کرد که غلظت بالاتری از اسانس برای رسیدن به اثری مشابه در مواد غذایی نسبت به شرایط آزمایشگاهی مورد نیاز است. در مطالعه حاضر نیز جهت بررسی اثر ماده مؤثره تیمول بر روی فیله گوشت مرغ از غلظت‌های بالاتر MIC وMBC بدست آمده در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد (۱۶). به طورکلی هر چه مقادیر ترکیبات فنلی در اسانس یا ماده مؤثره بیشتر باشد، خواص ضد باکتریایی آن علیه پاتوژن‌های غذایی بیشتر خواهد بود

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

(۱۷، ۱۶). در مطالعه Chamanara و همکاران (۲۰۱۳)، فیله ماهی قزل آلای پوشش داده شده با کیتوزان و عصاره آویشن شیرازی که ماده مؤثره اصلی ترکیب اسانس مورد مطالعه آنها تیمول بوده است، خصوصیات کیفی و بافتی بهتری نسبت به نمونه شاهد داشت و زمان ماندگاری آن افزایش پیدا کرد که با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۳۶). در مطالعه حسینی و همکاران (۲۰۰۹) نیز، خواص ضد میکروبی، فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های خوراکی کیتوزان حاوی اسانس‌های آویشن و میخک را که ماده مؤثره اصلی ترکیب اسانس ها به ترتیب تیمول و اوژنول بوده را مورد مطالعه قرار داده و گزارش کرده‌اند که فیلم‌های خوراکی کیتوزان حاوی اسانس آویشن در سه غلظت ۰/۵، ۱، ۱/۵ درصد بر روی پنج باکتری گرم منفی و مثبت به طورمعنی‌داری بالاتر از فیلم‌های حاوی اسانس میخک بودند و فیلم‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت به طور معنی‌داری، مؤثرتر از باکتری‌های گرم منفی بودند (۳۷). در مطالعه Requena و همکاران (۲۰۱۹)، اثر ضد باکتریایی فیلم‌های PHBV [Poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate) ] حاوی ترکیبات اوژنول و کارواکرول در ماتریکس غذایی (پنیر، سینه مرغ، کدو و خربزه) علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *لیستریا اینوکوآ* را مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین فعالیت ضد میکروبی اوژنول و کارواکرول علیه *اشریشیا کلی* در پنیر و کدو بوده است و اثر ضد باکتریایی آن ها علیه *لیستریا اینوکوآ* در این غذا ها کمتر بوده است که علت آن را در دسترس بودن عوامل مؤثر و ترکیبات فعال برای تأثیر فعالیت ضد باکتریایی را در یک غذای خاص تعریف کرده اند(۳۸).

در مطالعه حاضر اثرات ترکیبی ماده مؤثره‌های تیمول و اوژنول نیز بررسی شد. با توجه نتایج آزمایشگاهی و MIC بدست آمده، بهترین غلظت‌های مؤثر بر پاتوژن‌های *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا منوسیتوژنز* انتخاب و اثرات ترکیبی آنها بررسی شد، به‌طوری‌که در تیمول، دو غلظت( ۲/۵ و ۵) میلی‌گرم/میلی‌لیتر و در اوژنول، غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر انتخاب شدند. طبق جداول ۳ و۴، مقایسه نتایج تیمارهای ترکیبی پوشش کیتوزان حاوی (تیمول ۲/۵ + اوژنول ۵)، و پوشش کیتوزان حاوی (تیمول ۵ + اوژنول ۵) میلی‌گرم/میلی-لیتر بر روی باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا مونو سیتوژنز*، نشان داد که به طور کلی میانگین تعداد باکتری‌ها در تیمارهای مختلف در طول دوره با گذشت زمان نسبت به گروه کنترل روند کاهشی و اختلاف معنی داری نشان داد ($P<۰/۰۵$) و با افزایش غلظت‌های ترکیبی روند کاهشی بیشتر شد. به‌طوری‌که بهترین نتیجه در پایان دوره، مربوط به تیمار (تیمول ۵ + اوژنول ۵) میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود که در باکتری *اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$ در روز ۱۲ هیچ گونه رشد میکروبی مشاهده نشد و می‌توان گفت بعد از ۸ روز بهترین حالت بازدارندگی، و در باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* که از روز چهارم به بعد هیچ‌گونه رشد میکروبی مشاهده نشد و بعد از ۴ روز بهترین حالت بازدارندگی برای رشد باکتری داشت. طبق بررسی انجام‌شده تا کنون مطالعه مشابهی در خصوص بررسی اثر ضدمیکروبی استفاده همزمان غلظت‌های مختلف تیمول و اوژنول بر پاتوژن‌های مختلف در مدل ماده غذایی انجام نشده است. در مطالعه Sharma و همکاران (۲۰۱۷)، اثر مهاری سینامالدئید به تنهایی و در حالت ترکیب با اوژنول، تیمول و تیموکینون بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج ایشان نشان داد که ترکیبات ضد میکروبی در حالت ترکیبی خود می‌توانند دوز مورد نیاز عامل ضد میکروبی را علیه رشد و سمیت میکروارگانیسم‌ها کاهش دهند، که با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۶).

با توجه به اثرات ارگانولپتیک اسانس‌ها در بسته‌بندی مواد غذایی و همچنین نتایج بدست آمده در این مطالعه، استفاده از مواد مؤثره اصلی تشکیل دهنده اسانس‌ها در پوشش مورد استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی می‌تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در کنترل باکتری-های پاتوژن در گوشت مرغ و سایر مواد غذایی در صنایع غذایی باشد.

سپاسگزاری: نویسندگان مقاله مراتب قدردانی و سپاس خود از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان جهت حمایت مالی از از پروژه به شماره A-11-940-17 را اعلام میدارند.

## • References

1. Dharod JM, Pérez-Escamilla R, Paciello S, Venkitanarayanan K, Bermúdez-Millán A, Damio, G. Critical control points for home prepared'chicken and salad'in Puerto Rican households. Food Protect Trends. 2007; 27(7): 544-52.

2 . Carrillo W, Ramos M. Identification of Antimicrobial Peptides of Native and Heated Hydrolysates from Hen Egg White Lysozyme. J Medicin Food. 2018; 21(9): 915-26.

3. Raeisi E, Ghiamirad M. Survey on Prevalence of *Salmonella* Serogroups and Antibiotics Susceptibility

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

Pattern in Chicken Meat in Ardabil, Iran. J Ardabil Uni Med Sci. 2015; 15(3): 320-9.

4 . Mehdizadeh T, Narimani R, Mojaddar Langroodi A, Moghaddas Kia E, Neyriz-Naghadehi M. Antimicrobial effects of *Zataria multiflora* essential oil and *Lactobacillus acidophilus* on *Escherichia coli* O157 stability in the Iranian probiotic white-brined cheese. J Food Saf. 2018; 38(4):e12476.

5 . Baghaei H, Aghae F. The effect of adding garlic essential oil on feature Physical, mechanical, - biological and sensory properties of edible film prepared from soybean protein isolate. Iranian Food Sci Technol. 2012; 8(3): 279-87

6 . Dehghani S, Hosseini SV, Regenstein JM. Edible films and coatings in seafood preservation: A review. Food chem. 2018; 240: 505-13

7 . Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources structure properties and applications. Mar Drug 2015; 13:1133- 74.

8 . Lee W, Shin TS, KO S, Oh HI. Control of dongchimi fermentation with chitosan deacetylated by alkali treatment to prevent over ripening. J Food Sci 2010; 75: 308- 16.

9 . Mizi L, Cofrades S, Bou R, Pintado T, López-Caballero M, Zaidi F, et al. Antimicrobial and antioxidant effects of combined high pressure processing and sage in beef burgers during prolonged chilled storage. Innovative Food Sci Emerg Technol. 2019; 51: 32-40.

10. Acevedo-Fani A, Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü MA, Martín-Belloso O. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. Food Hydrocol. 2015; 47:168-77.

11. Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. J Mycologie Medicale. 2014; 24(2): e51-6.

12. Karam L, Roustom R, Abiad MG, El-Obeid T, Savvaidis IN. Combined effects of thymol, carvacrol and packaging on the shelf-life of marinated chicken. Int J Food Microbiol. 2019; 291: 42-7.

13. Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, Gortzi O, Izadi M, Nabavi SM. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. Food Chem. 2016; 210: 402-14.

14. Miladi H, Zmantar T, Chaabouni Y, Fedhila K, Bakhrouf A, Mahdouani K, Chaieb K. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. Mic Pathogen. 2016; 99: 95-100.

15. Yang, Lite, Faqiong Zhao, and Baizhao Zeng. Electrochemical determination of eugenol using a three-dimensional molecularly imprinted poly (p-aminothiophenol-co-paminobenzoic acids) film modified electrode. Electrochimica Acta. 2016; 210: 293-300.

16. Burt SA. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. International Journal of Food Microbiol. 2004; 94: 223-53.

17. Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control.2010; 21(9): 1199-1218.

18. Evans J, Martin, S. Effects of Thymol on Ruminal Microorganisms. Current Microbiology. 2000; 41: 336-340.

19. Fernández-Pan I, Carrión-Granda X, Maté JI. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. Food Control. 2014; 36(1):69-75.

20. Bazargani-Gilani B, Aliakbarlu J, Tajik H. Effect of pomegranate juice dipping and chitosan coating enriched with *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage. Innovative food science & emerging technologies. 2015; 29: 280-7.

21. Goulas AE , Kontominas MG. Combined effect of light salting,modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream(sparus aurata):Biochemical and sensory attributes. Food Chem.2007; 100(1): 287-296.

22. Mastromatteo M,Danza A,Conte A,Muratore G,Alessandro Del Nobil M. Shelf life of ready to use peeled shrimps as affected by thymol essential oil and modified atmosphere packaging.Int J Food Microbiol. 2010; 144(2): 250-6.

23. Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. Food Control. 2014; 35(1): 177-183.

24. Hassanzadazar H, Yousefizadeh S, Ghafari A, Fathollahi M, Aminzare M. Antimicrobial Effects of the Nanoemulsion of Rosemary Essential Oil against Important Foodborne Pathogens. J Human, Environ Health Prom. 2019; 5(2): 79-85.

25. Buldain D, Gortari Castillo L, Buchamer AV, Aliverti F, Bandoni A, Marchetti L, et al. *Melaleuca armillaris* Essential Oil in Combination with Rifaximin Against *Staphylococcus aureus* Isolated of Dairy Cows. Front. Vet Sci. 2020; 7: 1-10.

26. Sharma G, Raturi K, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in Combination with Thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis*. Herbal Med. 2017; 9: 68-73.

27. Sharifi F, Khanzadi S, Hashemi M, Azizzadeh M. Control of *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$ Inoculated on Fish Fillets Using Alginate Coating Containing Lactoperoxidase System and *Zataria multiflora* Boiss Essential Oil, J Aquatic Food Product Technol. 2017; 26 (9): 1014-1021.

28. Foromandi M, Khani M. The effect of chitosan edible coating containing garlic extract and coriander essential oil on microbial and sensory properties of rainbow trout fillet in refrigerated storage. J Food Microbiol. 2019; 6(1): 1-14

29. Ojagh S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H. Effect of chitosan coatings enriched with

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. J Food Chem.2010; 120 (1):193-8.

30. Azizian A, Khanzadi S, Hashemi M, Azizzadeh M. Inhibitory Effect of Nano-gel/Emulsion of Chitosan Coating Incorporated with *Ziziphora Clinopodioides* Essential Oil and Nisin on *Escherichia Coli* $O_{157}$:$H_7$ Inoculated in Beef at Cold Storage Condition. J Nut Fasting Health. 2019; 7(2): 103-9.

31. Djenane D, Yangüela J, Amrouche T, Boubrit S, Boussad N, Roncalés P.Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* $O_{157}$: $H_7$ and *Staphylococcus aureus* in minced beef. Food Sci Technol Int. 2011; 17(6): 505-15.

32. Piletti R, Bugiereck A, Pereira A, Gussati E, Dal Magro J, Mello J, et al. Microencapsulation of eugenol molecules by β-cyclodextrine as a thermal protection method of antibacterial action. Mat Sci Eng: C. 2017; 75: 259-71.

33 . Elizaquível P, Azizkhani M, Sánchez G, Aznar R. Evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil activity against *Escherichia coli* $O_{157}$: $H_7$, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* by propidium monoazide quantitative PCR in vegetables. Food Control. 2013; 34(2): 770-6.

34 . Modjinou T, Versace DL, Abbad-Andallousi S, Bousserrhine N, Dubot P, Langlois V, et al. Antibacterial and antioxidant bio-based networks derived from eugenol using photo-activated thiol-ene reaction. React Funct Polym. 2016; 101: 47-53.

35 . Sharma G, Raturi K, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in Combination with Thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis*. Herbal Med. 2017; 9: 68-73.

36. Chamanara, V., Shabanpour, B., Khomeiri, M. and Gorgin, S. Shelf-life extension of fish samples by using enriched chitosan coating with Thyme Essential Oil, J Aquatic Food Technol. 2013; 22: 3-10.

37. Hosseini SMH, Razavi, S. H., Mousavi, S. M. A. Microbial, Physical and Mechanical Properties of Chitosan-Based Edible Films Incorporated with Thyme and Clove Essential Oils. J Food Process Preserv. 2009; 33:727-43.

38. Requena R, Vargas M, Chiralt A. Eugenol and carvacrol migration from PHBV films and antibacterial action in different food matrices. Food Chem. 2019; 277: 38-45.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

# Effects of Chitosan Coating Containing Thymol and Eugenol against *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$ Inoculated to Chicken Fillets

*Mirian A[1], Aminzare M[2], Yousefizadeh SS[3], Hassanzadazar H[*4]*

*1-Msc Student, Dept. of Food Safety and Hygiene, School of Public Health, Zanjan Univerisity of Medical Sciences, Zanjan, Iran*

*2- Associate Prof, Dept. of Food Safety and Hygiene, School of Public Health, Zanjan Univerisity of Medical Sciences, Zanjan, Iran*

*3- Msc, Dept. of Food Safety and Hygiene, School of Public Health, Zanjan Univerisity of Medical Sciences, Zanjan, Iran*

*4-* Corresponding author: Associate Prof, Dept. of Food Safety and Hygiene, School of Public Health, Zanjan Univerisity of Medical Sciences, Zanjan, Iran. Email: hassanzadazar_h@zums.ac.ir*

**Received 5 Mar, 2021** **Accepted 2 Jul, 2021**

**Background and Objectives:** The aim of this study was to assess inhibitory effects of thymol and eugenol against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$ as well as assessing ability of chitosan coating containing thymol and eugenol to control *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$ inoculated into chicken fillets over a 12-day storage under cold conditions (4 ºC ±1).

**Materials & Methods:** Antimicrobial activity of the thymol and eugenol against the bacteria was assessed using microdilution and disk diffusion methods. Chitosan coatings with thymol and eugenol were used to inhibit growth of *L. monocytogenes* and *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ cocktails inoculated into chicken fillets during storage for 12 days in refrigerator.

**Results:** The MIC of thymol against *L. monocytogenes* and *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ included 0.3 and 0.6 mg/ml, respectively, and MBC of this compound included 0.6 and 1.25 mg/ml, respectively. The MIC of eugenol against *L. monocytogenes* and *E. coli* $O_{157}$:$H_7$ respectively included 0.6 and1.25 mg/ml and MBC included 1.25 and 2.5 mg/ml, respectively. Assessment of the combined treatments of thymol and eugenol revealed synergistic activities of these compounds against the highlighted bacteria. The average number of bacteria in treated food samples with enriched chitosan coatings of thymol and eugenol and combinations of the two compounds significantly varied ($p < 0.05$) during 12 days of storage.

**Conclusion:** Due to the good antimicrobial effects of thymol and eugenol, chitosan coatings enriched with thymol and eugenol and combinations of the two compounds can be used to prevent growth of pathogens on food surfaces, especially chicken meat surfaces, in food industries.

**Keywords:** Thymol, Eugenol, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* $O_{157}$:$H_7$, Chitosan coating

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]