اثر ترکیبی اسانس‌های زنیان و آویشن شیرازی بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی

اشکان جبلی جوان (DVSc)

گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: کاربرد ترکیبات طبیعی شامل اسانس‌های روغنی روش مؤثری برای جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی می‌باشد. این مطالعه به منظور بررسی اثر ترکیبی دو اسانس آویشن شیرازی و زنیان بر برخی از این باکتری‌های بیماری‌زای غذایی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اسانس زنیان و اسانس آویشن شیرازی به صورت تنها و تؤام با هم در محیط آزمایشگاهی جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) به روش براث میکرو دایلوشن بر علیه برخی از باکتری‌های پاتوژن غذایی شامل اشریشیاکولای، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس و هم‌چنین اثر غلظت‌های تحت بازدارنده این ترکیبات بر منحنی رشد باکتری اشریشیاکولای و باسیلوس سرئوس بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج بررسی اثر ترکیبی اسانس‌های زنیان و آویشن شیرازی نشان‌دهنده اثر سینرژیستی دو اسانس بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس و اثر افزایشی در مورد باکتری‌های اشریشیاکولای، سالمونلا تیفی موریوم و لیستریا مونوسایتوژنز بود. اثر ترکیبی غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس‌های مورد مطالعه نشان داد که این دو ماده با هم باعث افزایش فاز تاخیری و کاهش سرعت رشد باکتری‌های مورد نظر به خصوص باسیلوس سرئوس شدند که این اثر در میکروبیولوژی مواد غذایی حائز اهمیت می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس‌های زنیان و آویشن شیرازی به‌خصوص موقعی که به‌صورت ترکیبی استفاده شوند، در برابر رشد باکتریایی مؤثر هستند و کاربرد بالقوه آن‌ها در سیستم‌های مواد غذایی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: زنیان، آویشن شیرازی، روغن فرار، عصاره های‌گیاهی، میکروب شناسی مواد غذایی، بیماری‌های ناشی از غذا

مقدمه

استفاده از مواد شیمیایی به عنوان نگه‌دارنده در مواد غذایی به منظور جلوگیری از رشد میکروبی و یا کشتن و از بین بردن گروه‌هایی از میکروارگانیسم‌ها، دارای اثرات مضر بر سلامت انسان می‌باشد. از این‌رو در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی اثرات نگه‌دارنده‌های طبیعی جهت جایگزینی با نگه‌دارنده‌های شیمیایی صورت گرفته است. از بین این نگه‌دارنده‌ها می‌توان به اسانس‌های گیاهی اشاره نمود. اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل‌دهنده آن‌ها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی می‌باشند [۱]. از جمله‌ی این

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۳۳۶۵۴۲۱۴

Email: jebellija@profs.semnan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۳۱

اسانس‌های گیاهی می‌توان اسانس‌های زنیان و آویشن شیرازی را نام برد که به دلیل طعم و مزه مناسب به راحتی می‌توانند به عنوان طعم‌دهنده و نگه‌دارنده مورد استفاده قرار گیرند.

زنیان میوه‌ی گیاهی از خانواده چتریان (Umbellifererae) می‌باشد که برحسب مناطق رویش دارای ۶-۴٪ اسانس روغنی فرار است. این گیاه از نظر طبیعت مانند زیره‌ها گرم و خشک است و از نظر خواص، ضد اسپاسم، تونیک، محرک و بادشکن است و معمولاً له کرده‌ی آن به‌عنوان داروی استعمال داخلی برای رفع بیماری‌های معده و کبد و ناراحتی گلو و سرفه و روماتیسم تجویز می‌شود [۲]. اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های مختلف زنیان در مطالعات پیشین اثبات شده است [۴،۲،۳].

آویشن شیرازی از گیاهان متعلق به خانواده نعناع (Laminaceae) است و با اسامی آویشم، آفشن، آبشن شیراز، آویشن پهن شناخته می‌شود؛ سرشاخه‌های گل‌دار خشک شده آن حداقل واجد ۰/۶ درصد اسانس (حجم/وزن) می‌باشد. در تحقیقات قبلی قدرت ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و هم‌چنین اثر مفید این اسانس بر افزایش زمان ماندگاری محصولات گوشتی مورد تایید قرار گرفته است [۷،۶،۵،۱].

استفاده از غلظت‌های بالای اسانس باعث اثرات نامطلوب روی طعم غذا می‌گردد. این مسئله از یک سو و از سوی دیگر اقتصادی نبودن استفاده از یک نگه‌دارنده در مقادیر زیاد، استفاده‌ی تنها از اسانس‌های گیاهی یا هر گونه نگه‌دارنده غذایی طبیعی دیگر را در مواد غذایی محدود می‌سازد. به همین دلیل استفاده هم‌زمان از دو یا چند ترکیب نگه‌دارنده مورد توجه قرار گرفته است تا بتوان به ترکیب سینرژیستی مطمئن و مناسبی از نگه‌دارنده‌های طبیعی دست یافت [۸].

هدف از این مطالعه، بررسی اثر تنها و توام اسانس‌های آویشن شیرازی و زنیان روی باکتری‌های اشریشیاکولای O157:H7، سالمونلا تیفی موریوم فاژتیپ II، لیستریا مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس، که از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای منتقله از طریق مواد غذایی هستند، و هم‌چنین اثر غلظت‌های تحت بازدارنده این دو اسانس بر منحنی رشد دو نماینده گرم منفی و گرم مثبت از این میکروارگانیسم‌ها یعنی اشریشیاکولای O157:H7 و باسیلوس سرئوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج اسانس. گیاه زنیان از استان سیستان و بلوچستان و گیاه آویشن شیرازی از استان فارس در فصل بهار جمع‌آوری و نام علمی آن توسط گیاه‌شناسان پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تایید شد. اسانس‌ها با روش تقطیر با بخار آب از سرشاخه‌های گیاهان با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج و با سولفات سدیم رطوبت آن‌ها گرفته شد. پس از آب‌گیری اسانس‌های استخراج شده تا زمان استفاده در شیشه‌های تیره و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند [۷].

آنالیز اسانس‌ها با استفاده از GC و GC/MS. ترکیب‌های موجود در اسانس‌ها با استفاده از دستگاه‌های گاز کروماتوگراف (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) با مشخصات زیر شناسایی شدند. دستگاه GC/MS (Agilent 6890)با ستون موئینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه در هر دقیقه و نگه‌داری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه و گاز حامل هلیم با سرعت ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود. شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه بود. تشخیص اجزای اسانس با کمک شاخص بازداری به‌دست آمده در مقایسه با تزریق یک سری از آلکان‌ها (Sigma,UK) با ستون DB5 و مقایسه با طیف‌های ترکیب‌های استاندارد، تشخیص طیف جرمی و الگوی شکست گزارش شده در منابع معتبر و مقایسه کامپیوتری اطلاعات جرمی به کمک بانک

اطلاعاتی انجام شد [۶۹]. درصد نسبی هر یک از اجزاء تشکیل‌دهنده اسانس با استفاده از سطح زیر منحنی تعیین شد.

باکتری‌های مورد مطالعه. ابتدا کشت لیوفیلیزه باکتری‌های اشریشیاکولای(ATCC 10536) O157:H7 ، سالمونلا تیفی موریوم فاژتیپ(ATCC 14028) II، لیستریا مونوسایتوژنز (ATCC 19118)، باسیلوس سرئوس (ATCC 11778) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538)، به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط آبگوشت قلب و مغز (BHI) کشت داده شد. سپس کشت مجدد از کشت اول داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. از کشت دوم برای تهیه استوک به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری در لوله‌های اپندورف استریل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

طراحی آزمایش. غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی (۰،۲۵/۰، ۰،۵/۰، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ ppm) و اسانس زنیان (۰،۲۵/۰، ۰،۵/۰، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ ppm) به صورت تنها و توام با هم در محیط آزمایشگاهی برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)به روش میکرودایلوشن بر روی باکتری‌های مورد مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس آویشن شیرازی و زنیان بر منحنی رشد دو باکتری اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس نیز بررسی شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری. جهت تهیه میزان تلقیح باکتری از کشت استوک به داخل محیط آبگوشت BHI برده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس از کشت اول کشت مجددی داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. از کشت دوم مقادیر مختلفی به داخل لوله کووتی که حاوی ۴ میلی‌لیتر آبگوشت BHI استریل بود، منتقل شد تا جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به دست آید. سپس با انتقال ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی داخل کووت، به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه۰/۱ درصد رقت‌های متوالی تا ۶- تهیه شد. از طریق انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی BHI آگار از رقت‌های تهیه شده، کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد و پس از این مدت، تعداد باکتری شمارش شد و از این طریق میانگین تعداد باکتری در کووت حاوی سوسپانسیون باکتری با جذب نوری معادل ۰/۱ با دو بار تکرار محاسبه شد. با مشخص شدن این عدد هر گاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده بوده و می‌توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دلخواه را تهیه نمود. البته در هر مورد تعداد دقیق باکتری تلقیح شده از طریق کشت هم‌زمان باکتری و شمارش تعداد کلونی محاسبه شد [۲].

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن. در مطالعه حاضر، جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن از پلیت ۹۶ خانه با چاهک ته گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده گردید. غلظت‌های متوالی از اسانس آویشن شیرازی (۰،۲۵/۰، ۰،۵/۰، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ ppm) و اسانس زنیان (۰،۲۵/۰، ۰،۵/۰، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ ppm) در آبگوشت BHI حاوی ۵ درصد DMSO تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از اسانس‌ها به هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه انتقال داده شد و تا ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری نیز اضافه شد، (با غلظت نهایی ۱۰۵× ۵ CFU/ml باکتری در هر چاهک) که با تهیه رقت‌های متوالی از سوسپانسیون باکتری و کشت در پلیت و شمارش تعداد کلونی تأیید گردید. محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه توسط Plate Reader مجهز به شیکر مخلوط شد. سپس جذب نوری با استفاده از Plate Reader در زمان صفر و با طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و بعد از اتمام گرم‌خانه‌گذاری کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده گردید و با جذب

نوری خوانده شده بعد از گرم‌خانه‌گذاری توسط Plate Readerتایید شد. روش کار بدین صورت بود که افزایش جذب نوری به میزان بزرگ‌تر یا مساوی ۰/۱ نسبت به زمان صفر به معنای رشد باکتری و ایجاد کدورت و اولین غلظت تکی یا ترکیبی از اسانس‌ها که فاقد کدورت بودند به منزله حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) در نظر گرفته شدند [۱۰].

برهمکنش اسانس‌های آویشن شیرازی و زنیان در خاصیت ضد باکتریایی. فعالیت ضد باکتریایی مخلوط دو اسانس به صورت ترکیب با یک‌دیگر نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش متقابل اسانس این دو گیاه با استفاده از رابطه زیر و بر اساس محاسبه شاخص FIC یا غلظت بازدارنده افتراقی انجام شد

$$\text{ایندکس FIC} = \frac{\text{MIC اسانس آویشن شیرازی در حالت ترکیبی با اسانس زنیان}}{\text{MIC اسانس آویشن شیرازی به تنهایی}} + \frac{\text{MIC اسانس زنیان در حالت ترکیبی با اسانس آویشن شیرازی}}{\text{MIC اسانس زنیان به تنهایی}}$$

در صورتی‌که ایندکس FIC<1 باشد، اثر ترکیبی اسانس‌ها سینرژیستی و اگر FIC=1، 1<FIC<2 یا FIC>2 باشد اثر ترکیبی اسانس‌ها به ترتیب افزایشی، بی‌اثر و آنتاگونیستی خواهد بود [۱۱،۸].

بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی و اسانس زنیان روی نمودار رشد باکتری. در این مرحله اثر غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس‌های آویشن شیرازی و زنیان به تنهایی و به صورت توأم با هم روی رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و باسیلوس سرئوس در طی ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده عبارت بودند از: اسانس آویشن شیرازی: صفر و ۱۲۵ ppm و اسانس زنیان: صفر و ۱۲۵ ppm. مجموع حالات مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. ۱۰ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده (در غلظت‌های مختلف) در لوله‌ها توزیع شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری به هر ۴ لوله اضافه شد (غلظت نهایی باکتری ۵ ×۱۰۵ CFU/ml بود). لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و در ساعت‌های صفر، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۲۴ رقت‌های مورد مطالعه از هر ۴ لوله در زمان‌های فوق تهیه شد و در پلیت BHI آگار به صورت سه تایی کشت داده شد و بعد از گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد شمارش تعداد کلونی انجام شد و تعداد باکتری‌ها در ساعات مورد نظر بر حسب log cfu/mlمحاسبه شد [۷].

نمودارهای مربوط به منحنی رشد باکتری با نرم‌افزار Graphpad prism 4 ترسیم شد و کلیه تحلیل‌های آماری بین لگاریتم تعداد باکتری‌ها در ساعات مختلف و هم‌چنین شیب خط منحنی‌های رشد با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 صورت گرفت. جهت مقایسه داده‌ها از تست One-way ANOVA هم‌راه تست تکمیلی Tukey استفاده شد و اختلاف میانگین داده‌ها در سطح ۵ درصد از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد.

جدول ۱. مجموع حالات مورد استفاده در بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسانس زنیان و آویشن شیرازی روی نمودار رشد باکتری

	حالت اول	حالت دوم	حالت سوم	حالت چهارم
غلظت اسانس زنیان (ppm)	صفر	۱۲۵	صفر	۱۲۵
غلظت اسانس آویشن شیرازی (ppm)	صفر	صفر	۱۲۵	۱۲۵

نتایج

نتایج حاصل از بررسی اجزای اسانس‌ها. نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس آویشن شیرازی و زنیان مورد استفاده با استفاده از GC/MS به ترتیب در جداول ۲ و ۳ نمایش داده شده است. همان‌طور که دیده می‌شود بیش‌ترین ترکیبات در اسانس آویشن شیرازی به ترتیب کارواکرول، تیمول و پاراسیمن و در اسانس زنیان تیمول، پاراسیمن و گاما ترپینن بودند.

نتایج تعیین MIC به روش میکرودایلوشن. نتایج تعیین MIC اسانس‌های زنیان و آویشن شیرازی و ترکیب هم‌زمان این دو علیه پنج باکتری نام برده با روش میکرودایلوشن در جدول ۴ آمده است.

جدول ۲. ترکیبات اسانس آویشن شیرازی

نام ترکیب	اندیس بازداری	درصد
α-thujene	۹۲۷	۰/۰۸
α-pinene	۹۳۷	۲/۲۰
camphene	۹۵۰	۰/۱۰
3-octanone	۹۶۸	۰/۱۸
β-pinene	۹۷۸	۰/۱۸
mycerene	۹۸۴	۰/۸۰
ρ-cymene	۱۰۱۷	۷/۹۰
β-terpineol	۱۰۲۶	۰/۹۰
γ-terpinen	۱۰۵۵	۲/۵۰
linalool	۱۰۹۰	۱/۲۰
p-menth-1-en-4-ol	۱۱۶۸	۱/۰۵
p-menth-1-en-8-ol	۱۱۸۱	۱/۰۵
carvacrol methyl ether	۱۲۲۷	۱/۶۰
thymol	۱۲۶۸	۱۴/۷۰
carvacrol	۱۲۸۸	۵۰/۵۳
thymyl acetate	۱۳۲۹	۰/۶۹
carvacryl acetate	۱۳۵۰	۳/۸۵
trans-caryophyllene	۱۴۳۱	۳/۴۰
eudema-3,7-dien	۱۴۴۸	۰/۱۰
aromadendrene	۱۴۵۲	۲/۰۷
α-humulene	۱۴۶۷	۰/۲۰
cyclosativene	۱۴۷۲	۰/۱۰
ledene	۱۵۰۴	۱/۰۹
spathulenol	۱۵۷۵	۱/۰۲
caryophylene oxide	۱۵۸۶	۱/۱۰
جمع		۹۸/۵۹

جدول ۳. ترکیبات اسانس زنیان

نام ترکیب	اندیس بازداری	درصد
α-thujene	۹۳۱	۰/۰۷
α-pinene	۹۳۹	۰/۰۹
sabinen	۹۷۶	۰/۴۴
β-pinene	۹۸۰	۰/۸۴
ρ-cymene	۱۰۱۸	۱۸/۰۱
γ-terpinen	۱۰۶۱	۱۵/۸۹
thymol	۱۲۷۸	۶۲/۴۲
carvacrol	۱۲۹۲	۰/۳۳
جمع		۹۸/۰۹

همان‌طور که نشان داده شده است میزان MIC اسانس زنیان به تنهایی بر باکتری‌های اشریشیاکولای، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۵۰۰، ۵۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm به دست آمد و در ارتباط با میزان MIC اسانس آویشن شیرازی به تنهایی بر باکتری‌های مورد مطالعه نیز نتایج مشابهی حاصل شد. نتایج بررسی اثر ترکیبی اسانس‌های زنیان و آویشن شیرازی نشان داد با ترکیب این دو اسانس MIC به دست آمده در مورد سه باکتری اشریشیاکولای، سالمونلا تیفی موریوم و لیستریا مونوسایتوژنز ۲۵۰ ppm از زنیان با ۲۵۰ ppm آویشن شیرازی بود و برای باکتری باسیلوس سرئوس MIC ترکیبی ۱۲۵ ppm زنیان با ۳۱/۷۵ ppm از آویشن شیرازی و ۶۲/۵ ppm زنیان با ۱۲۵ ppm از آویشن شیرازی به دست آمد. هم‌چنین غلظت‌های ۲۵۰ ppm از زنیان با ۱۲۵ ppm از آویشن شیرازی و ۶۲/۵ ppm از زنیان با ۲۵۰ ppm از آویشن شیرازی به صورت ترکیبی توانستند رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را مهار نمایند. نوع اثر ترکیبی اسانس‌ها از طریق محاسبه ایندکس FIC بررسی گردید (جدول ۴). میزان ایندکس FIC ترکیب دو اسانس در مورد باکتری‌های اشریشیاکولای، سالمونلا تیفی موریوم و لیستریا مونوسیتوژنز ۱ محاسبه گردید که نشان‌دهنده اثر افزایشی آن‌ها و برای باکتری‌های باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۶۸ به دست آمد که نشان‌دهنده اثر سینرژیستی دو اسانس در مهار رشد باکتری‌های مذکور می‌باشد.

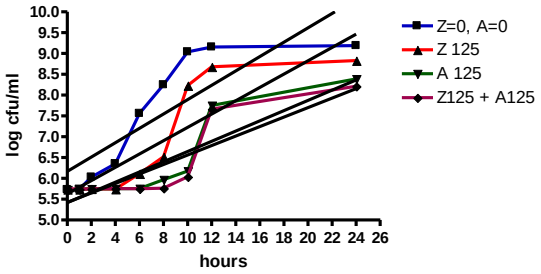
نتایج بررسی منحنی رشد باکتری‌های باسیلوس سرئوس و اشریشیاکلی در حضور اسانس زنیان و آویشن شیرازی. نمودار شماره ۱ منحنی‌های رشد و هم‌چنین شیب خطی (روند افزایشی) منحنی‌های رشد باکتری باسیلوس سرئوس را در حضور اسانس‌های زنیان و آویشن شیرازی نشان می‌دهند. تحلیل آماری روی منحنی رشد باکتری در شکل ۱ نشان داد که از ساعت ۲ گرم‌خانه‌گذاری در تمامی ساعات میزان باکتری در گروه کنترل بیش‌تر از گروه‌های تیمار بود ($p<0/001$) و از ساعت ۸ تا ساعت ۲۴ تعداد باکتری در

گروه ترکیبی اسانس‌های آویشن و زنیان کم‌تر از گروه آویشن به تنهایی و میزان باکتری در گروه آویشن به تنهایی کـم‌تـر از گروه زنیان به تنهایی بود (p<۰/۰۰۱). مقایسه و تحلیل آماری لگاریتم تعداد باکتری‌هـا و در هـر گـروه و بررسـی افـزایش معنادار در تعداد باکتری‌ها (p<۰/۰۰۱) نشان داد که دوره فاز تاخیر در گروه‌های کنترل، زنیان به تنهایی، آویشن به تنهایی و ترکیب زنیان و آویشن به ترتیب ۱، ۴، ۶ و ۸ ساعت بود.

جدول ۴. حداقل غلظت مهاری (MIC) مجزا و ترکیبی اسانس های آویشن شیرازی و زنیان بر میکرو ارگانیسم‌های اشریشیا کولای، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس به روش میکرودایلوشن

اثر مهاری / میکروارگانیسم	MIC اسانس آویشن شیرازی (ppm)	MIC اسانس زنیان (ppm)	MIC ترکیبی اسانس زنیان (ppm) + اسانس آویشن شیرازی (ppm)	FIC ایندکس	نوع اثر ترکیبی
اشریشیا کولای	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰ + ۲۵۰	۱	افزایشی
سالمونلا تیفی موریوم	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰ + ۲۵۰	۱	افزایشی
لیستریا مونوسایتوژنز	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰ + ۲۵۰	۱	افزایشی
باسیلوس سرئوس	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵+۳۱/۷۵ ۶۲/۵+۱۲۵	۰/۶۸	سینرژیستی
استافیلوکوکوس اورئوس	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰ + ۱۲۵ ۶۲/۵ + ۲۵۰	۰/۶۸	سینرژیستی

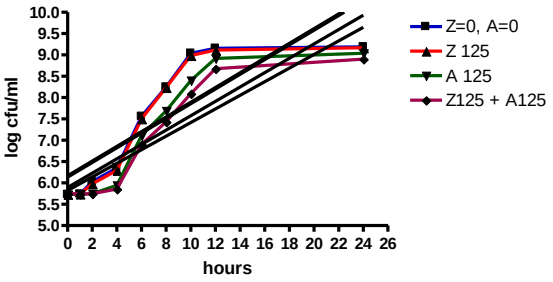
مقایسه شیب خطی منحنی‌های رشـد بـاکتری باسـیلوس سرئوس در حضور اسانس‌های زنیان و آویشـن شـیرازی نیـز نشان داد که بین روند افزایشی تعداد باکتری در دو گروه کنترل (بـا شـیب ۰/۰۲±۰/۱۷) و زنیـان بـه تنهـایی (بـا شـیب ۰/۰۲±۰/۱۶) و همچنین بین دو گروه آویشن به تنهـایی (بـا شـیب ۰/۰۱±۰/۱۲) و ترکیـب آویشـن و زنیـان (بـا شـیب ۰/۰۱±۰/۱۱) اختلاف معنادار وجود نـدارد (p>۰/۰۵) ولـی روند افزایشی تعداد باکتری در گروه‌های آویشن بـه تنهـایی و ترکیب آویشن و زنیان به صورت معنادار کندتر از گروه کنترل است (p<۰/۰۵).



شکل ۱. منحنی رشد و شیب خطی رشد (روند افزایشی) باکتری باسـیلوس سرئوس در حضور کنترل،اسانس زنیان به تنهایی، اسانس آویشن شـیرازی به تنهایی و ترکیب اسانس زنیان و آویشن شیرازی (Z: زنیان، A: آویشن)

شکل ۲ منحنی‌های رشد و همچنین شـیب خطـی (رونـد افزایشی) منحنی‌های رشد باکتری اشریشـیاکلی را در حضـور اسانس‌های زنیان و آویشن شیرازی نشان مـی‌دهنـد. تحلیـل آماری روی منحنی رشد باکتری در شکل ۲ نشـان داد کـه از ساعت ۲ گرم‌خانه‌گذاری در تمامی ساعات میزان بـاکتری در گروه کنترل و گروه تیمار شده بـا اسـانس زنیـان بـیش‌تـر از گروه‌های تیمارشده با آویشن و ترکیب آویشـن و زنیـان بـود (p<۰/۰۰۱) و در تمام مدت آزمایش بین گروه کنترل و زنیان اختلاف معنادار دیده نشد (p>۰/۰۵). مقایسه بین گروه تیمـار شده با آویشن و گروه ترکیبی آویشن و زنیان نشان داد که تـا ساعت ۶ گرم‌خانه‌گذاری بین این دو گـروه اخـتلاف معنـادار وجود نداشت (p>۰/۰۵) ولی از ساعت ۶ تا پایـان آزمـایش میزان باکتری در گروه ترکیبی زنیان و آویشن کم‌تـر از گـروه تیمار شده با آویشن بود (p<۰/۰۰۱). مقایسه و تحلیل آماری لگاریتم تعداد باکتری‌هـا و در هـر گـروه و بررسـی افـزایش معنادار در تعداد باکتری‌ها نشان داد کـه دوره فـاز تـاخیر در گروه‌های کنترل (p=۰/۰۰۳)، زنیان بـه تنهـایی (p=۰/۰۱۲)، آویشـن بـه تنهـایی (p=۰/۰۰۱) و ترکیـب زنیـان و آویشـن

(p<۰/۰۰۱) به ترتیب ۱، ۱، ۲ و ۲ ساعت بود. مقایسه شیب خطی منحنی‌های رشد باکتری اشریشیاکلی در حضور اسانس‌های زنیان و آویشن شیرازی نشان داد که بین روند افزایشی تعداد باکتری اشریشیاکلی در گروه‌های کنترل (با شیب ۰/۰۲۱±۰/۰۱۷)، زنیان به تنهایی (با شیب ۰/۰۲۱±۰/۰۱۷)، آویشن به تنهایی (با شیب ۰/۰۱۷±۰/۰۱۷) و ترکیب آویشن و زنیان (با شیب ۰/۰۱۵±۰/۰۱۶) اختلاف معنادار وجود نداشت (p>۰/۰۵).



شکل ۲. منحنی رشد و شیب خطی رشد (روند افزایشی) باکتری اشریشیاکلی در حضور کنترل، اسانس زنیان به تنهایی، اسانس آویشن شیرازی به تنهایی و ترکیب اسانس زنیان و آویشن شیرازی(Z: زنیان، A: آویشن)

بحث و نتیجه‌گیری

انسان از سال‌ها پیش از گیاهان دارویی در پزشکی و یا به عنوان ادویه در مواد غذایی استفاده می‌کرد اما از قرن نوزدهم میلادی به تدریج ترکیبات شیمیایی، جایگزین داروها و افزودنی‌های گیاهی شدند. با این وجود، امروزه با افزایش سطح آگاهی و نگرانی‌های موجود پیرامون عوارض جانبی این ترکیبات شیمیایی و ایجاد مقاومت‌های دارویی، نگرش جدیدی نسبت به استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی به خصوص گیاهان دارویی در مواد غذایی ایجاد شده است و تمایل به مصرف محصولات فاقد نگه‌دارنده و یا با نگه‌دارنده‌های طبیعی رو به افزایش است. از جمله این نگه‌دارنده‌ها می‌توان به اسانس‌های گیاهی اشاره نمود. اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل‌دهنده آن‌ها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی می‌باشند [۱۲،۱۳].

به طور کلی به منظور افزایش اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی، در غذا غلظت‌های بالاتری از اسانس نسبت به محیط‌های آزمایشگاهی لازم می‌باشد. استفاده از غلظت‌های بالای اسانس باعث اثرات نامطلوب روی طعم غذا می‌گردد. این امر از یک طرف و از طرف دیگر اقتصادی نبودن استفاده از یک نگه‌دارنده در مقادیر زیاد، استفاده تنهایی از اسانس‌های گیاهی یا هر گونه نگه‌دارنده غذایی طبیعی را در مواد غذایی محدود ساخته است. همین‌طور محدود بودن طیف باکتری‌های حساس به یک ماده خاص از دیگر مشکلات استفاده از مواد ضد میکروبی جدید می‌باشد [۱۴]. به همین علت امروزه استفاده همزمان از دو یا چند ترکیب نگه‌دارنده مورد توجه قرار گرفته است [۵].

در این مطالعه اثر اسانس زنیان و آویشن شیرازی بر روی باکتری‌های اشریشیاکولای، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت.

از مطالعاتی که تاکنون در خصوص گیاه زنیان صورت گرفته است می‌توان کارهای انجام شده در زمینه بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی زنیان و خواص ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های مختلف زنیان را نام برد [۳،۴]. همین‌طور اثر ضد باکتریایی اسانس زنیان به روش دایلوشن در تحقیقات زیادی بررسی شده است از جمله کومار و همکاران فعالیت ضد باکتریایی اسانس زنیان را علیه پاتوژن‌های آب ارزیابی نمودند. در این تحقیق از روش براث میکرودایلوشن استفاده کرده و میزان MIC اسانس زنیان برای دو باکتری اشریشیاکولای و سالمونلا تیفی موریوم به ترتیب ۸۷ و ۱۲۸ (دو سویه متفاوت‌ای کولای) و ۱۰۹ ppm به دست آمد [۱۵]. گودرزی و همکاران (۲۰۱۱) اثر ضد باکتریایی اسانس زنیان را با دو روش میکرو براث دایلوشن و آگار دیفیوژن علیه چند باکتری مثل اشریشیاکولای (MIC برابر با ۳۱۰ ppm)، استافیلوکوکوس اورئوس (MIC برابر با ۱۵۰ ppm) و سالمونلا تیفی موریوم (MIC برابر با ۳۱۰ ppm) مورد مطالعه قرار دادند [۱۶]. در مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی اسانس

زنیان بر باکتری‌های مورد مطالعه مشخص گردید و میزان MIC اسانس زنیان در برابر باکتری‌های اشریشیاکولای، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۵۰۰، ۵۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm به دست آمد.

در خصوص گیاه آویشن شیرازی نیز از مطالعاتی که صورت گرفته است می‌توان به تحقیقاتی با اثبات خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و خاصیت ضد قارچی آن اشاره نمود. هامر و همکاران (۱۹۹۹) در تحقیقی به ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره ۵۲ گیاه شامل آویشن شیرازی با روش آگار دایلوشن و براث میکرودایلوشن پرداختند که در مورد اسانس آویشن شیرازی MIC برابر ۱۰۰۰ ppm برای استافیلوکوکوس اورئوس با روش آگار دایلوشن و ۵۰۰ ppm با روش براث میکرودایلوشن، ۲۰۰۰ ppm < برای سالمونلا تیفی موریوم با روش آگار دایلوشن و ۲۵۰۰ ppm برای اشریشیاکولای با هر دو روش آگار دایلوشن و براث میکرودایلوشن به دست آمد [۱۷]. لو و همکاران (۲۰۱۱) اثر آویشن شیرازی و ۹ اسانس دیگر را روی اشریشیاکولای، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس و مخمر ساکارومایسس سرویسیه از طریق روش آگار دیسک دیفیوژن مورد تحقیق قرار دادند که در این تحقیق حداقل غلظت بازدارنده اسانس آویشن شیرازی بر باکتری‌های اشریشیاکولای، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۳۱۳، ۳۱۳ و ۱۵۶ ppm گزارش شد [۱۸]. در مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری‌های مورد مطالعه مشخص گردید و میزان MIC آن برای باکتری‌های اشریشیاکولای، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۵۰۰، ۵۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm به دست آمد.

اختلاف در میزان MIC به دست آمده از تحقیق حاضر با اعداد حاصل از سایر منابع در مورد هر دو اسانس زنیان و آویشن شیرازی را می‌توان به اختلاف در ترکیب شیمیایی اسانس‌ها به علت تفاوت در محل رویش گیاه و فصل برداشت آن، روش استخراج اسانس و هم‌چنین نوع و سویه میکروارگانیسم و روش تعیین اثر ضد میکروبی ربط داد. در این مطالعه نوع اثر ترکیبی اسانس‌های مورد مطالعه بر باکتری‌های مختلف متفاوت بوده که این تفاوت در مطالعات قبلی به اثبات رسیده است برای مثال در تحقیقی که توسط فو و همکاران (۲۰۰۷) روی اثر ترکیبی اسانس‌های میخک و رزماری صورت گرفت گزارش شد که بسته به نوع میکرواگانیسم ترکیب این دو اسانس می‌تواند اثر افزایشی، سینرژیستی و یا آنتاگونیستی داشته باشد [۱۹] هم‌چنین گوتیرز و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه‌ای اثر توأم اسانس‌های مرزنجوش، آویشن و مرجورام بر باکتری‌های مختلف را بررسی نموده و اثر افزایشی آن‌ها را در حضور توأم گزارش نمودند [۲۰]. اما باید اذعان داشت که در هیچ کدام از این تحقیقات کاری روی اثر ترکیبی دو اسانس آویشن شیرازی با زنیان علیه میکروارگانیسم‌ها انجام نشده است. در تحقیق حاضر مشخص گردید در صورت استفاده ترکیبی و هم‌زمان، غلظت‌های پایینتری از اسانس‌ها لازم است و در واقع این امر بیانگر اثر سینرژیستی و یا افزایشی این دو اسانس می‌باشد.

در ارتباط با تاثیر دو اسانس آویشن شیرازی و زنیان بر منحنی‌های رشد و هم‌چنین شیب خطی (روند افزایشی) منحنی‌های رشد باکتری‌های باسیلوس سرئوس و اشریشیاکلی دیده شد که هر دو اسانس باعث افزایش فاز تاخیر در دو باکتری شدند و روند افزایش باکتری‌ها را به خوبی و به صورت معنادار کاهش دادند. این امر در میکروبیولوژی مواد غذایی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این مورد اسانس آویشن شیرازی قوی‌تر از اسانس زنیان بود و باکتری باسیلوس سرئوس حساسیت بیش‌تری را نشان داد.

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو اسانس زنیان و آویشن شیرازی اثر ضدباکتریایی بالایی دارند که این اثر را می‌توان به ترکیبات اصلی موجود در این اسانس‌ها نسبت داد به طوری‌که در تحقیقات قبلی قدرت ضد باکتریایی کارواکرول، تیمول، پاراسیمن و گاماترپینن به خوبی اثبات شده

است [۱]. از بین ترکیبات فنولی ثابت شده است که کارواکرول به علت طبیعت هیدروفوبیک و حضور گروه هیدروکسیل آزاد دارای بیش‌ترین اثر ضد میکروبی می‌باشد [۲۱] که به نظر می‌رسد اثر ضد باکتریایی بیش‌تر اسانس آویشن شیرازی در حالت ترکیبی و بر روی نمودار رشد میکروبی به علت حضور میزان زیاد کارواکرول در این اسانس باشد.

در مجموع اثر اسانس‌های مورد مطالعه بر باکتری‌های گرم مثبت بیش‌تر از گرم منفی می‌باشد. این اختلاف اثر در مطالعات قبلی نیز به اثبات رسیده است [۲۲]. علت این اختلاف ناشی از وجود غشای خارجی دور دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی است که نفوذ و انتشار ترکیبات هیدروفوبیک در پوشش لیپوپلی ساکاریدی باکتری را محدود می‌نماید [۲۳]. هم‌چنین در این مطالعه باکتری باسیلوس سرئوس حساس‌ترین و باکتری‌های اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم و لیستریا مونوسیتوژنز مقاوم‌ترین در بین باکتری‌های مورد مطالعه در برابر اسانس‌ها شناخته شدند.

به طور کلی نتایج این مطالعه بیانگر اثر ضد میکروبی اسانس‌های زنیان و آویشن شیرازی بر باکتری‌های اشریشیاکولای، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس بوده و اثر سینرژیستی و یا افزایشی مشاهده شده استفاده از این دو اسانس را به عنوان نگه‌دارنده در مواد غذایی پیشنهاد می‌نماید. البته استفاده عملی از این دو اسانس منوط به انجام مطالعات بیش‌تر در مدل‌های غذایی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسنده مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از خانم منصوره کنعانی کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان اعلام میدارد.

منابع

[1] Jebelli Javan A, Ghazvinian K, Mahdavi A, Javaheri Vayeghan A, Steji H, Ghaffari Khaligh S. The effect of dietary Zataria multiflora Boiss. essential oil supplementation on microbial growth and lipid peroxidation of broiler breast fillets during refrigerated storage. J Food Process Preserv 2012; 37: 881-888.

[2] Gandomi H, Abbaszadeh S, Jebelli Javan A, Aghil Sharifzadeh A. Chemical constituents, antimicrobial and antioxidative effects of trachyspermum ammi essential oil. J Food Process Preserv 2013; 38: 1690-1695.

[3] Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Harrera A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. J Food Prot 2004; 6: 1252-1256.

[4] Selim S. Antimicrobial activity of essential oils against Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) and Escherichia coli O157: H7 in feta soft cheese and minced beef meat. Braz J Microbiol 2011; 42: 187-196.

[5] Misaghi A, Akhondzadeh Basti A. Effects of zataria multiflora boiss. essential oil and nisin on bacillus cereus ATCC 11718. Food Control 2007; 18: 1043-1049.

[6] Jamzade M. Handbook of zataria. Research Institute of Forests and Rangelands Tehran 1995; pp: 1-7.

[7] Ataee M, Akhondzadeh Basti A, Zahraei Salehi T, Hosseini H, Gandomi Nasrabadi H, Noori N, et al. Effect of Zataria multiflora boiss. essential oil on growth curve and shigatoxin 2 production of enterohemorrhagic escherichia coli O157: H7. JMP 2013; 4: 62-71.

[8] Hamouda AM, Elbanna HIR. Combined antimicrobial effect against some isolated bacteria from chickens. J Phys Pharm Adv 2013; 3: 272-276.

[9] Adams RP. Identification of essential oil components by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Allured, USA, 750p.

[10] Schwalbe R, Steele-moore L, Goodwin AC. 2007. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols, CRC Press, New York.

[11] Santiesteban-López A, Palou E, López-Malo A. Susceptibility of food-borne bacteria to binarycombinations of antimicrobials at selected aw and pH. J Appl Microbiol 2007; 102: 486-497.

[12] Alpsoy L. Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. Afr J Biotechnol 2010; 2474-2481.

[13] Mohamad khani zadeh A, Zaringhalam moghadam J, Sonboli A, Ayari M, Mirjafari S. Effects of hydroalcholic and chloroformic extracts of Salvia Candidissima on hyperalgesia and edema during adjuvant-induced arthritis. Koomesh 2014; 16: 239-245.

[14] Gill AO, Holley RA. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 0C. Int J Food Microbiol 2003; 80: 251-259.

[15] Kumar A, Mishra RK, Srivastava S, Tiwari AK, Pandey A, Shukla A. Role of phylogenetic analysis for anti-bacterial activity of essential oil of Trachyspermum ammi L. against water borne pathogens. Adv Environ Biol 2011; 5: 1271.

[16] Goudarzi GR, Saharkhiz MJ, Sattari M, Zomorodian K. Antibacterial activity and chemical composition of ajowan (Carum copticum Benth. & Hook) essential oil. J Agr Sci Tech 2011; 13: 203-208.

[17] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol 1999; 86: 985-990.

[18] Lv F, Liang H, Yuan Q, Li C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. Food Res Int 2011; 44: 3057-3064.

[19] Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, Efferth T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytother Res 2007; 21: 989-994.

[20] Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. The anti-microbial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. Int J Food Microbiol 2008; 124: 91-97.

[21] Ben afra A, Combes S, Preziosi-belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Lett Appl Microbiol 2006; 43: 149-154.

[22] Nestor Bassole IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules 2012; 17: 3989-4006.

[23] Singh G, Maurya S, Marimuthu P, Murali HS, Bawa, AS. Antioxidant and antibacterial investigations on essential oils and acetone extracts of some spices. Nat Prod Radiance 2007; 6: 114-121.

Combinational effects of Trachyspermum ammi and Zataria multiflora Boiss essential oils on some pathogenic food-borne bacteria

Ashkan Jebelli Javan (DVSc)*
Dept. of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

(Received: 17 Feb 2015 ; Accepted: 22 Aug 2015)

Introduction: Application of natural compounds including essential oils (EOs) is an effective method to fight against the growth of bacterial pathogens in food. This study was conducted to determine the combinational effect of *Trachyspermum ammi* and *Zataria multiflora* Boiss essential oils on some pathogenic food-borne bacteria.

Materials and Methods: The effect of different concentrations of *Trachyspermum ammi* and *Zataria multiflora Boiss* was assessed individually and/or in combination, using microdilution broth method to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) effect on the pathogenic food-borne bacteria including *E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus,* and *Staphylococcus aureus*. Moreover, the effect of EOs was analyzed, individually or in combination, on *B.cereus* and *E.coli* growth curves.

Results: Combination of *Trachyspermum ammi* and *Zataria multiflora* Boiss essential oils showed a synergistic effect against *B. cereus* and *S. aureus* and additive effect on *E. coli*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes.* The results of growth curve analysis of the combinational effects of these two EOs showed that they decreased the rate and increased the lag phase of bacterial growth, especially for *B.cereus*. This finding has an important value in food microbiology.

Conclusion: This study showed that *T. ammi*, and *Z. multiflora* Boiss essential oils were effective against bacterial growth, especially when they are used in combination. Based on this study it is suggested that their potential application to be considered in food industry.

Keywords: *Trachyspermum ammi, Zataria multiflora,* Oils, Volatile, Plant Extracts, Food Microbiology, Foodborne Diseases

* Corresponding author. Tel: +98 23 33654214
jebellija@profs.semnan.ac.ir