

بررسی اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر روی میزان رشد سالمونلا تیفی موریوم در سوب جو تجاری

میرحسن موسوی^{۱*}, افشین آخوندزاده‌بستی^۲, علی میثاقی^۳, حسین جباری خامنه^۴, گیتی کریم^۵, نقی زهرایی صالحی^۶

- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز
 - دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
 - استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
 - استادیار، گروه آمار، دانشکده علوم ریاضی، دانشگاه تبریز، تبریز
 - استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
 - استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
- * آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی
صندوق پستی: ۵۱۶۶۱۴۷۷۹، تلفن: ۰۴۱۱ ۳۳۹۲۳۷۷، نمبر: ۰۴۱۱ ۳۳۵۷۸۳۴

پست الکترونیک: mhmoosavy@lycos.com

تاریخ تصویب: ۸۸/۶/۳۱

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۲۲

چکیده

مقدمه: با وجود پیشرفت‌های صورت گرفته در بهداشت کشتارگاه و تکنیک‌های تولید مواد غذایی، اینمی مواد غذایی یک موضوع مهم بهداشت عمومی محسوب می‌شود. از طرف دیگر سازمان بهداشت جهانی اخیراً برای کاهش وقوع بیماری‌های قلبی-عروقی، کاهش مصرف نمک در سطح جهانی را مطرح نمودند. در صورتی که میزان نمک در غذاهای فرآیند شده کاهش یابد برای سالم نگهدارتنمود احتمالاً به افزودنی‌های دیگری نیاز خواهد بود. اسانس‌های گیاهی احتمالاً یکی از افزودنی‌های طبیعی است که می‌توان به عنوان افزودنی‌های ضدباکتری استفاده کرد.

هدف: بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس گیاه آویشن شیرازی بر روی رشد سالمونلاتیفی موریوم در سوب جو تجاری بود.

روش بررسی: ابتدا اسانس این گیاه با دستگاه^۱ GC/MS تجزیه و اجزای شیمیایی عمدۀ آن شناسایی شد. فعالیت ضدباکتریایی اسانس بر روی رشد باکتری سالمونلاتیفی موریوم در سوب جو تجاری متاثر از غلظت‌های مختلف (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳) درصد آویشن شیرازی در دو درجه حرارت ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۲۱ روز بررسی شد.

نتایج: فعالیت ضدباکتریایی اسانس آویشن شیرازی بر روی میزان رشد سالمونلاتیفی موریوم معنی‌دار ($p < 0/001$) و ضریب همبستگی غلظت اسانس بالگاریتم تعداد باکتری مورد مطالعه برابر با $40/0 - 0/40$ بود.

نتیجه گیری: اسانس گیاه آویشن شیرازی احتمالاً قادر است به عنوان یک نگهدارنده مناسب علیه بعضی باکتری‌های پاتوژن غذایی در برخی از مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

گل واژگان: اسانس، آویشن شیرازی، سالمونلاتیفی موریوم، سوب جو

¹ Gas Chromatography-Mass Spectrometry

مقدمه

گیاهان، خاک، آب و مواد در حال فساد یافت می‌شوند. بعضی از اعضای این خانواده مانند سالمونلا، شیگلا و یرسینیا بیماری‌زا می‌باشند.

در تحقیق حاضر اثر آویشن شیرازی در دو دمای ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر میزان رشد باکتری سالمونلا تیفی موریوم در مدت ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش

مطالعه اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی میزان رشد سالمونلا تیفی موریوم در سوب جو تجاری متاثر از غلظت‌های مختلف (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) اسانس در درجات حرارت ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ روز بود.

اسانس گیاه آویشن شیرازی

گیاه آویشن شیرازی از استان فارس در فصل تابستان جمع‌آوری و نام علمی آن توسط هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تایید شد. پس از تهیه اسانس گیاه به روش تقطیر با آب از سرشاخه‌های هوایی گیاه، آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی^۱ انجام شد. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده از نوع Termoquest Finngan با ستون مویینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میکرومتر، ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر و با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه بود. دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه و سرعت گاز هلیم ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه و انرژی یونیزاسیون شناساگر EI ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود.

اسانس‌ها تقریباً از قرن سیزدهم تولید و عرضه می‌شده است، ولی استفاده از آنها تا قرن شانزدهم به صورت وسیع در نیامده بود. نخستین بار دلاکروکس^۱ در سال ۱۸۸۱ اولین اندازه‌گیری جهت تعیین خواص آنتی‌میکروبیال اسانس‌ها را انجام داد. سرانجام در قرون ۱۹ و ۲۰ استفاده از خواص طعمی و بویی اسانس‌ها بر مصارف پزشکی آنها ارجحیت یافت. بیشترین استفاده از این مواد مربوط به کشورهای عضو اتحادیه اروپا می‌شود. این موارد شامل صنایع آرایشی، بهداشتی و عطرها، مصارف طبی و دارویی به عنوان ضدمیکروب و ضدغذوی کننده و برای بهبود طعم داروها می‌باشد. از خواص ضدمیکروبی اسانس‌ها نیز استفاده می‌شود که می‌توان به مواد پرکننده دندان، ضدغذوی کننده‌ها و مکمل‌های غذایی برای دامها اشاره کرد [۱].

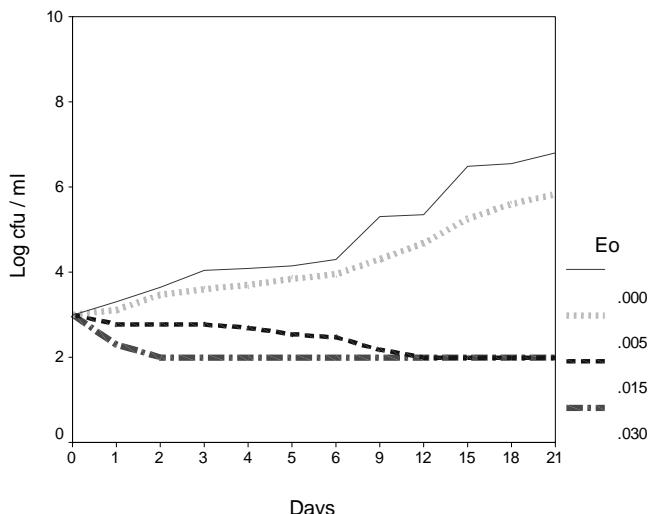
عموماً اسانس‌ها بیرنگ می‌باشند به ویژه زمانی که تازه تهیه شده باشند ولی با گذشت زمان به دلیل اکسیداسیون و رزینی شدن، رنگ آنها تیره می‌شود. برای اینکه مانع این گونه تغییرات شد باید اسانس‌ها را در جای خشک، خنک و در ظروف درسته و تیره از جنس شیشه نگهداری نمود. انواعی از گیاهان شناسایی شده‌اند که حاوی انواع فراوانی از پلی‌ساقاریدهای تعدیل‌کننده ایمنی می‌باشند. بررسی‌ها حاکی از آن است که بیشتر این ترکیبات به دلیل فعل نمودن سیستم ایمنی میزبان، بیشتر خاصیت ضدتوموری و ضدمیکروبی دارند تا اثرات سمی داشته باشند [۲،۳،۴].

برای کاربردی کردن مصرف اسانس‌های گیاهی به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی، بررسی اثرات ضدمیکروبی آنها به تنهایی و توأم با عوامل موثر دیگر (مانند درجه حرارت نگهداری، pH و غیره) در رشد باکتری‌های بیماری‌زا منتقل شده از غذا و میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی در مدل‌های آزمایشگاهی و مدل‌های غذایی ضرورت دارد. سالمونولاها از باکتری‌های خانواده آنتروباکتریا سه بوده که در دستگاه گوارش انسان، حیوانات و حشرات و نیز در

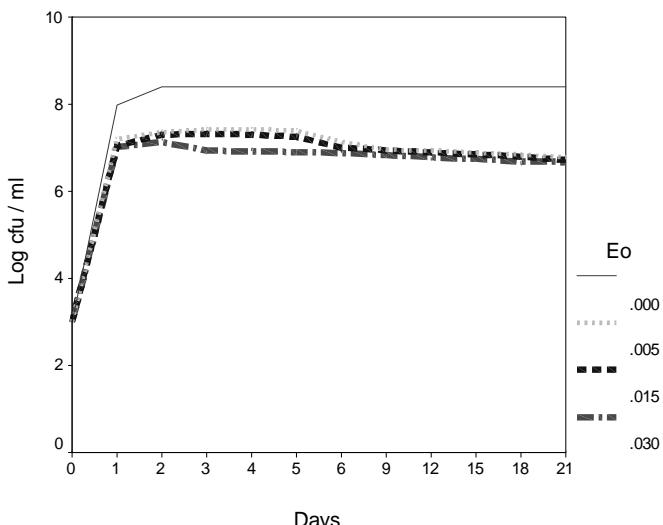
^۱ GC/MS

^۱ Delacroix





نمودار شماره ۱- رفتار سالمونلا تیفی موریوم در دمای ۸ درجه سانتی گراد در سوپ جو با چهار دوز (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) اسانس آویشن شیرازی در طی ۲۱ روز



نمودار شماره ۲- رفتار سالمونلا تیفی موریوم در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در سوپ جو با چهار دوز (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) اسانس آویشن شیرازی در طی ۲۱ روز

سترون در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد تا در طول مطالعه مورد استفاده قرار گیرد.

باکتری مورد مطالعه

باکتری مورد استفاده در این بررسی سالمونلاتیفی موریوم فاژ تایپ ۲ (تایید شده توسط انتیتیو پاستور فرانسه) بود. ابتدا کشت لیوفیلیزه باکتری در محیط آبگوشت قلب و مغز در ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت دو مرتبه به طور متوالی تجدید کشت شد. در مرحله بعد کشت ۱۸ ساعته دوم به نسبت پنج به یک با گلیسروول استریل مخلوط و در حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتر داخل لوله‌های کوچک اپندورف

آماده‌سازی باکتری برای تلقیح

آماده‌سازی باکتری برای تلقیح با انتقال باکتری از لوله کوچک اپندورف سترون به محیط آبگوشت قلب و مغز و نگهداری آن به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گرفت. مجدداً کشت دومی از کشت ۱۸ ساعته اول در محیط

ارزیابی رشد باکتری

در طول مدت ۲۱ روز نگهداری سوبستراها در دو دمای ۸ و ۲۵ درجه سانتی گراد ۱۲ بار در روزهای ۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ و ۲۱ از همه سوبستراها در شرایط سترون نمونه برداری انجام گرفت [۷] و با استفاده از لوله های رقت حاوی ۹ میلی لیتر آب پیتوونه (یک در هزار) استریل سریال های رقت ۱۰ تایی تهیه و در محیط آگار قلب و مغز به روش سطحی^۱ کشت داده شد. شمارش باکتریایی پس از گرمخانه گذاری پلیت ها در ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام می گرفت و نتایج در فرم های مربوط ثبت می شد.

آنالیز آماری

برای آنالیز آماری داده ها از نرم افزار SPSS 15.0 استفاده شد. بدین ترتیب جهت بررسی اثر متغیرهای مستقل (مقادیر مختلف اسانس، درجه حرارت و مدت زمان نگهداری) بر روی متغیر وابسته (لگاریتم تعداد باکتری) از آزمون آنالیز واریانس و برای بررسی اثر متقابل متغیرهای مذکور از آنالیز واریانس دو طرفه استفاده شد.

نتایج

نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این تحقیق نشان داد بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس، کارواکرول^۲ بوده که به میزان ۷۱/۱۲ درصد است (جدول شماره ۱).

آنالیز آماری اثر غلظت های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر متغیر وابسته بر حسب^۳ cfu/ml نشان داد که به طور کلی مقادیر مختلف اسانس، بر میزان رشد باکتری مورد مطالعه تاثیر معنی داری داشت ($P < 0.001$) بدین صورت که با افزایش غلظت اسانس، لگاریتم تعداد باکتری در شرایط یکسان کاهش می یافتد. بیشترین رشد باکتری در گروه کنترل و کمترین آن در غلظت ۰/۰۳ درصد اسانس مشاهده شد و

آبگوشت قلب و مغز دیگر (در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت) تهیه شد. از کشت ۱۸ ساعته دوم، مقادیر مختلفی به لوله های کووت^۴ ۱ حاوی ۵ میلی لیتر محیط آبگوشت قلب و مغز استریل اضافه شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر^۵ جذب نوری آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. همزمان با عمل فوق با نمونه برداری از محتويات لوله های کووت، شمارش باکتریایی انجام گرفت و در نهایت لوله کووتی که تقریباً حاوی ۱۰^۰ باکتری در هر میلی لیتر بود، مشخص شد. در طول انجام مطالعه با استفاده از مشخصات جذب نوری لوله کووت مذکور و انجام محاسبات ریاضی، دوز تلقیح در هر بار تلقیح به سوبسترا تعیین می شد [۵، ۶].

آماده سازی سوبسترا

هر بسته سوپ جو تجاری تولیدی شرکت مهندام در یک لیتر آب مقطر حل شد و به مدت بیست دقیقه در دمای جوش حرارت داده شد، سپس سوپ به دست آمده در ظروف شیشه ای در پیچ دار حاوی مگنت (در هر یک به میزان ۴۰ میلی لیتر) پخش شد و در اتوکلاو (۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) سترون شدند. پس از سترون و خنک شدن شیشه های حاوی سوپ، غلظت های مورد نظر اسانس به آنها اضافه شد.

تلقیح باکتری به سوبسترا

برای این منظور ابتدا باکتری موردنظر که در میکروتیوب اپندرف در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می شد به محیط آبگوشت قلب و مغز متقل و در ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد. گرمخانه گذاری با شرایط فوق مجدد از کشت ۱۸ ساعته اول به عمل آمد. سپس با استفاده از مشخصات جذب نوری (در طول موج ۶۰۰ نانومتر) لوله کووتی که مشخص کننده حدود ۱۰^۰ باکتری در هر میلی لیتر بود با محاسبات ریاضی مقدار معینی از محتويات لوله کووت را برداشت نموده و به سوبسترا تلقیح می شد تا ۱۰^۳ باکتری در هر میلی لیتر سوبسترا به دست آید.

¹ Surface plate

² Carvacrol

³ Colony forming unit per milliliter

¹ Cuvett

² Spectrophotometer (Milton Roy Company, USA)



جدول شماره ۱- نتایج آنالیز اسانس آویشن شیرازی مورد مطالعه با استفاده از GC/MS

درصد	اندیس بازدارنده	نام ترکیب
۰/۱۹	۹۳۰	Thujene
۴/۲۶	۹۳۷	Alpha-Pinene
۰/۴۳	۹۷۶	Beta-Pinene
۰/۸۵	۹۸۵	Beta-myrcene
۲/۳۷	۱۰۲۴	Eucaliptol
۷/۳۴	۱۰۵۵	Gama-Terprinene
۰/۶۸	۱۰۹۰	Linalool
۰/۴۷	۱۲۳۶	Thymol methyl ether
۰/۴۶	۱۲۴۳	Carvacrol methyl ether
۷۱/۱۲	۱۲۹۹	Carvacrol
۰/۴۱	۱۴۱۸	Trans-Caryophyllen
۲/۳۲	۱۵۸۲	Globulol
۹۱/۹۰	-	جمع

اسانس گیاهی مورد آزمایش در این بررسی اسانس گیاه آویشن شیرازی می‌باشد که بومی ایران، افغانستان و پاکستان بوده و به خانواده نعناع تعلق دارد. این خانواده جزو گیاهان دارویی طبقه‌بندی شده است. در ارتباط با اثرات ضدبacterیایی اسانس‌های گیاهی خانواده نعناع و برخی از ترکیبات شناخته شده مهم در اسانس‌های این خانواده از جمله کارواکرول و تیمول تحقیقات مختلفی انجام گرفته است که نشان‌دهنده اثرات قوی ضدمیکروبی این اسانس‌ها می‌باشد [۱۶، ۱۸، ۱۹، ۲۷].

همچنین محققین رشتۀ‌های مختلف پژوهشی و میکروبیولوژی برخی از اثرات اسانس آویشن شیرازی را نیز مورد مطالعه قرار داده‌اند اما در زمینه مواد غذایی و پاتوژن‌های غذایی مطالعات زیادی انجام نگرفته است [۲۰ - ۲۶]. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، دمای انکوباسیون بر میزان رشد باکتری سالمونلاتیفی موریوم تاثیر معنی‌داری دارد بدین معنی که با افزایش دمای انکوباسیون میزان رشد باکتری در شرایط یکسان افزایش می‌یابد. این موضوع توسط بسیاری از محققین دیگر نیز نشان داده شده است. از این رو در بسیاری از مطالعات حفظ دما در درجات پایین را در طی مراحل عمل‌آوری و نگهداری غذا از بهترین راه‌های سلامت آن و جلوگیری از رشد و تکثیر این میکروب‌ها می‌دانند [۲۷].

اختلاف در میزان رشد بین غلظت‌های مختلف اسانس از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$).¹

مدت زمان نگهداری بر لگاریتم تعداد سالمونلاتیفی موریوم تاثیر آماری معنی‌داری داشت ($p < 0.001$). بیشترین رشد مربوط به روز بیست و یکم بود. اختلاف رشد باکتری بین روزهای صفر و سایر روزها معنی‌دار بود ($p < 0.01$). اما بین سایر روزها اختلاف آماری معنی‌داری از نظر میزان رشد باکتری دیده نشد. ضریب همبستگی مدت زمان نگهداری با لگاریتم تعداد باکتری سالمونلاتیفی موریوم بسیار کم و برابر با 0.077 بود.

اثرات تداخلی متغیرهای مورد مطالعه بر یکدیگر به صورت دو تایی روی لگاریتم تعداد باکتری معنی‌دار بود ($p < 0.01$).²

بحث

طبق گزارش‌های معتبر موجود در منابع علمی، ترکیبات متنوعی از گیاهان، ادویه‌ها، میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها، پوست درختان و بافت‌های حیوانی دارای خواص ضدمیکروبی می‌باشند [۱۱، ۱۰، ۲۸، ۹، ۱].

یکی از ترکیبات طبیعی، اسانس‌های گیاهی هستند که مطالعات فراوانی توسط محققین روی اثرات ضدمیکروبی و نگهدارندگی آنها انجام گرفته است [۱۵ - ۱۲].



احتمالی این اثرات را میزان بالای کارواکرول موجود در انسانس اعلام کردند [۱، ۱۶، ۳۰].

کیم^۲ و همکاران در سال ۱۹۹۵ اثرات ضدبacterیایی کارواکرول را بر روی سالمونلاتیفی موریوم مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که کارواکرول اثرات ضدبacterیایی قوی بر روی باکتری فوق دارد [۱، ۱۶].

بگمبولا^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثرات ضدmikrobiی انسانس آویشن و ترکیبات کارواکرول و تیمول را بر روی باکتری شیگلا مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند که ترکیبات مذکور دارای اثر باکتریسیدی قوی بر روی باکتری مورد مطالعه دارد [۳۱، ۳۲].

با توجه به اینکه کارواکرول ترکیب اصلی و بیشترین جزء تشکیل دهنده (۷۱/۱۲ درصد) انسانس به دست آمده از آویشن شیرازی مورد مطالعه ما است لذا چنین نتیجه گیری می‌توان نمود که احتمالاً اثر جلوگیری از رشد انسانس مذکور در غلظت‌های مورد بررسی نیز تا حد زیادی به علت میزان بالای کارواکرول موجود در انسانس باشد.

نتایج آنالیز آماری نشان می‌دهد که غلظت انسانس با دمای انکوباسیون تأثیر متقابل معنی‌داری را بر روی رشد باکتری فوق دارد بنابراین استفاده از غلظت‌های انسانس به همراه درجه حرارت مناسب نگهداری می‌تواند اثر ممانعت‌کنندگی مناسبی را بر روی رشد باکتری مورد بررسی ایجاد نماید.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر تامین اعتبار این پژوهه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

¹ Karaman

² Kim

³ Bagamboula

در این مطالعه نیز دمای انکوباسیون بالاترین ضریب همبستگی را با میزان رشد باکتری مورد بررسی داشت که نشانگر آن است که درجه حرارت نگهداری مهم‌ترین عامل تاثیرگذار بر روی میزان رشد باکتری مذکور می‌باشد.

دامنه رشد سالمونلاتیفی موریوم ۴۵ - ۶/۲ درجه سانتی گراد ذکر شده است. این میکرووارگانیسم در دمای اتفاق به خوبی رشد می‌کند، اما اپتیمم آن حدود ۳۷ درجه سانتی گراد می‌باشد [۲۸].

بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر، مقادیر مختلف انسانس آویشن شیرازی، بر میزان رشد سالمونلاتیفی موریوم تأثیر معنی‌داری دارد (۰/۰۰۱ < p) بدین معنی که با افزایش غلظت انسانس، لگاریتم تعداد باکتری مورد بررسی در شرایط یکسان کاهش می‌یابد.

در یک مطالعه، فعالیت ضدقارچی عصاره تعدادی از گیاهان ایرانی از جمله آویشن شیرازی به وسیله سرداری در سال ۱۹۹۸ بر روی برخی از قارچ‌ها نظری آسپریژیلوس، کاندیدا و کرپیتوکوکوس مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که عصاره آویشن شیرازی جزو مؤثرترین عصاره‌های مورد مطالعه در این بررسی بر روی قارچ‌های مذکور می‌باشد [۲۹].

ضریب همبستگی غلظت انسانس با لگاریتم تعداد باکتری سالمونلاتیفی موریوم ۰/۴۰۲ بود. این موضوع نشانگر اثر مهارکنندگی خوب انسانس بر روی باکتری مورد مطالعه است این یافته با مطالعات سایر محققین که انسانس‌های گیاهی و ترکیب آنها را روی باکتری‌ها بررسی کرده‌اند، مطابقت دارد.

در مطالعه انجام شده توسط کرامن^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۱ اثرات باکتریواستاتیکی قوی انسانس آویشن بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده شد آنها علت

منابع

1. Bart S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 94: 223 -53.
2. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Rev.* 1999; 12: 564 – 582.

3. Paulsen BS. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. *Current Organic Chem.* 2001; 5: 939 – 50.
4. Tzianbos AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structuaral aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13 (4): 523 – 33.
5. Basti AA, Misaghi A, and Khaschabi D. Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *LWT- Food Science and Technol.* 2007; 40: 973 - 81.
6. Razavilar V and Genigeorgis C. Prediction of *Listeria spp.* Growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in model broth. *Int. J. Food Microbiol.* 1998; 40: 149 - 57.
7. Thomas LV, Ingram RE, Yu S and Delves-Broughton J. Investigation of the effectiveness of Ascopryrone P as a food preservative. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 93: 319 - 23.
8. Gould GW. Method for preservation and extention of shelf life. *Int. J. Food Microbiol.* 1996; 33: 51 - 64.
9. Lemay MJ. Choquette J, Delaquis PJ, Gariepy C, Rodrigue N and Saucier L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International J. Food Microbiol.* 2002; 78 (3): 217 – 26.
10. Roler S. The Quest for Natural Antimicrobials as Novel Means of Food Preservation: Status Reports on a European Research project. *International Biodeterioration.* 1995; 333 - 45.
11. Smith-Palmer A, Stewart J and Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 2001; 18 (4): 463 - 70.
12. Amin G, Salehi Sourmaghi MH, Zahedi M, Khanavi M and Samadi N. Essential oil composition and antimicrobial activity of Oliveria decumbens. *Fitoterapia* 2005; 76 (7-8): 704 – 7.
13. Moreira MR, Ponce AG, DelValle CE and Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT – Food science and Technol.* 2005; (39): 565 - 70.
14. Pauli A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromatherapy* 2001; 11 (3): 126 – 33.
15. Yesil Celiktas O, Hames Kocabas EE, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T and Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 2007; 100 (2): 553 - 9.
16. Kim JM, Marshall MR, Cornell JA, Preston JF and Wel CI. Antibacterial activity of carvacrol, citral and Geraniol agaist *Salmonella typhimurium* in culture medium and fish cube. *J. Food Sci.* 1995; 60: 1364 – 8.
17. Marino M, Bersani C and Comi G. Impedance measurments to the antimicrobial activity of essential oils Lamiaceae and compositae. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 67: 187 - 95.
18. Nickavar B, Mojab F and Dolat-abadi R. Analysis of the essential oils of two Thymus species from Iran. *Food Chem.* 2005; 90: 609 - 11.
19. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M and Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 2005; 91 (4): 621 - 32.
20. Hosseinzadeh H, Ramezani M and Salmani GA. Antinociceptive, anti- inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss. Extracts in mice and rats. *J. Enthopharmacol.* 2000; 73: 379 - 85.
21. Jaffary F, Ghannadi A and Siahpoush, A. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract and essential oil of *Zataria multiflora*. *Fitoterapia* 2004; 75: 217 - 20.
22. Ramezani M, Hosseinzadeh H and Samizadeh S. Antinociceptive effects of *Zataria multiflora*



- Boiss. Fractions in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 91: 167 - 70.
- 23.** Sardari H, Ghannadi A and Takei-bavani M. Effects of *Zataria multiflora* and *Carum carvi* essential oils and hydroalcoholic extracts of *Passiflora incarnata*, *Berberis integerrima* and *Crocus sativus* on rat isolated uterus contractions. *International J. Aromatherapy* 2003; 13: 21 - 127.
- 24.** Shaiq Ali M, Saleem M, Akhtar F, Jahangir M, Parvez M and Ahmad VU. Three p-cymene derivatives from *Zataria multiflora*. *Phytochem.* 1999; 52: 685 - 8.
- 25.** Shaiq Ali M, Saleem M, Ali Z and Ahmad VU. Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). *Phytochem.* 2000; 55: 933 - 6.
- 26.** Valero M and Giner MJ. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *International J. Food Microbiol.* 2006; 106 (1): 90 - 4.
- 27.** Yang S, Yu R and Chou C. Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella spp.* and *staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin in egg products. *International J. Food Microbiol.* 2001; 63: 99 - 107.
- 28.** Jay MJ. Modern Food Microbiology. 6th ed. Chapman and Hall. Newyork. 2000, pp: 441 - 56.
- 29.** Sardari H, Amin G, Micetich RG and Daneshtalab M. Antifungal activity of selected Iranian and Canadian plants. *Pharmacological. Biol.* 1998; 36 (3): 180 - 8.
- 30.** Karaman S, Digrak M, Ravid U and Ilcim A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of thymus revolutus Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 76: 183 - 6.
- 31.** Bagamboula CF, Uyttendaele M and Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* 2004; 21: 32 - 42.
- 32.** Rasooli I and Mirmostafa SA. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *thymus sepyllum* essential oils. *Fitoterapia* 2002; 73: 244 - 50.