

Evaluation of Antibacterial Activity of Annatto Dye on *Streptococcus Pyogenes*, *Escherichia Coli*, *Enterococcus Faecalis*, and *Bacillus Subtilis*

Yolmeh M^{1*}, Habibi Najafi MB², Hosseini F³, Shahabadi S⁴

¹Department of Food Science and Technology, University of Agriculture Science and Natural Source of Gorgan, Iran

²Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

³Researcher of Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad, Iran

⁴M. Sc. Department of Food Science and Technology, Faculty of Science, Azad Islamic University of Sabzevar, Sabzevar, Iran

Abstract

Evidence has identified the harmful effects of antibiotics and synthetic preservatives used in foodstuffs. Therefore, researchers are looking for natural and safe alternatives. Annatto is carotenoid dye and can be used in food industry. This dye has antimicrobial and antioxidant properties. This study aimed to evaluate the antimicrobial effects of annatto dye on the some pathogenic and spoilage bacteria. Annatto dye was extracted by maceration methods and after filtration; it was powdered by a vacuum oven. Antimicrobial activity was evaluated by disc diffusion method and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined using agar dilution method. Then, the data were entered into the SPSS statistical software (v. 16) and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's test. The results revealed the effectiveness of annatto dye in the growth of all the tested bacteria. *Bacillus subtilis* and *Escherichia Coli* (E.Coli) showed the lowest and highest sensitivity to annatto dye, respectively. Moreover, E.coli had the highest MIC among the bacteria under study, but MBC was not observed in E.coli in any annatto dye concentration. Gram-positive bacteria were more sensitive than gram-negative bacteria to the antimicrobial activity of annatto dye. According to the results, annatto dye can be used as an inhibitor of bacterial growth.

Keywords: Dye, Annatto, Antimicrobial, Pathogen

Sadra Med Sci J 2014; 2(3): 307-314

Received: Jan. 1st, 2014

Accepted: June 14th, 2014

* Corresponding Author: **Yolmeh M.** Department of Food Science and Technology, University of Agriculture Science and Natural Source of Gorgan, Iran, Mahmud.yolmeh@yahoo.com

مجله علمی علوم پزشکی صدرا

دوره ۲، شماره ۳، تابستان ۱۳۹۳، صفحات ۳۰۷ تا ۳۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۳/۲۴ تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۱

مقاله کوتاه
(Short Communication)

ارزیابی اثر ضدباکتریایی رنگ آناتو بر باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنس، اش‌ریشیا کلی،

انتروکوکوس فکالیس و باسیلوس سوبتیلیس

محمود یلمه^{۱*}، محمدباقر حبیبی نجفی^۲، فرشته حسینی^۳، سمیرا شاه آبادی^۴^۱ دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان^۲ استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد^۳ مربی پژوهشی، گروه افزودنی‌های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد^۴ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

چکیده

اثرات زیانبار آنتی‌بیوتیک‌ها و یا نگهدارنده‌های سنتزی که در مواد غذایی استفاده می‌شوند، مشخص شده است و محققین به دنبال جایگزین‌هایی با منشا طبیعی و ایمن هستند. رنگ آناتو یک رنگ کاروتنوئیدی بوده و می‌تواند در صنایع غذایی مورد استفاده قرار بگیرد. رنگ آناتو دارای خصوصیات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد میکروبی رنگ آناتو بر چند باکتری بیماری‌زا و مولد فساد بود. در این مطالعه رنگ آناتو به روش خیساندن استخراج و پس از فیلتراسیون، با آن تحت خلا به شکل پودر درآورده شد. بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش انتشار دیسک انجام شد و میزان حداقل غلظت بازدارنده از رشد ((Minimum Inhibitory Concentration (MIC)) و حداقل غلظت کشنده باکتری ((Minimum Bactericidal Concentration (MBC)) به کمک روش رقت آگار محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و با بکارگیری آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی جهت بررسی تجزیه و تحلیل شد. نتایج آزمایش رنگ آناتو بر رشد تمام باکتری‌های مورد آزمون موثر است؛ باسیلوس سوبتیلیس و اش‌ریشیا کلی به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را به رنگ آناتو نشان دادند. اش‌ریشیا کلی بین باکتری‌های مورد آزمون بیشترین MIC را داشت و در غلظت‌های مورد آزمون رنگ آناتو تنها برای اش‌ریشیا کلی MBC مشاهده نشد. رنگ آناتو بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون اثر ضد میکروبی بیشتری را نسبت به باکتری‌های گرم منفی نشان داد. با توجه به نتایج آزمایش می‌توان از رنگ آناتو به عنوان یک ممانعت‌کننده از رشد باکتری استفاده کرد.

واژگان کلیدی: رنگ، آناتو، ضد میکروبی، بیماری‌زا

* نویسنده مسئول: محمود یلمه، دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، Mahmud.yolmeh@yahoo.com

مقدمه

رنگ‌ها از جمله مهم‌ترین افزودنی‌های غذایی می‌باشند که نقش مهمی در صنعت غذا دارند. امروزه اثرات زیانبار رنگ‌های سنتزی بر سلامتی انسان به اثبات رسیده است. مصرف‌کنندگان نیز تمایل بیشتری را برای مصرف مواد غذایی عاری از نگهدارنده‌های سنتزی نشان می‌دهند (۱). بر خلاف رنگ‌های سنتزی، رنگ‌های با منشا طبیعی اثرات سمی، آلرژی‌زایی و سرطان‌زایی نداشته و برخی از آن‌ها ویژگی‌های مفیدی؛ مثل آنتی‌اکسیدانی، ضد-میکروبی و ضدسرطانی دارند (۲).

رنگ آناتو که یک رنگ طبیعی کاروتنوئیدی بوده و از دانه‌های درخت بیکسا اورلانا که در مناطق گرم و مرطوب می‌روید، بدست می‌آید و کاروتنوئیدی بوده و جزء غالب آن (حدود ۸۰ درصد)، کاروتنوئید بیکسین می‌باشد که نامحلول در آب است. نوروبیکسین بخش محلول در آب و جزء دوم رنگ آناتو (حدود ۲۰ درصد) می‌باشد. علاوه بر این دو کاروتنوئید، کاروتنوئیدهای دیگری نیز وجود دارند که بخش کمی از دانه را تشکیل می‌دهند (۳). عصاره‌ی رنگی آناتو طیف رنگ نارنجی تا قرمز دارد و در مقالات مختلف به ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضد میکروبی آن اشاره شده است (۴، ۵). آناتو به عنوان رنگ طبیعی و سالم که رنگی نارنجی تا قرمز ایجاد می‌کند در مواد غذایی مختلف از جمله فرآورده‌های لبنی، انواع مرباها، فرآورده‌های گوشتی و غیره استفاده می‌شود (۶).

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان بیماری‌ها می‌تواند سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک را بوجود آورد. از این رو محققان بدنبال جایگزین کردن آنتی‌بیوتیک‌ها با داروهایی که منشا گیاهی دارند، هستند (۷). عصاره‌های طبیعی می‌توانند در بخش‌های مختلف سلول از جمله دیواره سلولی، غشای سیتوپلاسمی، پروتئین‌های غشای سیتوپلاسمی ایجاد اختلال کنند. علاوه بر این می‌توانند باعث منعقد و کواگوله شدن محتویات سیتوپلاسم و نشد

اجزای سیتوپلاسمی شوند و بدین ترتیب از رشد باکتری‌ها ممانعت کنند (۸). هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر ضد میکروبی رنگ آناتو بر باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *اشریشیا کلی*، *استرپتوکوکوس پیورنس* و *باسیلوس سوبتیلیس* بود. علاوه بر این حداقل غلظت بازدارنده از رشد و نیز حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره‌ی رنگی آناتو را برای هر یک از باکتری‌ها تعیین شد.

مواد و روش

این پژوهش آزمایشگاهی در آزمایشگاه فناوری‌های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. هدف از مطالعه ارزیابی اثر ضدباکتریایی رنگ آناتو و تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری بر باکتری‌های مورد آزمون بود. حلال‌های هگزان و استون، از شرکت مرک آلمان خریداری شد. باکتری‌های *اشریشیا کلی* (ATCC 25922) و *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC 29212) از گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی، *استرپتوکوکوس پیورنس* و *باسیلوس سوبتیلیس* از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی و محیط کشت‌های نوترینت براث و مولر هینتون آگار را از شرکت مرک آلمان و دانه آناتو از شهر حیدرآباد کشور هند تهیه شد.

استخراج رنگ آناتو: جهت استخراج رنگ آناتو از روش کاستلو و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شد و طبق آن مقداری دانه آناتو را در هگزان به مدت ۶ ساعت به منظور روغن‌زدایی (Defatting) خیسانده و دانه‌های روغن-زدایی شده را به منظور استخراج رنگ در حلال آلی استون خیسانده شد (۹). عصاره‌های رنگی پس از فیلتراسیون، بوسیله روتاری اوپراتور تغلیظ شد و عصاره تغلیظ شده بوسیله آن تحت خلا به پودر تبدیل شد. جهت جلوگیری از آسیب حرارتی باندهای دوگانه

نظر گرفته شد (۱۱). غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره رنگی آناتو استفاده شد. یک پتری‌دیش حاوی محیط کشت و فاقد باکتری به عنوان شاهد منفی که بیانگر عدم وجود آلودگی است و یک پتری‌دیش حاوی محیط کشت و باکتری مورد نظر به عنوان شاهد مثبت که بیانگر قدرت رشد باکتری می‌باشد نیز استفاده شد (۱۱).

تعیین کمترین غلظت کشنده باکتری رنگ آناتو: برای تعیین کمترین غلظت کشنده رنگ آناتو نیز از روش رقت آگار استفاده شد، با این تفاوت که از پتری‌دیشی که به عنوان **Minimum Inhibitory Concentration (MIC)** در نظر گرفته شده، در محیط نوترینت برات کشت فرعی انجام شد و در صورت عدم مشاهده رشد در محیط مغذی، غلظت **Minimum Bactericidal Concentration (MBC)** با غلظت **MIC** برابر خواهد بود و اما در صورت مشاهده رشد باکتری در محیط کشت مغذی، از باکتری‌های رشد کرده در این محیط به محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی عصاره آناتو با غلظت‌های بیشتر، کشت فرعی داده شد و غلظتی از رنگ آناتو که در آن رشد باکتری مشاهده نشده به عنوان **MBC** در نظر گرفته شد (۱۱). غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رنگ آناتو برای تعیین **MBC** استفاده شد. آزمایش‌ها برای هر از باکتری‌ها در ۳ تکرار انجام پذیرفت.

برای تجزیه و تحلیل نتایج از نرم‌افزار آماری نسخه ۱۶ استفاده شد. از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه جهت مقایسه میانگین‌ها و از آزمون توکی جهت بررسی اختلاف میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ استفاده گردید.

نتایج

نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های انتشار دیسک (جدول ۱) نشان داد که رنگ دانه‌ی آناتو بر رشد باکتری‌های مورد نظر اثر داشته و هاله‌ی عدم رشد در آنها تشکیل

کنژوگه، طی خشک کردن از دمای پائین (۴۰ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی رنگ آناتو: از روش انتشار دیسک در محیط کشت مولر هینتون آگار جهت بررسی اثر ضد میکروبی رنگ آناتو استفاده شد. بدین ترتیب که از باکتری‌های فعال شده (۲۴ ساعت رشد کرده) سوسپانسیون معادل با کدورت لوله نیم مک‌فارلند استاندارد ایجاد شد. سپس توسط سواب استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشت و در محیط کشت مولر هینتون آگار به شکل سطحی کشت شد. پودر رنگی آناتو را در حلال اتانول حل کرده و محلول رنگی با غلظت‌های ۰/۵، ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. دیسک‌های استریل با قطر ۶ میلی‌متر در محلول رنگی آناتو با غلظت‌های تعیین شده خیسانده شدند و از آن‌ها در سطح پتری‌دیش‌ها استفاده شدند؛ سپس پتری‌دیش‌های تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین یک پلیت فاقد باکتری به عنوان شاهد منفی و یک پلیت نیز بدون رنگ آناتو به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. دیسک آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و جنتامایسین نیز به منظور مقایسه قطر هاله عدم رشد آنها با قطر هاله عدم رشد دیسک‌های آغشته به رنگ آناتو استفاده شد (۱۰).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد رنگ آناتو: حداقل غلظت بازدارنده از رشد، کمترین غلظتی است که در نتیجه آن کاهش یا بقا یکسان در میزان زنده ماندن تلقیح داریم. برای این منظور از روش رقت آگار استفاده شد؛ بدین ترتیب که محلول رنگی آناتو را با محیط کشت مولر هینتون آگار مخلوط شد و باکتری‌ها به صورت پورپلیت کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت اینکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد باکتری‌ها بررسی شد به نحوی که اولین پتری‌دیشی که باکتری در آن نتوانست رشد کند به عنوان کمترین غلظت بازدارنده از رشد در

شد هر چند که قطر هاله در باکتری‌های مختلف، متفاوت است.

جدول ۱. قطر هاله عدم رشد باکتری توسط رنگ آناتو بر حسب میلی‌متر

دیسک آنتی- بیوتیک *	۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
باسیلوس سوبتیلیس	$8/8 \pm 0/45^a$	$9/8 \pm 0/52^a$	$12 \pm 0/45^b$	$13/3 \pm 0/52^b$	$13/7 \pm 0/52^b$
استرپتوکوکوس پیوژس	$8/5 \pm 0/35^a$	$9/8 \pm 0/28^a$	$11/3 \pm 0/35^b$	$12/3 \pm 0/40^b$	$13/1 \pm 0/40^b$
اشریشیا کلی	$7/7 \pm 0/35^a$	$8/2 \pm 0/35^a$	$8/5 \pm 0/45^a$	$9/9 \pm 0/28^b$	$10/75 \pm 0/45^b$
انتروکوکوس فکالیس	$8/1 \pm 0/28^a$	$8/9 \pm 0/40^a$	$9/8 \pm 0/28^a$	$10/8 \pm 0/30^a$	$11/9 \pm 0/30^a$

* پ: دیسک آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، ج: دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین.

اعداد با حروف متفاوت در هر ردیف دارای اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد می‌باشند.

نتایج بدست آمده از آزمون‌های رقت آگار (جدول ۲) نشان داد که رنگ آناتو اثر بازدارندگی بر رشد باکتری‌های مورد آزمون دارد، بدین صورت که باسیلوس سوبتیلیس کمترین غلظت بازدارنده از رشد و اشریشیا کلی و انتروکوکوس فکالیس بیشترین غلظت بازدارنده از رشد را دارند.

جدول ۲. حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری توسط رنگ آناتو

شاهد مثبت	شاهد منفی	۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
+	-	+	+	+	-	-	-
+	-	+	+	+	+	-	-
+	-	+	+	+	+	+	-
+	-	+	+	+	+	+	-

جدول ۳ نتایج آزمون تعیین حداقل غلظت کشنده باکتری را نشان می‌دهد؛ مطابق جدول کمترین میزان MBC برای باسیلوس سوبتیلیس که معادل غلظت MIC بود و بیشترین میزان MBC (۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که

جدول ۳. حداقل غلظت کشنده باکتری توسط رنگ آناتو

۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
+	-	-	-	-
+	+	-	-	-
+	+	+	-	-
+	+	+	+	-

بحث

۱۳۹۱، طی بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ی نوربیکسین ۱ درصد، اعلام کردند که نوربیکسین ۱ درصد اثر ممانعت‌کننده‌ای بر باکتری‌های گرم منفی ندارد (۱۷)؛ در این پژوهش عصاره‌ی رنگی آناتو بر رشد/شریشیا کلی اثر بازدارندگی داشت.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره‌ی رنگی آناتو در شرایط آزمایشگاه اثر ضد میکروبی قابل توجه‌ای بر باکتری‌های مورد بررسی دارد. مطابق نتایج آزمایش اثر ضدباکتریایی عصاره‌ی رنگی آناتو بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون نسبت به باکتری‌های گرم منفی بکار رفته بیشتر بود. رنگ آناتو، رنگی با منشأ طبیعی و ایمن است و مطابق نتایج آزمایشات، دارای اثر ضد میکروبی می‌باشد. بنابراین رنگ آناتو می‌تواند به عنوان یک جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی که اثرات زیانباری بر سلامتی دارند، استفاده شود. استخراج رنگ آناتو بوسیله‌ی روش‌های جدید استخراج عصاره از جمله استخراج به کمک امواج فراصوت، مایکروویو و دی اکسید کربن فوق بحرانی و اثرات ضد میکروبی رنگ آناتو بدست آمده از هر یک روش‌ها بررسی شود.

تقدیر و تشکر

از همکاری و حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی جهاد دانشگاهی مشهد در انجام این طرح پژوهشی با شماره طرح ۲۰۶ قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Li J, Zhang L, Liu Y. Optimization of extraction of natural pigment from purple sweet potato by response surface methodology and its stability. Hindawi Publishing Corporation, Journal of Chemistry 2013 (2013); 1-5.

هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدباکتریایی رنگ آناتو استخراج شده به روش خیساندن بود. نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد باکتری نشان داد که رنگ آناتو بر رشد همه‌ی باکترهای مورد آزمون موثر است بدین صورت که بیشترین قطر هاله برای باسیلوس سوبتیلیس و پس از آن استرپتوکوکوس پیوژس و کمترین قطر هاله مربوط به اشیشیا کلی بود.

نتایج حاصل از رقت آگار جهت تعیین MIC نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نشان می‌دهند. به نحوی که غلظت‌هایی که از رشد باسیلوس سوبتیلیس ممانعت می‌کنند، بجز غلظت ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، از رشد انتروکوکوس فکالیس و اشیشیا کلی ممانعت نمی‌کند. گالیندو و همکاران ۲۰۰۳، در مورد عصاره‌ی آناتو (۲/۸ درصد نوربیکسین)، محمدی سیچانی و همکاران ۱۳۸۹، در مورد اسانس گل‌های بومادران و اسمیت پالمر و همکاران ۱۹۹۸، نیز به نتایج مشابه‌ای رسیدند (۱۲)، ۱۳، ۱۴). دلیل احتمالی آن حضور لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره‌ی سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. لیپوپلی-ساکاریدهای دیواره‌ی سلولی، می‌توانند مانع از رسیدن ترکیبات فعال اسانس به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی می‌شود (۱۵). باسیلوس سوبتیلیس بین باکتری‌های مورد آزمون، بیشترین حساسیت به رنگ آناتو را داشته و کمترین میزان MIC و MBC را بین باکتری‌ها داشت. گالیندو و همکاران ۲۰۰۳، در مورد اثر ضد میکروبی عصاره‌ی ۲/۸ درصد نوربیکسین بر باکتری‌های پاتوژن، مشاهده کردند که باسیلوس سرئوس بیشترین حساسیت را به عصاره‌ی ۲/۸ درصد نوربیکسین دارد. غلظت‌های بکار رفته از رنگ آناتو (۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اثر ممانعت‌کنندگی بر اشیشیا کلی داشت اما اثر کشندگی مشاهده نشد. گالیندو و همکاران نیز اثر کشنده از عصاره‌ی ۲/۸ درصد نوربیکسین بر اشیشیا کلی مشاهده نکردند (۱۶). برخلاف نتایج سحری و همکاران

- International Journal of Food Microbiology 2004; 94: 223-253.
9. Castello M, Chandra N, Phatak A, Madhuri S. Estimation of bixin in seeds of *Bixa orellana* L. from different locations in Western Maharashtra. *Indian J. Plant Physiol* 2004; 9 (2): 185–188.
 10. Skaltsa HD, Demetoz C, Lazari, Sokovic M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry* 2003; 64 (3): 743-752.
 11. Manenzhe NJ, Potgieter N, Ree TV. Compostion and antimicrobial activities of volatile components of *lippia javanica* phytochemistry 2004; 65: 2333-2336.
 12. Galindo-Cuspinera V, Westhoff DC, Rankin SA. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic lactic acid and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection* 2003; 66: 1074-1078.
 13. Mohammadi-Sichani M, Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of *Achillea wilhelmsii* against pathogenic bacteria. *Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS)* 2011; 13 (3): 9-14. (Persian)
 14. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology*. 1998; 26: 118–122.
 15. Mckeegan KS, Borges – walmsley MI, walmsley AR. Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Tends in microbiology* 2002; 10: 85-145.
 16. Galindo-Cuspinera V, Volatile composition and antimicrobial
 2. Sinha K, Chowdhury S, Saha PD, Datta S. Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye from seeds of *Bixa orellana* (Annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). *Industrial Crops and Products*. 2013; 41: 165- 171.
 3. Galindo-Cuspinera V, Westhoff DC, Rankin SA. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic lactic acid and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection* 2003; 66: 1074-1078.
 4. Ramamoorthy S, Meera GP, Lubaina M, Dipita B, Geetha T, Balamurugan P, et al. Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant properties of some food dyes. *Food Sci. Biotechnol* 2011; 20 (1): 7-13.
 5. Tibodeau JD, Isham CR, Bible KC. Annatto constituent cis-bixin has selective antimyeloma effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Antioxidant & Redox Signaling* 2010; 13, 987-997.
 6. Hojjati Bonab Z, Nikkhah E. Evaluation of antioxidant and antibacterial effect of methanolic extract from thyme (*Thymus vulgar*), Senna (*Cassia angustifolia*) and licorice (*Glycyrrhiza glabra*). *Journal of Shahed University* 2012; 19 (100): 1-11. (Persian)
 7. Chowdhury AI, Molla AI, Sarker M, Rana AA, Ray SK, Nur HP, Karim MM. Preparation of edible grade dye and pigments from natural source *Bixa Orellanae* Linn. *International Journal of Basic & Applied Sciences* 2006; 10 (4): 7-22.
 8. Burt S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods, a Review.

annatto (norbixin) against several pathogenic bacteria. Journal of food science & technology 2012; 35 (9): 17-23. (Persian)

properties of commercial annatto (*Bixa orellana* L.) extracts, a natural food colorant (UMI number: 3112464). University of Maryland; 2003.

17. Sahari MA, Zarringhalami S, Sattari M. Evaluation of antibacterial effect of

Cite this article as:

Yolmeh M, Habibi Najafi MB, Hosseini F, Shahabadi S. Evaluation of antibacterial activity of annatto dye on *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus subtilis*. *Sadra Med Sci J* 2014; 2(3): 307-314.