Archive of SID

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 74, Number 4, 2019
Original Article

The Effect of *Ziziphora clinopodioides* Essential Oil Stress on the Bile Salt and Acid Tolerance of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG

Mahboube Bagheri[1], Hassan Gandomi Nasrabadi[1], Afshin Akhondzade Basti[1], Ali Misaghi[1], Ladan Mansouri-Najand[2]

[1]*Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran*

10.22059/jvr.2019.236679.2655
J Vet Res, 74(4), 474-483

Abstract

BACKGROUND: The probiotic must survive in sufficient numbers after gastric and duodenal transit to be able to colonize the large intestine. The viability of a probiotic in the human upper GI tract is mainly influenced by low acidity of the stomach and bile salt in the small intestine. Currently, consumers are more interested in natural antibacterial compounds as food preservatives, like herbal essential oils and extracts. To provide a balance between sensory acceptability and antimicrobial efficacy, the use of sublethal concentrations of EOs in combination with other preservation methods has been proposed. However, it should be considered that bacterial cell exposure to sublethal stresses may result in decreased sensitivity to the same stress and even to other stresses.

OBJECTIVES: The aim of this study was to evaluate the stress response of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG, pre-exposed to sublethal level of *Ziziphora clinopodioides* EO.

METHODS: The sublethal and lethal levels of *Ziziphora clinopodioides* EO, bile salt and pH stresses were determined for *Lactobacillus rhamnosus* GG. Then stress response of *Lactobacillus rhamnosus* GG pre-exposed to the sublethal level of *Ziziphora clinopodioides* EO were compared to cultures which were challenged directly with the lethal level of each stress (control). The growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG was also assessed under bile salt and acid pH stress condition.

RESULTS: The sublethal and lethal levels of *Ziziphora clinopodioides* EO and the lethal level for bile salt and pH were 1000 ppm, 1500 ppm, 0.2% and 2.5 respectively. In the test tubes, the number of cells that survived increased significantly and the growth curve of *Lactobacillus rhamnosus* GG has been affected in pre-exposed cultures.

CONCLUSIONS: Exposure to sublethal concentration of *Ziziphora clinopodioides* EO can induce cross-protection against bile salt and pH stresses.

Keywords: Stress response, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Ziziphora clinopodioides*, Bile salt, Acid pH

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: gandomih@ut.ac.ir **Tel/Fax:** 021-61117041, 66933222

How to cite this article:

Bagheri, M., Gandomi Nasrabadi, H., Akhondzade Basti, A., Misaghi, A., Mansouri-Najand, L. (2019). The Effect of *Ziziphora clinopodioides* Essential Oil Stress on the Bile Salt and Acid Tolerance of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. J Vet Res, 74(4), 474-483. https://10.22059/jvr.2019.236679.2655

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Analysis of chemical constituents of *Ziziphora clinopodioides* essential oil by GC-MS.
Figure 1. Effect of pre-exposure to *Ziziphora clinopodioides* essential oil on *lactobacillus rhamnosus* GG survival in the presence of various bile salt concentrations.
Figure 2. Effect of pre-exposure to *Ziziphora clinopodioides* essential oil on *lactobacillus rhamnosus* GG survival at various acid pHs.
Figure 3. Effect of pre-exposure to *Ziziphora clinopodioides* essential oil on the growth curve of *lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of 0.05% bile salt.
Figure 4. Effect of pre-exposure to *Ziziphora clinopodioides* essential oil on the growth curve of *lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of 0.1% bile salt.
Figure 5. Effect of pre-exposure to *Ziziphora clinopodioides* essential oil on the growth curve of *lactobacillus rhamnosus* GG at pH 4.

www.SID.ir

Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۴، شماره ۴، ۱۳۹۸
مقاله پژوهشی

اثر استرس اسانس کاکوتی بر مقاومت به نمک صفراوی و pH اسیدی در سویه‌ی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی

محبوبه باقری[۱]، حسن گندمی نصرآبادی[۱]، افشین آخوندزاده بستی[۱]، علی میثاقی[۱]، لادن منصوری نژند[۲]

[۱] گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

doi 10.22059/jvr.2019.236679.2655

تاریخ دریافت: ۲۸ فروردین ماه ۱۳۹۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۵ تیر ماه ۱۳۹۸ **تاریخ انتشار آنلاین:** ۰۱ آذرماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینهٔ مطالعه: توانایی میکروارگانیسم در زنده ماندن در طول قسمت فوقانی لوله گوارش و کولونیزه شدن در روده بزرگ، نکته‌ی کلیدی در عملکرد آن به عنوان باکتری پروبیوتیک می‌باشد. استرس اسید و نمک صفراوی از مهمترین چالش‌هایی هستند که میکروارگانیسم در این مسیر با آن‌ها مواجه می‌شود و مقاومت به آن‌ها از ویژگی‌های مطلوب سویه‌های پروبیوتیکی می‌باشد. از سوی دیگر، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مانند اسانس و عصاره‌های گیاهی به صورت ترکیبی با سایر فاکتورهای حفاظت کننده بسیار مورد توجه قرار گرفته است؛ در حالی که پاسخ میکروارگانیسم به سطوح تحت کشنده‌ی استرس اسانس ممکن است باعث تغییر حساسیت به سایر استرس‌ها شود.

هدف: هدف این مطالعه بررسی رشد و مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی در سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی در پاسخ به استرس اسانس کاکوتی می‌باشد.

روش‌کار: لوله‌های حاوی MRS broth با غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی، نمک صفراوی و pH های مختلف با دوز مشخصی از سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی تلقیح و گرمخانه‌گذاری شدند. نمونه‌ها در زمان های t_0 و t_1 جمع‌آوری شده و تعداد واحدهای تشکیل دهنده‌ی کلنی در هر میلی‌لیتر تعیین شد. غلظتی که در آن حداقل ۲ لوگ کاهش زنده‌مانی مشاهده شد به عنوان دوز کشنده و غلظت‌های قبل از آن به عنوان تحت‌کشنده شناسایی شدند. پس از آن تاثیر مواجهه با دوز تحت‌کشنده اسانس کاکوتی بر مقاومت به دوز کشنده‌ی استرس‌ها و منحنی رشد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: دوز کشنده اسانس کاکوتی ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام و دوز تحت کشنده آن ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام تعیین شد. دوز کشنده نمک صفراوی ۰/۲ درصد و pH کشنده نیز ۲/۵ گزارش شدند. مواجهه قبلی با دوز تحت‌کشنده اسانس کاکوتی (۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) موجب افزایش معنادار زنده‌مانی در مواجهه با سطح کشنده استرس‌ها شد و بر منحنی رشد میکروارگانیسم در حضور نمک‌های صفراوی و pH اسیدی تاثیرگذار بود.

نتیجه‌گیری نهایی: مواجهه با سطح تحت‌کشنده اسانس کاکوتی موجب تقویت حفاظت متقاطع در برابر شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی شد.

کلمات کلیدی: پاسخ به استرس، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، کاکوتی کوهی، نمک صفراوی، شرایط اسیدی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: حسن گندمی نصرآبادی، *گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران*
پست الکترونیکی: gandomih@ut.ac.ir

مقدمه

بالا رفتن آگاهی عمومی در زمینه‌ی نقش رژیم غذایی در تأمین سلامتی موجب افزایش تقاضا برای غذاهای دارای اثرات مشخص ارتقاء دهنده‌ی سطح سلامتی گردیده است (۱). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به مقدار مناسب مصرف شوند قادرند اثری سودمند بر سلامت میزبان بگذارند. امروزه پروبیوتیک‌ها به طور گسترده در مکمل‌ها و محصولات غذایی به ویژه لبنیات استفاده می‌شوند (۳۲). مصرف پروبیوتیک‌ها از طریق محصولات غذایی پرطرفدارترین روش مصرف آن‌هاست. بر اساس مطالعات صورت گرفته در سال ۲۰۱۵، بازار جهانی پروبیوتیک‌ها در سال ۲۰۱۴ بالغ بر ۶۲ میلیارد دلار ارزش‌گذاری شده و تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۲۰ به ۹۶ میلیارد دلار برسد. این موضوع موجب جلب نظر تولیدکنندگان به

www.SID.ir

Archive of SID

تولید محصولات حاوی پروبیوتیک‌ها و همچنین محققان به مطالعه‌ی خصوصیات پروبیوتیک‌ها و اثر آن‌ها بر سلامت انسان شده است (۱۰).

محصول پروبیوتیکی موقعی می‌تواند موثر واقع شود که در زمان مصرف حاوی دوز 10^6 تا 10^7 واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی از سویه پروبیوتیک در هر میلی‌لیتر یا گرم باشد. توانایی میکروارگانیسم در زنده ماندن در طول قسمت فوقانی لوله‌ی گوارش و کولونیزه شدن در روده‌ی بزرگ نکته کلیدی در عملکرد آن به عنوان باکتری پروبیوتیک می‌باشد. میکروارگانیسم بلعیده شده به طور متوسط ۲ تا ۴ ساعت (برای مایعات این زمان کوتاهتر می‌باشد) در معده می‌ماند و بعد از تخلیه به داخل روده‌ی کوچک، مدت ۱تا ۴ ساعت طول می‌کشد که از روده کوچک عبور کند (۲۶). استرس اسید و نمک صفراوی از مهمترین چالش‌هایی هستند که میکروارگانیسم در این مسیر با آن‌ها مواجه می‌شود و مقاومت به آن‌ها از ویژگی‌های مطلوب سویه‌های پروبیوتیکی می‌باشد (۱۹،۲۰). این استرس‌ها قادرند فعالیت فیزیولوژیک سلول‌ها را کاهش دهند و آن‌ها را بکشند. وقتی که سلولی از این استرس‌ها جان سالم به در می‌برد، می‌تواند در روده‌ی بزرگ کلونیزه شده، رشد کند و به تعداد مناسب برای اعمال اثرات سودمند خود برسد (۱۸).

بخش عمده باکتری‌های پروبیوتیک را باکتری‌های گروه لاکتیک اسید به ویژه جنس‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم تشکیل می‌دهند. *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی از پروبیوتیک‌های پرکاربرد و تجاریست که مطالعات زیادی روی آن انجام شده و تاثیر آن در درمان و پیشگیری اسهال، آلرژی، عفونت‌های کودکان و ... نشان داده شده است (۱۲).

نگهدارنده‌ها در مواد غذایی به منظور بهبود پایداری و ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. امروزه مصرف‌کنندگان نسبت به اثرات منفی احتمالی افزودنی‌های شیمیایی در مواد غذایی آگاهی بیشتری کسب کرده‌اند، به طوریکه تقاضا برای مواد غذایی تازه و فاقد مواد شیمیایی روز به روز افزایش می‌یابد. این رویکرد مصرف‌کنندگان به همراه نیاز به فراورده‌های غذایی ایمن با ماندگاری طولانی، موجب علاقه به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی از جمله فراورده‌های گیاهی مثل اسانس و عصاره‌های گیاهی شده است (۳). با این وجود، معمولاً غلظت مورد نیاز اسانس برای مهار رشد و کشتن باکتری‌ها در مواد غذایی بالاتر از غلظتی است که از نظر ارگانولپتیک قابل قبول می‌باشد(۸). ایمنی و پایداری میکروبی و همچنین کیفیت تغذیه‌ای و حسی اکثر مواد غذایی مبتنی بر استفاده ترکیبی از فاکتورهای حفاظت‌کننده است که به عنوان تکنولوژی هردل(hurdle technology) شناخته می‌شود. به عنوان مثال استفاده از غلظت‌های تحت کشنده اسانس در ترکیب با سایر روش‌های ضدمیکروبی موجب ایجاد تعادل بین اثر ضدمیکروبی مورد نظر و مقبولیت حسی می‌شود (۱۶،۲۱).

به هر حال هنوز اطلاعات در مورد تاثیر احتمالی استفاده از سطوح تحت‌کشنده اسانس بر خصوصیات و حساسیت میکروب‌ها به استرس‌های دیگر کمیاب است. در حالیکه اسانس ها به عنوان مواد ضدمیکروبی غذایی از طریق تداخل با هموستازی، رشد و زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها موثر واقع می‌شوند، این موضوع را نیز باید مد نظر داشت که پاسخ میکروارگانیسم به سطوح تحت‌کشنده استرس (اسانس) ممکن است باعث کاهش حساسیت به همان استرس یا سایر استرس‌های به ظاهر نامرتبط شود. میکروارگانیسمی که با استرس تحت‌کشنده‌ای دست و پنجه نرم کرده است ممکن است تغییرات فیزیولوژیکی را بروز دهد که موجب تغییر در خصوصیات مقاومتی و عملکردی آن شود (۸).

کاکوتی کوهی متعلق به جنس زیزیفورا و تیره نعناعیان است . از جنس‌های مهم این تیره؛ نعناع، آویشن کوهی، اسطوخودوس، مرزنجوش و کاکوتی را می‌توان نام برد. کاکوتی گیاهی علفی و یک ساله است که دارای ساقه‌ی کوتاه به ارتفاع ۵ تا ۱۵ سانتی‌متر و برگ‌های نوک تیز و باریک می‌باشد. چهار گونه آن به نام‌های *Ziziphora clinopodioides* (کاکوتی کوهی)، *Ziziphora persica* ، *Ziziphora tenuir* و *Ziziphora capitata* در ایران وجود دارد و در اغلب نواحی ایران پراکندگی دارد (۲۶). درمناطق مختلف از پودر خشک شده کاکوتی کوهی به عنوان چاشنی بر روی ماست و لبنیات استفاده می‌شود. مطالعات زیادی خواص ضدمیکروبی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی آن را گزارش کرده‌اند (۱۵،۲۲،۳۱،۳۷) و خصوصیات ارگانولپتیک این گیاه به عنوان یک افزودنی به لبنیات مورد قبول جامعه ایرانی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تغییر در مقاومت سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی مورد مواجهه قبلی با سطوح تحت‌کشنده اسانس کاکوتی به شرایط اسیدی و نمک صفراوی می‌باشد.

مواد و روش‌کار

سویه مورد مطالعه و آماده سازی کشت میکروبی: در این تحقیق سویه پروبیوتیک تجاری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی (ATCC ۵۳۱۰۳) توسط گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی خریداری شده و به همراه ۳۰ درصد گلیسرول در ۱۸- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی در ۵۰ میلی لیتر MRS broth تلقیح شده و در دمای ۳۵

www.SID.ir

Archive of SID

درجه سانتی‌گراد در شیکرانکوباتور (۱۵۰ دور در دقیقه) به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس لوله‌ها ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه) شده و بعد از یک مرحله شستشو با PBS، از رسوب کف لوله برای تهیه سوسپانسیون در براث استریل با OD نهایی ۱ استفاده شد. این سوسپانسیون برای تلقیح مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه اسانس و شناسایی ترکیبات آن: گیاه کاکوتی در فصل بهار از کوه‌های جلفا در آذربایجان شرقی جمع‌آوری شده و در سایه خشک گردید. اسانس آن به روش تقطیر با بخار آب (Hydro distillation)، با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج شد. سپس رطوبت آن با استفاده از سولفات سدیم گرفته و اسانس خالص ذخیره‌سازی شد. ترکیبات موجود در اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی (GC-MS) از نوع Thermo Qest Finningan (انگلستان) با ستون موئینه DB5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر مورد شناسایی قرار گرفت. برنامه دمایی شامل دمای ابتدایی ۵۰ درجه و دمای پایانی ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه در دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت گاز هلیوم ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود. طیف نگار جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

تعیین دوز کشنده و تحت کشنده اسانس کاکوتی، نمک صفراوی و pH: لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر MRS broth با غلظت‌های ۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس کاکوتی آماده شد و با سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی با دوز نهایی 10^5 تلقیح شدند. لوله‌ها به مدت ۲ ساعت، در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردیدند. پس از گذشت دو ساعت از لوله‌های حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی یک میلی‌لیتر برداشت نموده و بعد از تهیه رقت‌های متوالی بر روی پلیت حاوی MRS agar کشت سطحی داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شده و با شمارش تعداد کلونی شمارش باکتریایی محاسبه گردید. غلظتی که در آن حد اقل ۲ لوگ کاهش زنده‌مانی مشاهده شد به عنوان دوز کشنده و غلظت‌های قبل از آن به عنوان تحت‌کشنده شناسایی شدند.

به همین صورت، جهت تعیین دوز کشنده نمک صفراوی، غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد نمک صفراوی بعد از یک ساعت گرمخانه گذاری به روش ذکر شده در خصوص اسانس مورد آزمون قرار گرفتند. جهت شناسایی pH کشنده نیز لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر MRS broth با pH ۲، ۲/۵ ، ۳، ۳/۵ و ۴ بعد از تلقیح و یک ساعت گرمخانه گذاری به روش ذکر شده مورد آزمون قرار گرفتند.

بررسی تاثیر مواجهه با دوز تحت‌کشنده اسانس کاکوتی بر مقاومت به pH اسیدی و نمک صفراوی: ابتدا سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی با دوز 10^8 به محیط کشت MRS broth حاوی غلظت تحت‌کشنده اسانس کاکوتی تلقیح شده و به مدت ۲ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردید. سپس لوله حاوی براث ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه) شده و بعد از سه مرحله شستشو با PBS و سانتریفیوژ، از رسوب کف لوله، سوسپانسیون سلولی با OD نهایی ۱ تهیه شد. لوله‌های MRS broth حاوی غلظت کشنده نمک صفراوی و MRS broth با pH کشنده با استفاده از این سوسپانسون سلولی (لوله‌های آزمون) و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی بدون مواجهه قبلی با اسانس (لوله‌های کنترل) تلقیح شدند و به مدت یک ساعت، در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردیدند. سپس از لوله‌ها یک میلی‌لیتر برداشت نموده و بعد از تهیه رقت‌های متوالی بر روی پلیت حاوی MRS agar کشت سطحی داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شده و با شمارش تعداد کلونی شمارش باکتریایی محاسبه گردید و زنده‌مانی سویه در لوله‌های آزمون و کنترل (تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی بدون مواجهه قبلی با اسانس) مقایسه شد.

بررسی تاثیر مواجهه با دوز تحت‌کشنده اسانس کاکوتی بر منحنی رشد تحت شرایط استرس: ابتدا سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی با دوز 10^8 به محیط کشت MRS broth حاوی غلظت تحت‌کشنده اسانس کاکوتی تلقیح شده و به مدت ۲ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردید. سپس لوله حاوی براث ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه) شده و بعد از سه مرحله شستشو با PBS و سانتریفیوژ، از رسوب کف لوله، سوسپانسیون سلولی با OD نهایی ۱ تهیه شد.

سپس لوله‌های MRS broth دارای pH تحت‌کشنده (۴) و غلظت‌های تحت‌کشنده نمک صفراوی (۰/۰۵ و ۰/۱ درصد) با استفاده از سوسپانسیون سلولی فوق تلقیح شده و ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردیدند. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر در زمان‌های ۰، ۳، ۹، ۱۷، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه کاکوتی کوهی به روش GC-MS.

ردیف	ترکیبات	درصد	RT(min)
۱	Thymol	۴۱/۷	۲۳/۲۳۳
۲	.ALPHA. TERPINEOL	۷/۳۱	۱۷/۴۴۵
۳	Carvacrol	۵/۳۹	۲۳/۴۶۹
۴	LINALOOL L	۴/۱۲	۱۳/۳۱۱
۵	.gamma.-Terpinene	۴/۱	۱۱/۳۴۹
۶	(+)-2-CARENE	۳/۴۵	۲۵/۱۱۲
۷	Cymene	۳/۰۲	۹/۸۶۵
۸	BORNEOL L	۲/۶۵	۱۶/۱۵۶
۹	1,8-Cineole	۲/۵۶	۱۰/۱۰۲
۱۰	GERANIOL	۲/۴۷	۲۱/۱۳۲
۱۱	trans-Caryophyllene	۲/۰۴	۲۷/۵۹۸
۱۲	Geranyl acetate	۱/۶	۲۶/۳۹۶
۱۳	.alpha.-Pinene	۱/۳۸	۶/۴۲
۱۴	Nerolidol	۱/۲۸	۳۲/۶۲
۱۵	4-Terpineol	۱/۲۴	۱۶/۶۶۵

اندازه‌گیری شد و منحنی رشد با توجه به مقادیر OD بدست آمده رسم گردید و با منحنی رشد لوله‌های کنترل (تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی بدون مواجهه قبلی با اسانس) مقایسه گردید. تمامی آزمون‌ها به صورت duplicate انجام شد و هر آزمون سه مرتبه تکرار شد.

نتایج

آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده‌ی اسانس کاکوتی کوهی توسط دستگاه GC-MS منجر به شناسایی ۵۱ ترکیب مختلف در اسانس گردید که از بین آن‌ها ۷ ترکیب بیش از ۶۹ درصد اسانس را تشکیل می‌دادند. مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده‌ی اسانس، تیمول (۴۱/۷ درصد)، آلفا- ترپینئول (۷/۳۱درصد)، کارواکرول (۵/۳۹ درصد)، لینالئول (۴/۱۲ درصد) و گاما- ترپینن (۴/۱۰ درصد) می‌باشد (جدول ۱).

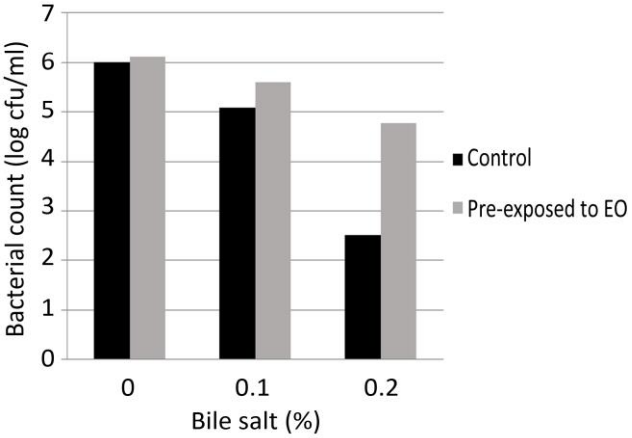
لاکتوباسیلوس رامنوسوس جی‌جی در سطوح مختلف استرس‌ها کشت داده شد و تعداد واحدهای تشکیل دهنده‌ی کلنی در هر سطح تعیین گردید. بر اساس نتایج دوز کشنده اسانس کاکوتی ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام و دوز تحت‌کشنده آن ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام گزارش شد. دوز کشنده‌ی نمک صفراوی ۰/۲ درصد و pH کشنده ۲/۵ گزارش شدند.

برای بررسی تاثیر مواجهه قبلی با اسانس کاکوتی بر مقاومت به سطح کشنده نمک صفراوی و PH، یک نمونه مستقیما با سطح کشنده استرس‌ها مواجه شد (کنترل)، در حالیکه نمونه دیگر ابتدا با دوز تحت‌کشنده اسانس کاکوتی و سپس با سطح کشنده استرس‌ها مواجه شده بود. نتایج اثر تیمار با غلظت تحت‌کشنده‌ی اسانس کاکوتی بر مقاومت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی به نمک صفراوی در نمودار ۱ آمده است. نتایج نشان داد که مواجهه قبلی با سطح تحت‌کشنده اسانس موجب افزایش زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی شد، بطوریکه شمارش باکتریایی در گروه مواجه شده با اسانس در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد نمک صفراوی به ترتیب ۰/۵ و ۲/۲ لوگ بیشتر از گروه کنترل بود. در نمودار ۲ نتایج اثر غلظت تحت‌کشنده‌ی اسانس کاکوتی بر مقاومت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی به pH اسیدی آورده شده است. بر اساس این نتایج مواجهه قبلی با اسانس موجب بهبود زنده‌مانی در pH های ۲/۵ و ۳ شد که در pH ۳ این اثر چشمگیرتر بود.

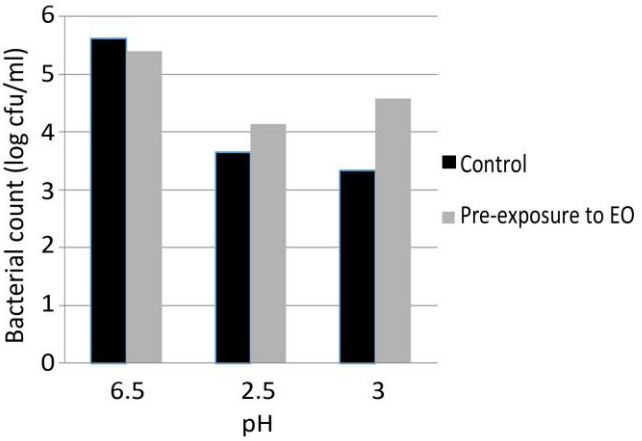
منحنی رشد سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی با توجه به مقادیر OD بدست آمده در طول موج ۶۰۰ نانومتر در زمان‌های مختلف، در طول ۴۸ ساعت رسم شد. نمودار ۳ نشان دهنده‌ی منحنی رشد برای لوله‌های تیمار و کنترل (به ترتیب مواجهه یافته با دوز تحت‌کشنده اسانس و بدون مواجهه) در غلظت ۰/۰۵ درصد نمک صفراوی می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل در غلظت ۰/۰۵ درصد نمک صفراوی تا ساعت نهم دو گروه تیمار و کنترل رشد مشابهی داشتند

www.SID.ir

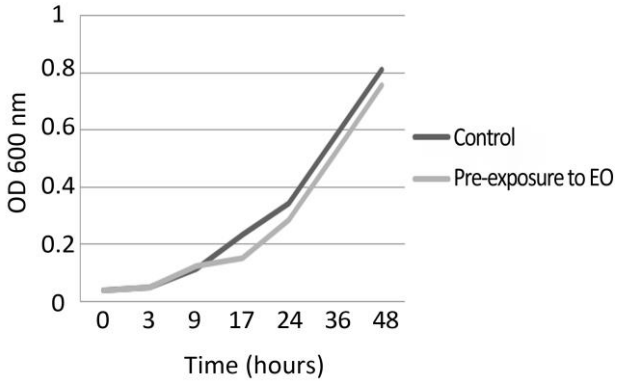
Archive of SID



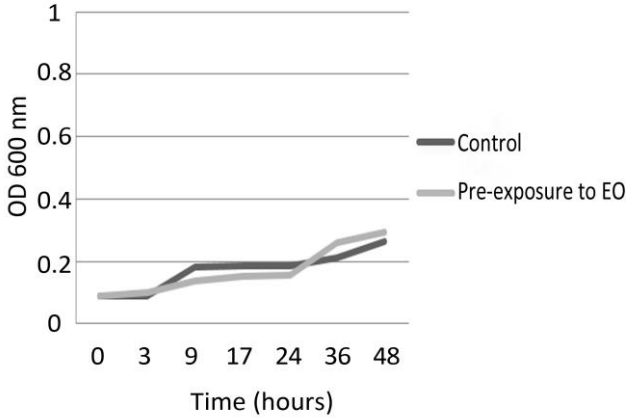
نمودار ۱. اثر مواجهه قبلی با اسانس کاکوتی بر زنده مانی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی در مواجهه با دوزهای مختلف نمک صفراوی.



نمودار ۲. اثر مواجهه قبلی با اسانس کاکوتی بر زنده مانی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی در مواجهه با pHهای مختلف اسیدی.

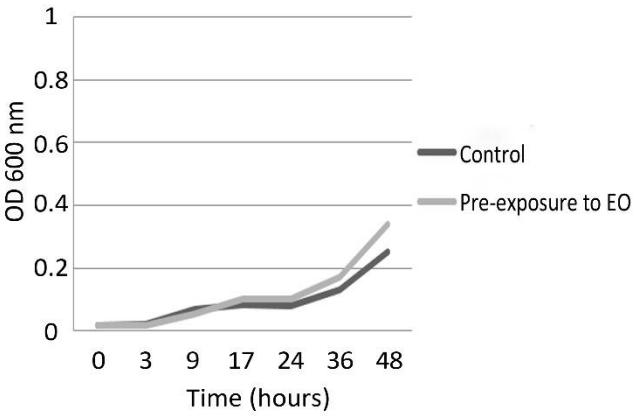


نمودار ۳. اثر مواجهه قبلی با اسانس کاکوتی بر منحنی رشد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی در حضور ۰/۰۵ درصد نمک صفراوی.



نمودار ۴. اثر مواجهه قبلی با اسانس کاکوتی بر منحنی رشد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی در حضور ۰/۱ درصد نمک صفراوی.

و از ساعت نهم به بعد گروه کنترل اندکی پیشی گرفتند. در نمودار ۴ شاهد منحنی رشد برای لوله‌های تیمار و کنترل در غلظت ۰/۱ درصد نمک صفراوی می‌باشیم که در این غلظت تفاوت چشمگیری بین دو گروه مشاهده نشد و رشد هر دو گروه به صورت قابل ملاحظه‌ای مهار شده بود. در نمودار ۵ نیز منحنی رشد سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی در لوله‌های تیمار و کنترل در pH ۴ نمایش داده شده است و بر اساس نتایج در pH ۴ از ساعت هفدهم شاهد پیشی گرفتن ملایم رشد در گروه تیمار بودیم



نمودار ۵. اثر مواجهه قبلی با اسانس کاکوتی بر منحنی رشد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی در pH ۴.

بحث

در مطالعات مختلفی ترکیبات اسانس گیاه کاکوتی کوهی مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای Kakae و Shahbazi در سال ۲۰۱۶ دو ترکیب عمده‌ی اسانس کاکوتی را کارواکرول (۶۵/۲۲ درصد) و تیمول (۱۹/۵۱ درصد) گزارش کردند. همچنین Shahbazi در سال ۲۰۱۷ بعد از مطالعه‌ی اسانس‌های نمونه‌های گیاه کاکوتی

www.SID.ir

Archive of SID

جمع آوری شده از چهار استان مختلف مشاهده کرد که در اکثر نمونه‌ها فراوان‌ترین ترکیبات کارواکرول و تیمول بودند که متعلق به گروه ترکیبات مونوترپن‌های اکسیژنه می‌باشند. این نتایج به نتایج ما نزدیک است.

Chitsaz و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که از ۲۲ ترکیب شناسایی شده در اسانس گیاه کاکوتی کوهی، ۵ ترکیب بیش از ۷۳ درصد اسانس را تشکیل می‌دادند. این ترکیبات شامل پولگون (۲۹/۳ درصد)، پارامنتا ۳-ان-۸-اول (۱۹/۱ درصد)، نئو-منتول (۱۱/۶ درصد)، پیپریتنون (۹/۴ درصد) و ۱و۸ -سینئول (۴/۵ درصد) بودند. همچنین Salehi و همکاران در ۲۰۰۵، اسانس به دست آمده از بخش‌های هوایی گیاه کاکوتی را به روش GC-MS آنالیز کرده و ۳۱ ترکیب اصلی در آن شناسایی کردند. پولگون (۴۵/۸ درصد)، پیپریتنون (۱۴/۷ درصد) و پارا منت-۳ (۸ درصد) ترکیبات عمده این اسانس بودند (۱۶). هر چند که این نتایج ظاهرا تفاوت زیادی با نتایج تحقیق ما دارند، ولی در واقع این ترکیبات نیز از دسته مونوترپن‌های اکسیژنه هستند که بزرگترین بخش ترکیبات اسانس کاکوتی را تشکیل می‌دهند. تفاوت در ترکیبات اسانس یک گیاه می‌تواند ناشی از عوامل درونی (نژاد، خصوصیات ژنتیکی و مرحله رشد گیاه) یا عوامل خارجی (شرایط جغرافیایی، تفاوت‌های آب و هوایی و فصلی و روند آماده‌سازی گیاه برای تهیه اسانس) باشد (۵،۳۰،۳۳).

ماده‌ی غذایی پروبیوتیک بایستی در زمان مصرف دارای تعداد 10^{6}-10^{7} واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی در هر میلی‌لیتر از سویه پروبیوتیک باشد تا بتواند اثرات سودمند خود را بر مصرف کننده بگذارد، در نتیجه زنده و فعال ماندن سویه پروبیوتیک در شرایط پراسترسی که در طول دستگاه گوارش با آن‌ها مواجه می‌شود حائز اهمیت می‌باشد (۱۱). مکانیسم‌های زنده‌مانی که باکتری‌ها در مواجهه با استرس بروز می‌دهند به عنوان پاسخ به استرس (stress response) شناخته می‌شوند. یکی از مکانیسم‌های زنده‌مانی پاسخ تطابقی (adaptive response) است که در آن سلول‌هایی که با یک استرس متوسط مواجه شده‌اند، نسبت به همان استرس با دوز شدیدتر مقاومت بیشتری نشان می‌دهند. مکانیسم دیگر حفاظت متقاطع (cross protection) می‌باشد که در آن سلول‌هایی که با یک استرس مواجه می‌شوند نه تنها به آن استرس بلکه به بعضی استرس‌های غیر مرتبط دیگر نیز مقاومت پیدا می‌کنند (۱۷).

مقاومت به املاح صفراوی از طریق مکانیسم‌های مولکولی مختلفی مانند کاهش ATP داخل سلولی و یا افزایش F_1F_0-ATPase القاء می‌شود. همچنین مشاهده شده است که بیان پروتئین‌های مختلفی که در فعالیت‌های متابولیک سلول نقش دارند، در مواجهه با نمک صفراوی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. مقاومت به اسید نیز بستگی نزدیکی به توانایی سلول در تنظیم pH داخل سلولی دارد و دیده شده است سلول‌هایی که به اسید پاسخ تطابقی نشان می‌دهند، pH داخل سلولی بالاتری دارند (۴).

Sumeri و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر مواجهه قبلی با استرس‌های دما، اسید و صفرا را بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی و دو لاکتوباسیل پروبیوتیک دیگر در شرایط شبیه‌سازی شده‌ی دستگاه گوارش مورد بررسی قرار دادند که براساس نتایج، مواجهه با هیچ یک از استرس‌ها مقاومت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی به اسید و صفرا را بهبود نبخشید. در این تحقیق بر خلاف تحقیق حاضر بیشتر پاسخ تطابقی میکروارگانیسم‌ها به استرس‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت؛ در حالیکه در تحقیق حاضر حفاظت متقاطع در سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی در پاسخ به استرس اسانس بررسی شد. نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز حاکی از عدم بهبود زنده‌مانی سویه‌های مورد بررسی بعد از مواجهه با استرس‌ها بود که شباهتی به نتایج ما نداشت.

در تحقیقی دیگر Kim و همکاران پاسخ به استرس سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را ارزیابی کردند. بدین منظور بعد از تعیین سطوح کشنده و تحت‌کشنده استرس‌های حرارت، صفرا و نمک، میکروارگانیسم را ابتدا با سطح تحت‌کشنده و سپس با سطح کشنده استرس‌ها مواجه نمودند و افزایش معنادار زنده‌مانی سلول‌ها را مشاهده کردند. آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* قادر به ارائه پاسخ تطابقی به استرس‌ها می‌باشد و پاسخ تطابقی به یک استرس می‌تواند موجب حفاظت متقاطع در مقابل سایر استرس‌ها شود. این نتایج همسو با نتایج تحقیق حاضر بود.

Barbosa و همکاران در سال ۲۰۱۵ تاثیر شرایط تحت‌کشنده درجه حرارت، pH اسیدی و پراکسید هیدروژن را بر زنده‌مانی *پدیوکوکوس اسیدیلاکتیسی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در طول خشک کردن افشانه‌ای در آب‌پرتقال و نگهداری در شرایط مختلف مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده نمودند که زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در صورت مواجهه قبلی با استرس‌ها تقویت می‌شد. در تحقیق حاضر نیز مواجهه قبلی با استرس (استرس اسانس) موجب تقویت زنده‌مانی سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*

www.SID.ir

Archive of SID

جی‌جی در مواجهه با استرس‌های بعدی (شریط اسیدی و نمک صفراوی) شد.

اطلاعاتی در خصوص اثر اسانس‌های گیاهی بر پاسخ به استرس در سویه‌های پروبیوتیک در دسترس نیست ولی محققان زیادی تاثیر استرس سطوح تحت‌کشنده اسانس‌های گیاهی بر پاتوژن‌های غذایی را مورد مطالعه قرار داده‌اند. در این رابطه دو پرسش مطرح می‌شود: آیا مواجهه قبلی با دوز تحت‌کشنده یک اسانس گیاهی موجب تغییر در حساسیت باکتری به دوزهای بالاتر آن اسانس می‌شود؟ و آیا این مواجهه می‌تواند باکتری را نسبت به فرایندهای فیزیکی مورد استفاده در فراوری مواد غذایی و همچنین مواد ضدمیکروبی حساس‌تر و یا مقاوم‌تر سازد؟ دسته‌ای از تحقیقات برای یافتن پاسخ پرسش اول، تغییر در حساسیت باکتری‌های مربوط به مواد غذایی به اسانس‌ها و یا مواد متشکله‌ی آن‌ها را بعد از مواجهه با سطوح تحت‌کشنده‌ی همان اسانس یا ماده متشکله مورد بررسی قرار داده اند که در اغلب موارد افزایش حساسیت به اسانس مورد بررسی مشاهده نشد (۶،۷،۲۵). در دو پژوهش دو سویه *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس* بعد از مواجهه با دوز تحت‌کشنده اسانس درخت چای و کارواکرول (به ترتیب) نسبت به سطوح بالاتر آن‌ها مقاومت بیشتری نشان دادند (۱۴،۳۷). برای پاسخ به پرسش دوم دسته دیگری از مطالعات اثر مواجهه با سطوح تحت‌کشنده اسانس یا مواد متشکله‌ی آن را بر حساسیت میکروارگانیسم‌هایی از جنس سالمونلا، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سودوموناس آئروجینوزا* و *استافیلوکوکوس آرئوس* به مواد ضدمیکروبی و فرایندهای فیزیکی مورد استفاده در نگهداری مواد غذایی از قبیل نمک طعام، اسید لاکتیک و گرما مورد بررسی قرار داده‌اند. این مطالعات اندک هستند و بر روی تعداد محدودی از اسانس‌ها و پاتوژن‌های روده‌ای متمرکز می‌باشند و در اکثر این مطالعات افزایش مقاومت به این فرایندها گزارش نشده است (۹،۱۳،۲۳،۲۴،۳۵).

اسانس‌های گیاهی قادرند به غشاء سیتوپلاسمیک باکتری آسیب بزنند و سلول را در تنظیم فشار اسمزی دچار مشکل کنند، لذا این موضوع حیاتی است که باکتری بتواند یکپارچگی و عملکرد غشاء سلولی خود را حفظ کند. در شرایط استرس، فسفولیپیدهای غشاء قادرند که ساختار زنجیره‌شان را با تغییر نسبت اشباع به غیراشباع، شاخه‌دار به بدون شاخه، نوع شاخه‌های اسید چرب و طول زنجیره‌ی آسیل تغییر دهند. بیشتر تحقیقات صورت گرفته در رابطه با نحوه پاسخ سلول به استرس اسانس نیز تمرکز بر تغییرات لیپیدی غشاء دارند که می‌تواند ناشی از شناخت اسانس‌ها به عنوان عوامل فعال غشائی باشد. تغییر در فسفولیپیدها، پروفایل پروتئینی سلول‌ها، سیستم افلاکس و یا بیان مولکول‌ها و ژن‌های مربوط به استرس نیز مکانیسم‌هایی هستند که در مورد پاسخ به استرس اسانس‌های گیاهی مورد توجه بوده‌اند و می‌توانند بر عملکرد فیزیولوژیک میکروارگانیسم تاثیر بگذارند (۸).

در این پژوهش، مواجهه با سطح تحت‌کشنده اسانس کاکوتی موجب تغییر منحنی رشد سویه در حضور املاح صفراوی و شرایط اسیدی شد و همچنین زنده‌مانی سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جی‌جی که در معرض استرس اسانس قرار گرفته بود، در مواجهه با شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی تقویت شد؛ به عبارت دیگر مواجهه با سطح تحت‌کشنده‌ی اسانس کاکوتی موجب تقویت حفاظت متقاطع در برابر شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی شد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به جهت حمایت مالی برای اجرای این پروژه سپاسگزاری می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Annunziata, A., Vecchio, R. (2013). Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. Food Qual Prefer, 28(1), 348-355. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.10.009
2. Barbosa, J., Borges, S., Teixeira, P. (2015). Influence of sub-lethal stresses on the survival of lactic acid bacteria after spray-drying in orange juice. Food Microbiol, 52, 77-83. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.010 PMID: 26338119
3. Castro, M., Palavecino, N., Herman, C., Garro, O., Campos, C. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. Meat Sci, 87(4), 321-329. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.11.006
4. Chen, M.-J., Tang, H.-Y., Chiang, M.-L. (2017). Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefiranofaciens* M1. Food Microbiol, 66, 20-27. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.020 PMID: 28576369
5. Chitsaz, M., Pergar, A., Naseri, M., Kamalinajad, M., Bazargan, M., Mansouri, S., Ansari, F. (2007). Composition ofthe essential oil and antibacterial activity of alcoholic extract

www.SID.ir

Archive of SID

and oil of *Ziziphora clinopodiodes*. Lamon selected bacteria. Daneshvar J, 14(68), 15-22.

6. da Silva Luz, I., Gomes-Neto, N. J., Magnani, M., de Souza, E. L. (2015). Assessment of tolerance induction by *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in *Pseudomonas aeruginosa* cultivated in a meat-based broth and in a meat model. Food Sci Technol Int, 21(8), 571-580. https://doi.org/10.1177%2F1082013214554467 PMID: 25293767

7. da Silva Luz, I., Neto, N. J. G., Tavares, A. G., Nunes, P. C., Magnani, M., de Souza, E. L. (2012). Evidence for lack of acquisition of tolerance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. Appl Environ Microb, 78(14), 5021-5024. https://doi.org/10.1128/AEM.00605-12 PMID: 22544235

8. de Souza, E. L. (2016). The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: A review. Trends Food Sci Tech, 56, 1-12. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.012

9. Dubois-Brissonnet, F., Naïtali, M., Mafu, A. A., Briandet, R. (2011). Induction of fatty acid composition modifications and tolerance to biocides in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by plant-derived terpenes. Appl Environ Microb, 77(3), 906-910. https://doi.org/10.1128/AEM.01480-10 PMID: 21131520

10. Espitia, P. J., Batista, R. A., Azeredo, H. M., Otoni, C. G. (2016). Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. Food Res Int, 13, 81-97. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.026 PMID: 29195890

11. Ferrando, V., Quiberoni, A., Reinheimer, J., Suárez, V. (2016). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: A study in vitro of heat stress influence. Food Microb, 54, 154-161. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.003

12. Fong, F. L. Y., Kirjavainen, P., Wong, V. H. Y., El-Nezami, H. (2015). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on dendritic cells, macrophages and monocytes from healthy donors. J Funct Food, 13, 71-79. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.040 PMID: 26961406

13. Gomes Neto, N. J., Luz, I. d. S., Tavares, A. G., Honório, V. G., Magnani, M., de Souza, E. L. (2012). *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its majority compound 1, 8-cineole at sublethal amounts induce no direct and cross protection in *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Foodborne Pathog Dis, 9(12), 1071-1076. https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1258 PMID: 23190166

14. Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. (2012). Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single-and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. Antimicrob Agents Ch, 56(2), 909-915. https://doi.org/10.1128/AAC.05741-11 PMID: 22083482

15. Kakaei, S., Shahbazi, Y. (2016). Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. Food Sci Technol, 72, 432-438. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.021

16. Khan, I., Tango, C. N., Miskeen, S., Lee, B. H., Oh, D.-H. (2016). Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety–A review. Food Control, 55(1), 181-186. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.010

17. Kim, W. S., Perl, L., Park, J. H., Tandianus, J. E., Dunn, N. W. (2001). Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. Curr Microbiol, 43(5), 346-350. https://doi.org/ 10.1007/s002840010314 PMID: 11688799

18. Koponen, J., Laakso, K., Koskenniemi, K., Kankainen, M., Savijoki, K., Nyman, T. A., de Vos, W. M., Tynkkynen, S., Kalkkinen, N., Varmanen, P. (2012). Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. J Proteomics, 75(4), 1357-1374. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.009 PMID: 22119544

19. Lee, K., Lee, H.-G., Choi, Y.-J. 2008. Proteomic analysis of the effect of bile salts on the intestinal and probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. J Biotechnol, 137(1), 14-19.https://doi.org/10.1046/j.1523-5378.2003.00146.x PMID: 18680767

20. Lee, K., Pi, K. 2010. Effect of transient acid stress on the proteome of intestinal probiotic *Lactobacillus reuteri*. Biochemistry (Moscow), 75(4), 460-465. https://doi.org/10.1134/S0006297910040097

21. Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. Int J Food Microbiol, 55(1), 181-186. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6 PMID: 10791741

22. Meral, G. E., Konyalioglu, S., Ozturk, B. (2002). Essential oil composition and antioxidant activity of endemic *Ziziphora taurica* subsp. Cleonioides. Fitoterapia, 73(7), 716-718. https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00244-7 PMID: 12490239

23. Monte, D. F., Tavares, A. G., Albuquerque, A. R., Sampaio, F. C., Oliveira, T. C., Franco, O. L., Souza, E. L., Magnani, M. (2014). Tolerance response of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains to habituation to *Origanum vulgare* L. essential oil. Front Microbiol, 5, 721. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00721 PMID: 25566231

24. Neto, N. J. G., da Silva Luz, I., Honório, V. G., da Conceição, M. L., de Souza, E. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and 1, 8-cineole acquire no direct and cross protection in a meat-based broth. Food Res Int, 49(1), 143-146. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.049

25. Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., Imanishi, J. (2003). Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. Helicobacter, 8(3), 207-215. https://doi.org/10.1046/j.1523-5378.2003.00146.x PMID: 12752733

26. Pitino, I., Randazzo, C. L., Mandalari, G., Curto, A. L., Faulks, R. M., Le Marc, Y., Bisignano, C., Caggia, C., Wickham, M. S. J. 2010. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. Food Microbiol, 27(8), 1121-1127. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.019 PMID: 20832693

27. Sajadi, S., GHASEMI, D. N., Baluchi, M. 2003. (2003). Volatile constituents of *Ziziphora clinopodioides* LAM. Pajouhesh-Va-Sazandegi, 58, 97-100.

www.SID.ir

Archive of SID

28. Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhar, F., Nejad-Ebrahimi, S., Yousefzadi, M. (2005). Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. rigida (Boiss.) Rech. from Iran. Biol Pharm Bull, 28(10), 1892-1896. https://doi.org/10.1248/bpb.28.1892 PMID: 16204941

29. Shahbazi, Y. (2017). Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial properties of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oils collected from different parts of Iran. J Food Sci Techno, 54 (11), 3491-3503. https://doi.org/10.1007/s13197017-2806-2 PMID: 29051644

30. Shahbazi, Y., Shavisi, N. (2016). Interactions of *Ziziphora clinopodioides* and *Mentha spicata* essential oils with chitosan and ciprofloxacin against common food-related pathogens. Lwt- Food Sci Technol, 71, 364-369. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.011

31. Shavisi, N., Khanjari, A., Basti, A. A., Misaghi, A., Shahbazi, Y. (2017). Effect of PLA films containing propolis ethanolic extract, cellulose nanoparticle and Ziziphora clinopodioides essential oil on chemical, microbial and sensory properties of minced beef. Meat Sci, 124, 95-104. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.10.015 PMID: 27846444

32. Shori, A. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. Biocatal Agricul Biotech, 4(4), 423-431. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.010

33. Sonboli, A., Atri, M., Shafiei, S. (2010). Intraspecific variability of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* ssp. *rigida* from Iran. Chem Biodivers. 7(7), 1784-1789. https://doi.org/10.1002/cbdv.200900336 PMID: 20658666

34. Sumeri, I., Arike, L., Stekolštšikova, J., Uusna, R., Adamberg, S., Adamberg, K., Paalme, T. (2010). Effect of stress pretreatment on survival of probiotic bacteria in gastrointestinal tract simulator. Appl Microbiol Biotech, 86(6), 1925-1931. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2429-2 PMID: 20107984

35. Tavares, A. G., Monte, D. F. M. d., Albuquerque, A. d. R., Sampaio, F. C., Magnani, M., Siqueira Júnior, J. P. d., Souza, E. L. d. (2015). Habituation of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* to *Origanum vulgare* L. essential oil does not induce direct-tolerance and cross-tolerance to salts and organic acids. Braz J Microbiol, 46(3), 835-840. http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246320140355 PMID: 26413067

36. Ultee, A., Kets, E. P., Alberda, M., Hoekstra, F. A., Smid, E. J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Arch Microbiol, 174(4), 233-238. https://doi.org/10.1007/s002030000199 PMID: 11081791

37. Zhang, X., Ding, W., Li, J., Liu, F., Zhou, X., Tian, S. (2015). Multi-elemental analysis of *Ziziphora clinopodioides* from different regions, periods and parts using atomic absorption spectrometry and chemometric approaches. Rev Bras Farmacogn, 25(5), 465-472. http://dx.doi.org/10.1016 /j.bjp .2015.07.021

www.SID.ir