

## بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه آویشن شیرازی و نایسین به تنهایی و ترکیبی با یکدیگر بر علیه لیستریا مونوسیتوزن در آبگوشت قلب - مغز

محمد رهنما<sup>۱</sup>، سید مهدی رضوی روحانی<sup>۲</sup>، حسین تاجیک<sup>۳</sup>، فرحناز خلیقی سیگارودی<sup>۴\*</sup>، محمود رضازادباری<sup>۵</sup>

۱- دستیار، گروه بهداشت کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۲- استاد، گروه بهداشت کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۳- دانشیار، گروه بهداشت کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۴- استادیار پژوهش، گروه فارماکولوژی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران

۵- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

\* آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، خیابان فخررازی، خیابان ژاندارمری شرقی، شماره ۷۲،

طبقه سوم، صندوق پستی: ۱۴۴۶ - ۱۳۱۴۵، تلفن و نمابر: ۶۶۴۹۱۵۶۴ (۰۲۱)

پست الکترونیک: khalighi@imp.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۸/۸/۲۴

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۱

### چکیده

مقدمه: در صنایع غذایی حفظ کیفیت به همراه افزایش زمان ماندگاری از طریق کاهش، حذف یا کنترل عوامل میکروبی بیماری‌زا یا عامل فساد مواد غذایی صورت می‌گیرد. با توجه به اثبات بسیاری از اثرات زیان‌بار نگهدارنده‌های شیمیایی و نگرانی عمومی در این خصوص، بحث جایگزینی آنها با انواع ترکیبات طبیعی نظیر اسانس‌های گیاهی و آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی افزایش یافته است و انجام این مطالعات ابتدا در مدل‌های آزمایشگاهی و سپس در مدل‌های غذایی در این رابطه لازم و ضروری به نظر می‌رسد. هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی و تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس آویشن شیرازی و نایسین به تنهایی و به صورت ترکیبی بر لیستریا مونوسیتوزن در محیط آبگوشت قلب- مغز بود. تعیین نوع اثر متقابل و همراهی نایسین و اسانس آویشن شیرازی نیز بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه غلظت اسانس آویشن شیرازی ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، و نایسین ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نایسین در درجه حرارت ۱۵ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۵ بررسی شد.

نتایج: اسانس آویشن شیرازی به تنهایی دارای اثرات ضد میکروبی بر لیستریا مونوسیتوزن بود (MIC:9.5 و MBC:19 میکروگرم در میلی‌لیتر). اثر متقابل اسانس آویشن شیرازی و نایسین سبب کاهش MIC و MBC شد (MIC:1.2 و MBC:2.4 میکروگرم در میلی‌لیتر).

نتیجه‌گیری: اسانس آویشن شیرازی دارای اثرات بازدارندگی بر لیستریا مونوسیتوزن می‌باشد. این اثرات به وضوح در همراهی با نایسین افزایش یافت.

کل واژگان: اسانس، آویشن شیرازی، نایسین، لیستریا مونوسیتوزن، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی، حداقل غلظت کشندگی



## مقدمه

## نایسین

باکتریوسین‌ها پروتئین‌های باکتری‌کشی هستند که تولید آنها توسط باکتری اسیدلاکتیک در سال‌های اخیر به صورت گسترده‌ای مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است. با عنایت به این واقعیت که این ترکیبات به وسیله ارگانوسم‌های مفید موجود در مواد غذایی تولید می‌شوند، عنوان طبیعی را به آنها نسبت داده لذا به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی مواد غذایی (بیونگهدارنده) مقبولیت بیشتری دارند. نایسین نوعی باکتریوسین پلی‌پپتیدی آمفی‌پاتیک دارای سی و چهار اسید آمینه می‌باشد، که توسط سوش‌های خاص لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس تولید می‌شود و مدت‌ها است که با توجه به خصوصیات ضد میکروبی آن و سمیت پایین آن برای انسان به عنوان یک ماده GARS<sup>1</sup> و نگهدارنده مواد غذایی در صنایع غذایی استفاده می‌شود [۱۶-۱۱]. تنها باکتریوسینی که با تصویب سازمان جهانی بهداشت در صنعت مواد غذایی کاربرد عملی وسیعی پیدا کرده نایسین می‌باشد [۱۷]. نایسین از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری کرده و مانع شیوع اسپوره‌های کلستریدیوم و باسیلوس می‌شود. نایسین در این باکتری‌ها با ایجاد منافذ در غشاء سلولی آنرا مختل می‌نماید و با افزایش لیپید II در غشاء باکتری حساسیت آنرا به نایسین افزایش می‌دهد [۱۸، ۱۹، ۲۰]. بررسی اثرات ترکیبی نایسین و اسانس‌ها نتایج امیدوارکننده‌ای در برداشته هرچند که این تحقیقات هنوز در مراحل ابتدایی قرار دارد [۹، ۲۱].

## آویشن شیرازی

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* Boiss. یکی از گیاهان خانواده نعنائیان<sup>۲</sup> می‌باشد که یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی است که گسترش جهانی دارد. آویشن شیرازی گیاهی پرشاخه، دارای ساقه چوبی به ارتفاع ۸۰-۴۰ سانتی‌متر بوده که به حالت وحشی و به صورت بوته‌های پرپشت در دامنه‌های خشک بین تخته‌سنگ‌های

بیماری‌های ناشی از غذا در نتیجه مصرف غذاهای آلوده به باکتری‌های عامل فساد و بیماری‌زا به طور مستقیم در سلامت جامعه نقش دارد [۱]. استفاده از مواد شیمیایی به منظور جلوگیری یا به تاخیر انداختن فساد مواد غذایی امروزه دارای کاربرد وسیعی می‌باشد. در ارتباط با اثرات سوء استفاده از مواد شیمیایی صنعتی بحث‌های قابل قبولی درخصوص سرطان‌زایی و سمیت آنها برای انسان صورت گرفته است. به این دلیل تولیدکنندگان مواد غذایی و مصرف‌کنندگان آن بایستی در استفاده از این گونه مواد نگهدارنده احتیاط نمایند [۲]. در نتیجه بالا رفتن سطح آگاهی مصرف‌کنندگان در سطح جامعه جهانی علاقه روزافزونی به استفاده از مواد نگهدارنده نظیر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی وجود دارد [۳].

اسانس‌ها مایعات روغنی معطری هستند که از اندام‌های مختلف گیاهان نظیر دانه، ریشه، جوانه، برگ، پوست، شاخه، غنچه و گل تهیه می‌شوند. که به آنها روغن‌های فرار، روغن‌های اتری و یا روغن‌های اسانسی هم می‌گویند. روش تقطیر با آب رایج‌ترین روش مورد استفاده برای تولید تجاری اسانس می‌باشد [۴]. نقش اسانس‌ها در کنترل باکتری‌های عامل فساد و بیماری‌زا و افزایش طول مدت نگهداری غذاها بسیار جالب می‌باشد. آنها بر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موثر هستند. هر چند باکتری‌های گرم منفی به دلیل دارا بودن لیپوپلی‌ساکارید در غشاء خارجی خود تا حدی مقاوم‌تر هستند [۵، ۶].

خواص ضد میکروبی اسانس‌ها عمدتاً به ترکیبات فنلی آنها مربوط می‌باشد. هر چه قدر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص ضد میکروبی آنها بیشتر است [۷، ۸]. مکانیسم اثر اسانس‌ها ورود به قسمت چربی غشاء سلولی و ایجاد اختلال در این ساختمان و افزایش خروج ترکیبات سلولی به خارج سلول می‌باشد که در سطح محدودی قابل تحمل و از آن حد به بعد مرگ‌آور می‌باشد. در مواردی اسانس‌ها بر روی آنزیم‌های مسؤوّل تولید انرژی یا سنتز ترکیبات ساختمانی سلولی نیز موثر می‌باشند [۹، ۱۰].

<sup>1</sup> Generally Recognized As Safe

<sup>2</sup> Lamiaceae



نواحی مختلف کشورهای ایران، پاکستان و افغانستان رشد می‌کند [۲۲].

تحقیقات زیادی در مورد خصوصیات بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی بر باکتریهای بیماری‌زا یا عامل فساد مواد غذایی صورت گرفته است [۲۶-۲۳، ۲۱]. کارواکرول و تیمول از عمده‌ترین ترکیبات آن می‌باشند. ترکیب اسانس‌های به دست آمده براساس جغرافیای منطقه، فصل برداشت گیاه، عملیات کشاورزی، فاصله بین گیاهان کاشته شده و مرحله رشد متفاوت می‌باشد. ترکیب اسانس به دست آمده از بخش‌های مختلف یک گیاه خاص نیز می‌تواند متفاوت باشد [۴، ۲۷، ۲۸]. اسانس این گیاه خاصیت ضدباکتری و ضدقارچی دارد و سیستم ایمنی را نیز تحریک می‌کند. از این گیاه برای درمان گرفتگی عضلات، دردهای رماتیسمی، گزیدگی حشرات، ضدعفونی کردن زخم‌ها، نفخ و امراض جلدی استفاده می‌شود [۲۹].

به منظور پاسخگویی هر چه بهتر به علاقه روزافزون مصرف‌کنندگان مواد غذایی به حذف نگهدارنده‌های شیمیایی (ضدمیکروبی) و جایگزینی آن با انواع طبیعی مثل اسانس‌های گیاهی یا آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی در مواد غذایی اثبات کاربرد و اثرات بازدارندگی (ضدمیکروبی) آنها و مطالعه این اثرات به تنهایی و توأم با یکدیگر (ترکیبی) ابتدا در مدل‌های آزمایشگاهی و سپس در مدل‌های غذایی لازم و ضروری می‌باشد [۲۱، ۲۳، ۳۰].

#### لیستریا مونوسیژن

این باکتری یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی است. که به طور معمول در طبیعت و در دستگاه گوارش بسیاری از حیوانات یافت می‌شود. این باکتری توانایی تحمل محدوده وسیع دمایی صفر تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۴/۴ تا ۹/۴ را دارد. بررسی‌های اخیر نشان داده که لیستریا مونوسیژن می‌تواند از طریق مصرف غذای آماده به انسان منتقل شود عفونت غذایی ناشی از این باکتری بسیار مهم است، چون منجر به عوارضی مثل مننژیت، سپتی‌سمی و سقط جنین در زنان می‌شود. میزان مرگ و میر بین ۲۰ الی ۷۵ درصد می‌باشد. این باکتری قادر به رشد در

دمای یخچال بوده و گزارش‌های متعددی از نقش مواد غذایی مثل شیر و فرآورده‌های آن (خصوصاً پنیر)، گوشت و محصولات آن، گوشت مرغ، تخم‌مرغ، ماهی و فرآورده‌های دریایی در ایجاد بیماری صورت گرفته است. این باکتری به فراوانی در محیط‌های مختلف طبیعت یافت می‌شود. تلاش‌های فراوانی به ویژه در کشورهای صنعتی برای کنترل آن در غذا انجام می‌گیرد [۳۱، ۳۲]. در کنترل این میکروارگانیسم استفاده از اسانس‌های گیاهی و نایسین به عنوان یکی از راه‌های جایگزینی نگهدارنده‌های شیمیایی مدنظر می‌باشد [۳۳، ۳۴].

## مواد و روش‌ها

### طرح آزمایش

بررسی اثرات اسانس گیاهی آویشن شیرازی با غلظت ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به تنهایی و به صورت ترکیبی با نایسین با غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و در محیط آبگوشت قلب- مغز که با بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی صورت می‌گیرد.

### مواد گیاهی

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* Boiss. از استان فارس در تابستان ۱۳۸۶ تهیه و توسط هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تایید نام علمی شد. سپس گیاهان جمع‌آوری شده در سایه خشک شد.

### تهیه اسانس

ابتدا اندام‌های هوایی گیاه خشک شده توسط آسیاب برقی خرد شد. ۱۰۰ گرم از پودر گیاه پس از توزین توسط دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب به مدت ۴ ساعت اسانس‌گیری شد. بازده اسانس ۱ درصد وزنی- وزنی محاسبه شد. اسانس توسط سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری و در ظرف در بسته تیره رنگ دور از نور و در یخچال نگهداری شد.



## شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس

اسانس گیاه مورد نظر پس از آماده سازی، به دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) تزریق شد تا نوع ترکیبات تشکیل دهنده آن مشخص شود. دستگاه گاز کروماتوگراف استفاده شده از نوع Hewlet Packard 6890N با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم شد: دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سانتی گراد، توقف در این دما ۶ دقیقه و دمای انتهایی ۲۴۰ درجه سانتی گراد و گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و توقف در این دما به مدت ۳ دقیقه بود. دمای اتاقت تزریق ۲۹۰ درجه سانتی گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی متر در دقیقه استفاده شد. طیف سنج جرمی مورد استفاده مدل Hewlet Packard 5973N با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی گراد بود. شناسایی طیف ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت و نرم افزار مورد استفاده Wiley بود [۳۷-۳۵].

## نایسین

نایسین حاوی ۲/۵ درصد نایسین فعال از کمپانی SIGMA-ALDRICH خریداری شد. نایسین استوک با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۰۲ مول در لیتر با pH برابر با ۱/۶ تهیه شد و به وسیله میکروفیلتر استریلیزه یک بار مصرف و سرنگ فیلتر شد [۲۱].

## آزمایش ارگانیسیم

کشت لیوفیلیزه لیستریا مونوسیژن ATCC 19118 تهیه شده از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی تهران جهت این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا این کشت لیوفیلیزه در محیط آبگوشت قلب- مغز (Merck, KGaA,

Darmstadt, Germany) در ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت دو مرتبه به طور متوالی تجدید کشت داده شد و در این محیط به مدت ۱۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. در مرحله بعد این محیط ها در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد و به صورت ماهانه نگهداری شد [۲۱،۲۳].

## تهیه سوسپانسیون باکتریایی

یک کلنی از باکتری به محیط آبگوشت BHI منتقل شد و گرمخانه گذاری به مدت ۱۸ ساعت و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد صورت گرفت. مجدداً کشت دومی از این کشت ۱۸ ساعته اول با انتقال ۰/۰۱ میلی لیتر، در آبگوشت BHI دیگر (به مدت ۱۸ ساعت، ۳۵ درجه سانتی گراد) تهیه شد. سپس لوله های حاوی ۵ میلی لیتر آبگوشت BHI استریل تهیه شد. در مرحله بعد مقادیر مختلفی از کشت آبگوشت BHI ۱۸ ساعت دوم به لوله های مختلف منتقل شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری لوله های مذکور خوانده شد. همزمان با عمل فوق نمونه برداری از محتویات این لوله ها صورت گرفته و شمارش باکتریایی به روش Pour Plate انجام شد و در نهایت لوله ای که حاوی  $1 \times 10^7$  باکتری در هر میلی لیتر بود، مشخص شد. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش از رقت های با جذب نوری معادل  $1 \times 10^7$  باکتری در هر میلی لیتر استفاده می شد که بعد با شمارش باکتری با روش Pour Plate تایید می شد. سپس از این لوله، رقت های ده، دهی تهیه تا دوز تلقیح در محلول نهایی که محتوی  $1 \times 10^5$  باکتری در هر میلی لیتر بود، تهیه شد [۲۱،۲۳].

## آماده سازی محیط سوبسترا

۹/۵ گرم پودر BHI در ۲۳۵ میلی لیتر آب مقطر در یک فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری درب دار به وسیله حرارت ملایم حل شد. برای ایجاد پایداری امولسیون آب و روغن در محیط برات طی این مطالعه از روش شرح داده شده به وسیله بستی (۲۰۰۷) استفاده شد. به طور خلاصه دی متیل سولفوکسید



ردیف ضمن بررسی کدورت، کشت باکتریایی<sup>۱</sup> از تمامی لوله‌ها بر روی آگار<sup>۲</sup> صورت گرفت و بر اساس میزان اولیه تلقیح حداقل غلظت بازدارندگی<sup>۳</sup> و حداقل غلظت کشندگی<sup>۴</sup> مشخص شد. MBC در پلیتی که cfu کمتر از ۰/۱ درصد جمعیت اولیه میکروبی داشته باشد، مشخص شد [۳۸].

## نتایج

نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از GC/MS در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول آمده، از بین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس ۹۹/۸ درصد ترکیبات شناسایی شدند که از این میان بیشترین دسته ترکیبات مربوط به مونوترپن‌های اکسیژنه (۵۷/۹ درصد)، سپس هیدروکربن‌های مونوترپنی (۳۳/۰ درصد)، هیدروکربن‌های سزکویی‌ترپنی (۶/۶ درصد) و سزکویی‌ترین‌های اکسیژنه (۰/۴ درصد) می‌باشد. همچنین ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس شامل کارواکرول (۲۳/۰ درصد)، تیمول (۱۷/۷ درصد)، گاما- ترپین (۹/۰ درصد)، پارا- سیمن (۷/۹ درصد)، کارواکرول متیل اتر (۵/۹ درصد) و آلفا- پینن (۵/۲ درصد) می‌باشند.

تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس به تنهایی و در همراهی با نایسین با بررسی MIC و MBC به دست آمد. نتایج نشان داد که اثرات بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی در همراهی با نایسین به وضوح افزایش می‌یابد (جدول شماره ۲).

## بحث

امروزه در خصوص اثرات بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی و اسانس‌های گیاهی مطالعات زیادی صورت می‌گیرد که نشان‌دهنده تلاش درخصوص حذف نگهدارنده‌های شیمیایی و به کارگیری نگهدارنده‌های طبیعی می‌باشد [۷، ۲۴، ۳۰]. اسانس‌های گیاهان از منابع مفید ترکیبات ضد میکروبی می‌باشند [۷]. باید توجه داشت اجزای اسانس‌های

۵ درصد به عنوان امولسیون‌کننده و آگار ۰/۰۵ درصد (به عنوان تثبیت‌کننده) به محیط کشت اضافه شد. اندازه‌گیری pH به وسیله دستگاه pH متر صورت گرفت. سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو صورت گرفت. در مرحله بعد با استفاده از لوله‌های درب‌دار استریل، به هر لوله پنج میلی‌لیتر محیط Broth (BHI) حاوی DMSO و آگار - آگار اضافه می‌شود.

سپس اسانس با غلظت ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در ردیف ده‌تایی و به روش Two-fold اضافه می‌گردید. به گونه‌ای که هر لوله حاوی محیط BHI broth، DMSO، آگار - آگار و اسانس با غلظت و رقت مدنظر باشد. لازم به ذکر است، pH آبگوشت حاوی اسانس در انتها در شرایط استریل مجدداً کنترل شد و هیچ تغییر روشنی مشاهده نشد. در هر ردیف از این آزمایش‌ها کنترل مثبت و منفی لحاظ شد و به این ترتیب محیط آماده تلقیح باکتری شد. لازم به ذکر است. در مرحله بررسی اثرات ترکیبی نایسین و اسانس آویشن شیرازی غلظت نایسین ثابت و اسانس آویشن شیرازی به روش Two-fold اضافه شد. pH آبگوشت قلب - مغز حاوی نایسین و اسانس دوباره اندازه‌گیری شد و هیچ تغییر روشنی دیده نشد [۲۱].

مطابق روش توضیح داده شده، با استفاده از لوله کووت محتوی تقریباً  $1 \times 10^7$  باکتری در هر میلی‌لیتر (با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر) و رقت‌سازی سریالی، دوز تعیین شده  $1 \times 10^5$  cfu/ml تهیه و به لوله‌های حاوی محیط آبگوشت قلب - مغز، اسانس آویشن شیرازی - دی‌متیل‌سولفوکساید و آگار - آگار اضافه می‌شود. در مرحله بررسی اثرات ترکیبی نایسین و اسانس آویشن شیرازی باکتری با دوز  $1 \times 10^5$  cfu/ml به لوله‌های حاوی محیط آبگوشت قلب و مغز، اسانس آویشن شیرازی، نایسین، دی‌متیل‌سولفوکساید و آگار - آگار اضافه می‌شود [۲۱].

## بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی

در مرحله بعد این لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. در خاتمه در هر

<sup>1</sup> Pour Plate  
<sup>3</sup> MIC

<sup>2</sup> BHI  
<sup>4</sup> MBC



جدول شماره ۱- نتایج آنالیز اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) مورد مطالعه با استفاده از GC-MS

درصد	اندیس بازداری نمونه	اندیس بازداری منابع	نام ترکیب	ردیف
۱/۴	۹۳۰	۹۳۱	$\alpha$ -Thujene	۱
۵/۲	۹۳۹	۹۳۹	$\alpha$ -Pinene	۲
۰/۳	۹۵۲	۹۵۳	Camphene	۳
۱/۰	۹۸۰	۹۸۰	$\beta$ -Pinene	۴
۱/۴	۹۹۰	۹۸۶	3-Octanone	۵
۲/۹	۹۹۴	۹۹۱	Myrcene	۶
۰/۵	۹۹۹	۹۹۳	3-Octanol	۷
۰/۵	۱۰۰۷	۱۰۰۵	$\alpha$ -Phellandrene	۸
۰/۱	۱۰۱۳	۱۰۱۱	$\delta$ -3-Carene	۹
۳/۲	۱۰۲۱	۱۰۱۸	$\alpha$ -Terpinene	۱۰
۷/۹	۱۰۳۳	۱۰۲۶	<i>p</i> -Cymene	۱۱
۱/۲	۱۰۳۵	۱۰۳۱	Limonene	۱۲
۰/۹	۱۰۳۷	۱۰۳۳	1,8-Cineole	۱۳
۰/۱	۱۰۵۱	۱۰۵۰	<i>trans</i> -Ocimene	۱۴
۹/۰	۱۰۶۲	۱۰۶۲	$\gamma$ -Terpinene	۱۵
۰/۳	۱۰۷۲	۱۰۶۸	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	۱۶
۰/۳	۱۰۹۲	۱۰۸۸	Terpinolene	۱۷
۳/۶	۱۱۰۴	۱۰۹۸	Linalool	۱۸
۱/۵	۱۱۸۵	۱۱۷۷	Terpinene-4-ol	۱۹
۰/۶	۱۲۱۴	۱۱۸۹	$\alpha$ -Terpineol	۲۰
۰/۱	۱۲۲۳	۱۲۰۰	<i>trans</i> -Dihydro carvone	۲۱
۱/۱	۱۲۳۹	۱۲۳۵	Thymol methyl ether	۲۲
۵/۹	۱۲۵۲	۱۲۴۴	Carvacrol methyl ether	۲۳



ادامه جدول شماره ۱- نتایج آنالیز اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) مورد مطالعه با استفاده از GC-MS

ردیف	نام ترکیب	اندیس بازداری منابع	اندیس بازداری نمونه	درصد
۲۴	Thymol	۱۲۹۰	۱۳۱۱	۱۷/۷
۲۵	Carvacrol	۱۲۹۸	۱۳۳۱	۲۳/۰
۲۶	Thymol acetate	۱۳۵۵	۱۳۶۴	۰/۵
۲۷	Eugenol	۱۳۵۶	۱۳۷۱	۱/۰
۲۸	Carvacrol acetate	۱۳۷۱	۱۳۸۲	۱/۷
۲۹	$\alpha$ -Copaene	۱۳۷۶	۱۳۸۹	۰/۱
۳۰	$\beta$ -Caryophyllene	۱۴۱۸	۱۴۳۹	۴/۸
۳۱	Aromadendrene	۱۴۳۹	۱۴۵۵	۰/۸
۳۲	$\alpha$ -Humulene	۱۴۵۴	۱۴۶۹	۰/۳
۳۳	Viridiflorene	۱۴۹۳	۱۵۰۹	۰/۵
۳۴	Spathulenol	۱۵۷۶	۱۵۹۴	۰/۲
۳۵	Caryophyllene oxide	۱۵۸۱	۱۶۰۱	۰/۲
۳۳/۰	هیدروکربن‌های مونوترپنی			
۵۷/۹	مونوترپن‌های اکسیژنه			
۶/۶	هیدروکربن‌های سزکویی ترپنی			
۰/۴	سزکویی‌ترین‌های اکسیژنه			
۱/۹	ترکیبات دیگر			
۹۹/۸	جمع کل ترکیبات شناسایی شده			

جدول شماره ۲- بررسی اثرات اسانس بر حسب غلظت ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به تنهایی و به صورت ترکیبی با ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نایسین بر لیستریا مونوسیتوزن

نام گیاه	نایسین	لیستریا مونوسیتوزن
		MBC MIC
اسانس آویشن شیرازی	—	۱۹ ۹/۵
اسانس آویشن شیرازی	+	۲/۴ ۱/۲



آمی سیلین در مدت زمان کوتاهتری بروز و سبب جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های فوق می‌شود [۴۱].

در یک بررسی توسط باگامبویلا<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثرات ضد میکروبی اسانس آویشن<sup>۲</sup> و ترکیبات کارواکرول و تیمول بر روی باکتری‌های *Shigella flexneri* و *Shigella sonnei* تایید شد [۷].

در یک بررسی که توسط هرش-مارتینز و همکاران (۲۰۰۵) صورت گرفت، در شرایط آزمایشگاهی اسانس ۱۱ گونه گیاهی آزمایش شدند که گونه *Thymus vulgaris* اثرات ضدباکتریایی بسیار خوبی از خود نشان داد. باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه *Staphylococcus aureus*، *Salmonella enteritidis*، *Staphylococcus coagulase*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Shigella sonnei* و *Klebsiella pneumoniae* در نهایت باکتری *Streptococcus pneumoniae* بودند [۴۲].

در مطالعه دیگری توسط فوجیتا<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده شد به کارگیری اسانس آویشن شیرازی منجر به بروز خواص سینترژیستی ضد میکروبی با تتراسایکلین علیه باکتری‌ها می‌شود [۴۳]. اثرات بازدارندگی نایسین بر لیستریا مونوسیتوزن نیز در مطالعاتی جداگانه مورد تایید قرار گرفته است [۴۴-۴۶، ۱۳].

در تحقیقی که درخصوص اثرات مهاري نایسین بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوزن توسط Thomas و Wimpenny (۱۹۹۶) انجام شد، در مورد لیستریا مونوسیتوزن افزایش درصد نمک و کاهش pH سبب افزایش کارایی نایسین شد. ولی دمای انکوباسیون تاثیر مشخصی دربرنداشت [۱۳].

بونسیس<sup>۴</sup> و همکاران (۱۹۹۵) و جامونا<sup>۵</sup> و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که نایسین اثر ضد میکروبی خوبی روی لیستریا مونوسیتوزن در محیط آبگوشت قلب-مغز دارد [۴۷، ۴۸] و استفاده توام نایسین و لاکتات، نیترات یا نیتريت و پلی فسفات باعث بالا رفتن اثرات ضد میکروبی نایسین می‌شود [۴۷].

گیاهان تحت تاثیر مناطق مختلف جغرافیایی محل رشد، سن گیاه، قسمت مورد استفاده گیاه، روش اسانس‌گیری و نوع حلال به کار رفته می‌باشد. عصاره‌هایی که با روش‌ها و حلال‌های متفاوتی از یک گیاه گرفته شده، می‌تواند اثرات ضدباکتریایی متفاوتی بر روی یک باکتری خاص از خود نشان دهد [۳۹].

مقایسه نتایج گزارش شده از مطالعات مختلف تا حدی مشکل می‌باشد. که احتمالاً به دلیل روش‌های مختلف درخصوص بررسی خواص ضدباکتریایی آنها، خصوصیات متفاوت سویه‌های مختلف باکتریایی و محیط کشت مورد استفاده می‌باشد [۲۵]. در مطالعات مختلف به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی و نگهدارندگی اسانس‌های گیاهی از مدل‌های مختلفی استفاده شده است. در برخی از این روش‌ها از مدل‌های آزمایشگاهی مثل محیط کشت و در برخی دیگر از مدل‌های غذایی برای بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس‌ها استفاده شده است [۲۴، ۲۵]. در این مطالعه ما به بررسی اثرات بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری لیستریا مونوسیتوزن به تهایی و به صورت ترکیبی با نایسین و با ارزیابی MIC و MBC آنها پرداختیم. غلظت اسانس آویشن شیرازی ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و غلظت نایسین ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

در یک بررسی توسط شفيعی و جاویدنیا (۱۹۹۷) درخصوص اجزای اسانس گیاه آویشن شیرازی، کارواکرول ۲۹/۶۱ درصد و تیمول ۲۵/۱۸ درصد بالاترین درصد مواد را دارا بودند. در حالی‌که در مطالعه‌ای دیگر توسط میتاچی و همکارانش بیشترین درصد ترکیبات جدا شده از اسانس این گیاه کارواکرول با ۷۲/۱۲ درصد بوده و ترکیب تیمول در اسانس ردیابی نشده است. در بررسی ما کارواکرول ۲۲/۹۶ درصد و تیمول ۱۷/۷۳ درصد بیشترین درصد ترکیبات اسانس را شامل می‌شدند [۲۱]. گفته شده است هر چه درصد مواد فنولی بالاتر باشد اثرات ضد میکروبی بیشتر است [۴۰].

در بررسی دیگر رسولی و همکاران (۲۰۰۲) به صورت مقایسه‌ای اثرات ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی و آمپی سیلین را با روش Disk diffusion بر روی اشیریشاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی نمودند و نتیجه‌گیری نمودند که فعالیت باکتریسیدال اسانس آویشن شیرازی نسبت به

<sup>1</sup> Bagamboila

<sup>2</sup> *Thymus vulgaris*

<sup>3</sup> Fujita

<sup>4</sup> Buncic

<sup>5</sup> Jamuna



فعالیت کارواکروول و تیمول در حضور نایسین افزایش می‌یابد [۱۴،۱۵،۲۱،۴۹]. نتایج یک بررسی توسط چی ژانگ<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۴) نشان داد که استفاده توام از نایسین و کارواکروول به صورت سینرژیست عمل کرده و باعث کاهش تعداد باکتری‌های زنده لیستریا منوسیتوژن و باسیلوس سرئوس می‌شود [۱۴].

میثاقی و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند که اسانس آویشن شیرازی و نایسین هر کدام به تنهایی روی باسیلوس سرئوس موثر هستند ولی استفاده به صورت توام روی مهار باکتری حالت سینرژیست دارد. و با کاهش درجه حرارت از ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ۱۰ درجه سانتی‌گراد اثرات ضدمیکروبی هر کدام به تنهایی یا توام افزایش می‌یابد [۲۱].

این بررسی تاثیر اسانس آویشن شیرازی را به تنهایی و در همراهی با نایسین نشان می‌دهد. این همراهی به صورت سینرژیست سبب بالارفتن اثرات بازدارندگی آنها می‌شود. این نتایج مشابه به مشاهدات اتاییبی<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۰۰)، پرگو<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۰۱) و میثاقی و همکاران (۲۰۰۷) بود که به نقش بازدارندگی و ضدمیکروبی تیمول و کارواکروول اشاره کرده بودند [۱۴،۱۵،۲۱،۴۹،۵۱].

## نتیجه‌گیری

میزان غلظت اسانسی که برای اثرات بازدارندگی بر باکتری‌ها موردنیاز است بیشتر از میزان اسانسی است که جهت معطر کردن غذا استفاده می‌شود. به همین دلیل ممکن است دارای تاثیرات نامطلوب روی مزه غذا باشند. لذا استفاده از آنها به عنوان بخشی از هاردل سیستم در همراهی با سایر تکنیک‌های نگهداری از قبیل کاهش درجه حرارت گرمخانه‌گذاری، تغییرات pH و سایر مواد نگهدارنده مثل نایسین با توجه به اثرات سینرژیست آنها می‌تواند راهکار مناسبی باشد. در این حالت با کاهش غلظت اسانس موردنیاز می‌توان از تاثیر منفی آن بر روی مزه غذا تا حد زیادی جلوگیری کرد. در این مطالعه تاثیر اسانس آویشن شیرازی را

پل<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۹۹) از اسانس‌های گیاهی به همراه نایسین و استرهای دی گلیسرید اسیده‌های چرب برای مهار باکتری لیستریا منوسیتوژن استفاده نمودند. در این بین کارواکروول و تیمول موثرترین ترکیبات علیه لیستریا منوسیتوژن بودند و بعد از آنها به ترتیب اوژنول، سینامالدهید و ایزواوژنول موثر بودند. در بین استرهای دی گلیسرید اسیده‌های چرب، دی‌گلیسرول منو لورات موثرترین ترکیب علیه لیستریا منوسیتوژن بود. در استفاده توام از این ترکیبات، این مطالعه نشان داد که میتوان از نایسین و دی‌گلیسرول منولورات برای بالا بردن اثر ضدلیستریایی ترکیبات گیاهی (کارواکروول، تیمول و اوژنول) استفاده نمود که در این حالت از مقدار (دز) کمتری از اسانس گیاهی در ماده غذایی استفاده می‌شود و در نتیجه از اثرات نامطلوب اسانس گیاهی روی طعم و مزه غذا جلوگیری می‌شود [۴۹].

برای بررسی حساسیت لیستریا منوسیتوژن به نایسین مطالعه‌ای توسط یامازاهی<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۰۴) تحت شرایط زیر صورت گرفت:

۱) اضافه کردن مقدار مشخصی نایسین به محیط برات  
۲) اضافه کردن تدریجی نایسین به محیط برات با استفاده از یک پمپ

۳) استفاده توام از دو روش فوق

براساس نتایج به دست آمده تاثیر ضدمیکروبی نایسین روی باکتری لیستریا منوسیتوژن به طور قوی بستگی به روش مورد استفاده دارد. استفاده از روش ۱ و ۲ باعث مهار لیستریا منوسیتوژن می‌شود ولی در طول زمان باکتری به نایسین مقاومت پیدا می‌کند که این مقاومت در حالت استفاده از روش ۱ بیشتر از روش ۲ است. این مطالعه نشان داد که تعمیم استفاده از روش ۳ در غذا که در آن مقدار مشخصی نایسین به غذا اضافه شود و از طریق بسته‌بندی نیز نایسین به تدریج وارد غذا شود، روش مؤثری در مهار لیستریا منوسیتوژن می‌باشد [۵۰].

اخیراً بحث تشدیدکنندگی اثرات بازدارندگی اسانس‌ها در همراهی با سایر مواد ضدمیکروبی مطرح شده است. برای مثال

<sup>1</sup> Chi Zhang

<sup>2</sup> Ettayebi

<sup>3</sup> Perigo

<sup>1</sup> Pol

<sup>2</sup> Yamazahi



## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر افشین آخوندزاده بستی به دلیل نقطه نظرات ارزشمند و راهنمایی‌های لازم و آقای قاسم مهدی کارشناس محترم آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی ارومیه نهایت تشکر ابراز می‌گردد.

به تنهایی و در همراهی با نایسین نشان داده شده است. این همراهی به صورت سینرژیست سبب بالارفتن اثرات بازدارندگی آنها می‌شود. البته لازم است که قبل از استفاده از این مواد به عنوان نگهدارنده غذا مطالعات بیشتری جهت شناسایی خصوصیات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی صورت گیرد.

## منابع

1. Oussalah M, Caillet S, Saucier L and Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogens*. *Food control* 2007; 18: 414 - 20.
2. Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K and Nychas GJE. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Ital. J. Food Sci.* 2001; 13: 65 - 75.
3. Schuenzel KM and Harrison MA. Microbial antagonists of foodborne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. *J. Food Protect.* 2002; 65 (12): 1909 - 15.
4. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 94 (3): 223 - 53.
5. Singh N, Singh RK, Bhunia AK and Stroshine RI. Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 2002; 33: 720 - 9.
6. Moreira MR, Ponce AG, Delvalle CE and Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 2005; 38: 565 - 70.
7. Bagamboula CF, Uyttendaele M and Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene to wards *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *Food Microbiol.* 2004; 21: 32 - 42.
8. Kim JM, Marshall JA, Cornell JA and Preston JF. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Food Sci.* 1995; 60 (6): 1364 - 8.
9. Pol IE, Krommer J, Smid EJ. Bioenergetic cosequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2002; 3 (1): 55 - 61.
10. Holley RA and Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 2005; 22 (4): 273 - 92.
11. Smid EJ and Corris LGM. Natural antimicrobials for food preservation. In: Shafiurrahman. *Handbook of food preservation*. Marcel Dekker. New York. 1999, pp: 285 - 308.
12. Ross RP, Morgan S and Hill C. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 2002; 79: 3 - 16.
13. Thomas LV and Wimpenny JT. Investigation of the effect of combined variation in temperature, pH and NaCl concentration on Nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microb.* 1996; 62 (6): 2006 - 12.
14. Chi-Zhang Y, Yam K and Chikindas MS. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly



- released into a broth system. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 90: 15 - 22.
15. Periago PM and Moezelaar R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 68: 141 - 8.
  16. Kuwano K, Shimizu T, Nagatoshi K, Nou S and Sonomato K. Dual antibacterial mechanisms of nisin against gram-positive and gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 2005; 26: 396 - 402.
  17. Delves-Broughton J and Gasson MJ. Natural antimicrobial systems and food preservation. Cab international. Oxon. 1994, pp: 99 - 131.
  18. Breukink E, Wiedemann I, Kraaij CV, Kuipers OP, Sahi HG and Kruijff BD. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Sci.* 1999; 286: 2361 - 4.
  19. Helander IM and Sandholm MT. Permeability barrier of the gram negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *Int. J. food Microbiol.* 2000; 60: 153 - 61.
  20. Van Heusden HE, Knuijff B and Breukin E. Lipid II induce a transmembrane orientation of the pore-forming peptide antibiotic nisin. *Biochemistry* 2002; 41: 12171 - 8.
  21. Misaghi A, Basti AA. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food control* 2007; 18 (9): 1043 - 9.
  22. Iranian Herbal Pharmacopoeia. Ministry of Health and Medical Education, Food and Drug Deputy. Tehran. 2002, pp: 51 - 2.
  23. Basti AA, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modeling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 2007; 40: 973 - 81.
  24. Tassou CC and Nychas GJE. Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on gram positive and gram negative bacteria in broth and in model food system. *Int. Biodeter Biodegr.* 1995; 36 (3): 411 - 20.
  25. Velero M and Salmeron MS. Antibacterial activity of essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *Int. J. Food Microbiol.* 2003; 85: 73 - 81.
  26. Karaman S, Digrak M, Ravid U and Licim A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 78: 183 - 6.
  27. Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH, Khodashenas M and Khoshnoodi M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food control* 2007; 18 (7): 800 - 5.
  28. Basti AA, Misaghi A, Moosavy MH, Zahraei Salehi T and Karim G. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* in a commercial barley soup. *J. Medicinal Plants* 2007; 6 (22): 91 - 8.
  29. Sefidkon F and Rahimi-Bidgoli A. Quantitative and qualitative variation of essential oil of *Thymus kotschyanus* by different methods of distillation and stage of plant growth. *Iran. J. Med. Aroma. Plant. Res.* 2003; 15: 1 - 22.
  30. Tosou C, Koutsomanis K and Nychas GJE. Inhibition of *Salmonella enteridis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Res. Int.* 2000; 33: 273 - 80.
  31. Jay JM. Modern food microbiology. Aspen publication Gaithersburg. Maryland. 2000, pp: 102 - 3.
  32. Addams MR. Food microbiology. Royal society of chemistry. Cambridge. 2000, pp: 55 - 6.
  33. Zapico P, Medina M, Gaya P and Nunes M. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *Int. J. Food Microbiol.* 1998; 40: 35 - 42.
  34. Canilac N and Mourey A. Antimicrobial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and *Coliform*



- bacteria. *Food microbiol.* 2001; 18: 261 - 8.
35. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation. Illinois. 1995.
36. Shahnazi S, Khalighi-Sigaroodi F, Ajani Y, Yazdani D, Ahvazi M and Taghizad-Farid R. Study on chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus trautvetteri* Klokov & Desj.-Shost. *J. Medicinal Plants* 2007; 6 (23): 80 - 8.
37. Marriott PJ, Shellie R and Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromatogr.* 2001; 93 (6): 1 - 22.
38. Baron EJ, Peterson LR and Finegold SM. Diagnostic microbiology. 4<sup>th</sup> ed. Mosby. St. Louis. 1994, pp: 168 - 88.
39. Nostro A, Germano MP, Angelo VA and Connatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000; 30 (5): 289 - 94.
40. Singh A, Singh RK, Bhunia AK and Singh N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 2003; 36 (8): 787 - 94.
41. Rasooli I and Mirmostafa SA. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia* 2002; 73: 244 - 50.
42. Hersch-Martinez P, Leanos-Miranda BE and Solorzano-Santos F. Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. *Fitoterapia* 2005; 76: 453 - 7.
43. Fujita M, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Mizushima T and Tsuchiya T. Remarkable synergies between Baicalien and Tetracycline, and Baicalien and  $\beta$ -lactams against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* 2005; 49 (4): 391 - 6.
44. Ukuku DO and Shelef LA. Sensitivity of six strains of *Listeria monocytogenes* to nisin. *J. Food Protect.* 1997; 60: 867 - 9.
45. Parente E, Giglio MA, Ricciardi A and Clement E. The combined effect of nisin, leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth. *Int. J. Food Microbiol.* 1998; 40 (1-2): 65 - 75.
46. Bouttefroy A, Mansour M, Linder M and Milliere JB. Inhibitory combination of nisin, sodium chloride and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. *Int. J. Food Microbiol.* 2000; 54 (1-2): 109 - 15.
47. Buncic S and Klaenhammer K. Effect of treatment condition nisin inactivation of gram negative bacteria. *J. Food Protect.* 1992; 55: 763 - 6.
48. Jamuna M, Bahusha ST and Jeevaratnam K. Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from lactobacillus isolates against food spoilage and pathogenic organism in model and food systems. *Food microbiol.* 2005; 22 (5): 449 - 54.
49. Pol IE and Smid EJ. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1999; 29: 166 - 70.
50. Yamazaki K, Yamamoto T, Kawai Y and Inoue N. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constitutes by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiol.* 2004; 21: 283 - 9.
51. Ettayebi K, Yamani JEI and Rossi-Hassani BD. Synergistic effect of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000; 183: 191 - 5.

