

ارزیابی آثار اسانس زیره سبز و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر رشد استافیلوکوک اورئوس در پنیر سفید ایرانی

احسان صادقی^{۱،۲}، افشین آخوندزاده بستی^{۳*}، علی میثاقی^۴، تقی زهرایی صالحی^۵، سمیه بهلولی اسگویی^۶

- ۱- دستیار تخصصی، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشگاه تهران، تهران
 - ۲- استادیار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه
 - ۳- استاد، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران
 - ۴- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران
 - ۵- استاد، گروه میکروبی شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران
 - ۵- استاد، گروه بهداشت بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران
 - ۶- دستیار، گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، کرمانشاه
- *آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، گروه بهداشت مواد غذایی
صندوق پستی: ۶۴۵۳ - ۱۴۱۵۵، تلفن: ۶۶۹۲۳۵۱۰ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲ (۰۲۱)
پست الکترونیک: aakhond@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۲۳

تاریخ تصویب: ۸۸/۶/۱۷

چکیده

مقدمه: گیاه زیره سبز^۱ از گیاهان دارویی در طب سنتی ایران بوده و بررسی اثر ضد میکروبی آن در زمینه مواد غذایی بر روی باکتری های بیماری زای مهمی که از عوامل مسمومیت های غذایی رایج هستند، لازم و ضروری به نظر می رسد. از سوی دیگر آثار سودمند پروبیوتیک ها بر بدن امروزه یکی از مباحث مهم دنیای علم تلقی می شود و ما بر آن شدیم تا آثار توام و تک تک پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و اسانس زیره سبز را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سفید ایرانی بررسی کنیم.

هدف: هدف این بررسی ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس زیره سبز و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر سفید ایرانی بود.

روش بررسی: اسانس گیاه زیره سبز به روش تقطیر با بخار آب استخراج و ترکیب آن با دستگاه گاز کروماتوگرافی طیف سنج جرمی GC/MS تعیین شد. تاثیر غلظت های مختلف اسانس مذکور بر باکتری مورد نظر که به شیر پنیر افزوده شده بود از طریق سنجش میزان رشد باکتری در محیط کشت اختصاصی در آزمایشگاه و در پنیر سفید ایرانی صورت پذیرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که تک تک حالات کاملاً معنی دار بودند، اسانس به تنهایی و پروبیوتیک به تنهایی نسبت به شاهد اثر معنی دار داشتند، اثر سینرژیستی بین حالت های مختلف اسانس و پروبیوتیک نیز نسبت به شاهد معنی دار بود، اثر سینرژیستی نسبت به همه ی حالات مختلف اسانس و پروبیوتیک معنی دار بود و اسانس مذکور در دو غلظت ۰/۰۳ و ۰/۱۵ درصد به ترتیب از بالاترین تاثیر بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس برخوردار بوده و در ترکیب با استارتر پنیر و پروبیوتیک به میزان هر کدام ۰/۵ درصد به طور معنی داری از رسیدن شمار این باکتری به دز مسمومیت زای خود در فراورده غذایی مورد بررسی جلوگیری کردند.

نتیجه گیری: تاثیر ضد میکروبی اسانس زیره سبز در غلظت ۰/۰۳ درصد بالاتر از مقادیر پایین تر آن بود و با توجه به گروه های شاهد برای حصول این تاثیر مهاری به اثر سینژیک آن در کنار پروبیوتیک و استارترهای پنیر نیاز است.

کل واژگان: زیره سبز، پروبیوتیک، استافیلوکوکوس اورئوس، پنیر

¹ Cuminum cyminum



مقدمه

اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل‌دهنده آنها دارای آثار شناخته شده ضدباکتریایی هستند. کاربردهای فراوان آنها به منظور کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا با منشاء غذایی و یا باکتری‌های عامل فساد، موجب به کارگیری آنها به عنوان نگه‌دارنده‌های غذایی شده است. استقبال از این موضوع از یک‌طرف به علت رویکرد جدید عمومی مردم و از طرف دیگر سازمان‌های بین‌المللی و ملی مسؤول در زمینه بهداشت مواد غذایی و نیز صنایع غذایی در استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی مختلف به جای شیمیایی (که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرد) است. به طور کلی غلظت‌های بالای اسانس‌های گیاهی در غذا نسبت به محیط‌های آزمایشگاهی به منظور اثربخشی آثار ضدباکتریایی آنها لازم است. این امر از یک طرف به دلیل آثار معکوس احتمالی که در طعم، مزه، بو و رنگ می‌گذارد و از طرف دیگر اقتصادی نبودن استفاده از یک نگه‌دارنده در مقادیر زیاد، استفاده تنها از اسانس‌های گیاهی (به عنوان یک نگه‌دارنده غذایی) یا هرگونه نگه‌دارنده غذایی طبیعی را در مواد غذایی محدود ساخته است [۱].

پروبیوتیک‌ها نیز ممکن است شمار برخی از پاتوژن‌ها، از جمله استافیلوکوکوس اورئوس را در پنیر آلوده کاهش دهند. افزودن پروبیوتیک به شیر می‌تواند در ترکیب با سایر روش‌ها، این باکتری را از پنیر حاصل از شیر خام حذف نماید. بنابراین متخصصان بهداشت مواد غذایی با به کارگیری سیستم تحقیقاتی جدید یعنی سیستم تکنولوژی مانعی^۱، ابتدا در مدل‌های آزمایشگاهی و سپس در مدل‌های اصلی یعنی ابتدا مدل‌های غذایی مایع و سپس جامد، سعی بر به کارگیری اسانس‌های گیاهی به تنهایی و توأم با سایر نگه‌دارنده‌های طبیعی دیگر در غلظت‌ها و درجات ترکیبی مختلف با اثر بر روی باکتری‌های بیماری‌زای مهم با منشاء غذایی نموده‌اند تا بتوان به ترکیب سینرژیستی مطمئن و مناسبی از نگه‌دارنده‌های طبیعی با بیشترین اثر ضدپاتوژنی و در عین حال با کمترین اثر معکوس ارگانولپتیکی به دست یافت [۲].

^۱ Hurdle Technology

^۲ Emerging Food-borne Pathogens

اورئوس یک باکتری بیماری‌زای مهم با دامنه وسیعی از عفونت‌های انسانی و حیوانی است که شامل بیماری‌های غذایی ناشی از تولید توکسین است. در بسیاری از کشورها، این باکتری پس از سالمونلا و کلستریدیوم پرفرینجنس به عنوان دومین یا سومین باکتری از سه باکتری بیماری‌زایی است که موجب شیوع مسمومیت‌ها و عفونت‌های غذایی می‌شوند. انسان‌ها و اغلب حیوانات اهلی به عنوان پناهگاهی برای این باکتری هستند و بنابراین ما انتظار داریم که استافیلوکوک‌ها در اغلب یا تمام محصولات غذایی با منشاء دامی یا آلهایی که به طور مستقیم توسط انسان‌ها دستکاری می‌شوند، حضور داشته باشند. به علاوه، استافیلوکوکوس اورئوس عامل رایجی برای بیماری‌های پستان در گاوهای شیری است، بنابراین اگر شیر مربوط به حیوانات مبتلا به بیماری ورم پستان مصرف شود یا برای تهیه پنیر به کار رود، احتمال خطر بالایی از نظر مسمومیت غذایی وجود خواهد داشت. افزایش بیماری‌های غذایی، همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی حاصل، به معنای آن است که لزوم کوشش مداومی برای تولید غذای سالم‌تر و توسعه عوامل ضد میکربی جدید وجود دارد [۳].

توجه به سلامت برخی نگه‌دارنده‌های شیمیایی و عکس‌العمل منفی مصرف‌کننده به نگه‌دارنده‌های مصنوعی و شیمیایی، باعث افزایش تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی‌تر شد. این امر مخصوصاً در مورد محصولاتی که به عنوان ماده آلی وارد بازار می‌شوند حایز اهمیت است، یعنی جایی که نیاز به جایگزین‌های سالم و موثر برای تیمارها و نگه‌دارنده‌های شیمیایی است. تمایل ویژه بر روی کاربردهای بالقوه اسانس‌های گیاهی متمرکز شده و خصوصیات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، شامل باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها تایید شده است. اما اغلب این تحقیقات در محیط آزمایشگاهی انجام گرفته و بدین ترتیب مطالب کمی پیرامون تاثیر آنها در زمان به کارگیری در ماده غذایی، روشن شده است. در مورد ضرورت انجام تحقیق، از آنجا که سلامت غذا یک مسأله بنیادی، چه از دیدگاه مصرف‌کننده مواد غذایی و چه از دیدگاه صاحبان صنایع غذایی بوده است و با عنایت به گزارش‌های مرتبط با موارد



به رنگ زرد و سپس قهوه‌ای رنگ می‌شود. بوی زیره مربوط به آلدئیدی به نام کومینول است. مقدار کومینول در زیره بسته به محل کشت آن بین ۳۰ تا ۵۰ درصد است [۵].

مواد و روش‌ها

فرضیات

بررسی رفتار باکتری بیماری‌زای مهم با منشای غذایی، یعنی *Staphylococcus aureus* در پنیر سفید ایرانی متأثر از غلظت‌های مختلف (صفر، ۰/۰۳، ۰/۱۵ و ۰/۰۷۵ درصد) زیره سبز و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در دمای پنیرسازی است.

تهیه اسانس و آنالیز آن

گیاه زیره سبز در فصل تابستان از استان کرمان جمع‌آوری و توسط گروه گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی نام علمی آن تایید شد. پس از تهیه اسانس گیاه به روش عصاره‌گیری تبخیری^۱ از سرشاخه‌های هوایی گیاه، آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌نگار جرمی^۲ انجام شد (جدول شماره ۱). دستگاه GC/MS از نوع Thermoquest Finnigan 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 و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه فارنهایت و گاز حاصل از هلیوم با سرعت ۱/۵ میلی‌متر در دقیقه بود. شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه فارنهایت بود [۵].

باکتری مورد بررسی

شامل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، زیرگونه اورئوس ATCC 6538 بود که از گروه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده بود و آزمایش‌های تاییدی حساسیت به لیزواستافین، ترمونوکلاز مقاوم به حرارت

متعدد عفونت‌های حاصل از مواد غذایی آلوده، توجه به سلامت غذا و ارایه راهکارهایی جهت حفظ هرچه بیشتر سلامت مواد غذایی در حال گسترش است. به علت دیدگاه منفی روزافزون و ناخوشایند مصرف‌کنندگان در استفاده از مواد غذایی که در آنها از نگه‌دارنده‌های شیمیایی استفاده شده از یک طرف و از طرف دیگر مشکلات متعدد مسئولان در روش‌ها و سیستم‌های کنترل مواد غذایی که گران و وقت‌گیر است، توجه روزافزون تولیدکنندگان و مسئولین بهداشتی به استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی و گیاهی طرف و نیز به کارگیری روش‌های کنترلی کم‌هزینه و مطمئن، از جمله استفاده از مدل‌سازی و مدل‌های پیشگو در کنار یا به جای روش‌های کنترلی رایج از جمله روش‌های قدیمی کنترل محصول نهایی و یا روش HACCP و غیره معطوف شده است [۴]. در این بررسی، برای اولین بار در یک مدل غذایی (پنیر سفید ایرانی)، با استفاده از (Hurdle Technology) سعی به بررسی اثر اسانس زیره سبز به تنهایی و توأم با باکتری پروبیوتیک گونه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در یک مدل غذایی پنیر سفید ایرانی بر روی باکتری بیماری‌زای مهم با منشای غذایی یعنی استافیلوکوکوس اورئوس، در مراحل مختلف پنیرسازی شده است. زیره سبز^۱ گیاهی است از خانواده apiaceae، یک ساله، معطر، بدون کرک (جز میوه) ساقه علفی با انشعابات دو تایی و گاهی سه تایی می‌باشد. ساقه گیاه شیاردار بوده و دارای بافت کلانشیم محیطی است. همچنین گیاهی است یک ساله کوچک و علفی که ارتفاع آن ۶۰ سانتی‌متر است ریشه آن دراز و باریک به رنگ سفید، ساقه آن راست و برگ‌هایش به شکل نوار باریک و نخ‌شکل و به رنگ سبز می‌باشد. دامنه انتشار آن کرمان، سبزوار، علی‌آباد، مشهد، صالح‌آباد تهران، بین تهران و سمنان در ناحیه‌ای به نام کیش لک در ارتفاعات ۹۰۰ متری به حالت خودرو و نیمه خودرو سمنان، دامغان، سرخه در ۱۱۰۰ متری پرورش آن در غالب نواحی مساعد صورت می‌گیرد. زیره دارای تانن، روغن زرین و اسانس است. اسانس زیره را از تقطیر میوه له شده تحت اثر بخار آب به دست می‌آورند. این اسانس مایعی است بی‌رنگ که در اثر ماندن ابتدا

¹ Steam distillation

² GC/MS

¹ *Cuminum cyminum*



جدول شماره ۱- نتایج GC/MS اسانس زیره سبز

ترکیب	شاخص نگهداری	درصد
B pinene	۱۳/۰۷	۷/۱۱
Benzene 1 methyl	۱۵/۵۷	۷/۷۳
B phellandrene	۱۵/۶۹	۱/۰۱
Gama terpinene	۱۷/۳۶	۱۲/۵۶
Isopropylbicyclo	۲۳/۸۸	۲/۷۶
Benzaldehyde	۲۶/۴۶	۲۷/۱۸
Isopropylidene	۲۸/۱۱	۳/۷۷
Phenylpropanol	۲۸/۷۴	۱۷/۵
Benzenemethanol	۲۸/۹۹	۱۰/۸۲
Ethanediol	۲۹/۳۵	۳/۰۲
جمع		۹۳/۴۶

طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. سپس از این لوله‌های Cuvett جهت شمارش تعداد باکتری‌ها استفاده شد تا در نهایت لوله Cuvett که دارای 2×10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر باشد، مشخص شود (که با کشت بر روی آگار نیز شمارش تایید می‌شود). سپس، همان‌گونه که بعداً بیان می‌شود از این لوله Cuvett حاوی 2×10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر سریال‌های رقت ۱۰ تا ۱۰^{-۵} باکتری در هر میلی‌لیتر تا ۱۰^{-۲} باکتری در هر میلی‌لیتر با استفاده از سوبسترای براث در ترکیب با فاکتورهای موردنظر آزمایش، که در قسمت بعدی توضیح داده می‌شود، تهیه شد. سپس از این لوله Cuvett حاوی 2×10^7 باکتری جهت تهیه دوز تلقیح مورد استفاده در تحقیق یعنی 10^3 باکتری در هر میلی‌لیتر استفاده شد [۳].

آماده‌سازی پروبیوتیک جهت تلقیح در شیر پنیر: از باکتری لیوفلیزه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس خالص تهیه شده از شرکت *CHR HANSEN* استفاده شد.

آماده‌سازی مایه پنیر جهت تلقیح در شیر پنیر: از مایه پنیر قارچی تهیه شده از شرکت *CHR HANSEN* استفاده شد.

آماده‌سازی استارتر جهت تلقیح در شیر پنیر: از باکتری‌های لیوفلیزه لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس تهیه شده از شرکت *CHR HANSEN* استفاده شد.

وکواگولاز روی آن انجام گرفت. این باکتری لیوفلیزه در محیط آبگوشت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ - ۱۶ ساعت (over night) حداقل ۲ مرتبه به طور متوالی کشت شده، تا تعداد باکتری‌ها به دوز تلقیح نزدیک‌تر شود، سپس از کشت دوم به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب‌های اپندروف در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و برای هر آزمایش از این کشت‌های نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد استفاده شد و این کشت دوم جهت انجام تحقیق به کار گرفته شد [۳].

تهیه میزان تلقیح باکتریایی: تهیه میزان تلقیح باکتری با انتقال کشت نگه‌داری شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد بر روی محیط کشت براث^۱ و نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ - ۱۶ ساعت و مجدداً کشت دومی از این آبگوشت ۱۸ ساعته اول بر روی براث دیگر به مدت ۱۸ ساعت و ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس لوله‌های استریل تهیه شده و به آن‌ها ۵ میلی‌لیتر از محیط مایع استریل اضافه شد. ابتدا برای بار اول مقادیر مختلفی از آبگوشت ۱۸ ساعته دوم بر روی لوله‌های Cuvett حاوی ۵ میلی‌لیتر براث برده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در

^۱ BHI

مدت ۶۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور شمارش استافیلوکوکوس اورئوس، اندازه‌گیری pH، اسیدیته، تعیین درصد ماده خشک، درصد رطوبت و درصد نمک نمونه‌های پنیر، آزمایش‌های میکروبی شمارش کلیفرم‌ها و کپک و مخمر در مراحل زیر انجام پذیرفت:

الف- ساعت صفر (بلافاصله پس از تلقیح استافیلوکوکوس اورئوس در شیر)

ب- بعد از افزودن استارتر و ایجاد لخته (ساعت ۱)

ج- پس از آب‌گیری لخته (ساعت ۷)

د- روز ۷ (ساعت ۱۶۸)

ه- روز ۱۵ (متعاقب اتمام دوره رسیدن اولیه پنیر با دمای

۱۶ - ۱۴ درجه سانتی‌گراد یا ساعت ۳۶۰)

و- روز ۳۰ (ساعت ۷۲۰)

ز- روز ۴۵ (ساعت ۱۰۸۰)

ح- روز ۶۰ (ساعت ۱۴۴۰)

ط- روز ۷۵ (ساعت ۱۸۰۰)

تفسیر میکروبی: پرگنه‌های قابل مشاهده استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان شمار شاخص بر روی پلیت‌های تکرار شده محیط آگار اختصاصی Baird Parker همراه با ذخیره انتخابی برای Baird Parker پس از گرم‌خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تعیین شد.

تحلیل آماری: تحلیل واریانس پروبیوتیک، غلظت‌های اسانس زیره سبز، روزهای مرحله رسیدن به آزمون تولید پنیر به عنوان عوامل اصلی موثر بر روی شمارش‌های استافیلوکوکوس اورئوس و مقادیر pH پنیر با استفاده از برنامه spss ۱۵ با نرم‌افزار Win 9.0 در نظر گرفته شد. اختلافات شاخص توسط آزمون آنالیز واریانس Anova در $p < 0.05$ ضمن استفاده از همین برنامه انجام گرفت.

نتایج

اسانس گیاه زیره سبز استخراج و فعالیت ضد میکروبی آن در پنیر سفید ایرانی بررسی شد. ضمن استفاده از غلظت‌های مختلف اسانس، نمونه‌های مورد مطالعه به دو گروه حاوی پروبیوتیک (در غلظت ۰/۵ درصد) و بدون پروبیوتیک تقسیم

تولید پنیر سفید ایرانی: برای تهیه پنیر سفید ایرانی، شیر تازه و کامل گاو تهیه شده از گاوداری صنعتی خرم‌دره که عاری از بقایای آنتی‌بیوتیکی و بازدارنده‌های میکروبی بود و در دمای ۲۰+۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه شده بود، استفاده گردید. قبل از شروع به انجام مراحل مختلف پنیرسازی، دمای شیر را به ۳۵ درجه سانتی‌گراد رسانده و در هر یک از ظروف استریل مخصوص تهیه پنیر مقدار ۵۰ لیتر از شیر ریخته شد. سپس با دز موردنظر از کشت ۱۸ ساعته استافیلوکوکوس اورئوس یعنی 10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر محیط آبگوشت BHI با حجم مناسب به گونه‌ای آلوده شد که در نهایت دز تلقیح موردنظر یعنی 10^3 باکتری در هر میلی‌لیتر از شیر پنیر به دست آمد. پس از آن، استارتر به مقدار ۰/۵ درصد (حجم به حجم) به شیری که از آن نمونه‌های پنیر دارای استارتر تهیه می‌گردید، اضافه شد. سپس پروبیوتیک به مقدار ۰/۵ درصد (حجم به حجم) به چهار نمونه اضافه شد. مقدار ۰/۰۲ درصد (وزن به حجم) از کلرور کلسیم را در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً حل نموده و به طور یکنواخت به شیر پنیر اضافه شد. نهایتاً پس از آنکه pH شیر به ۵/۶ رسید، rennet به مقدار ۰/۰۰۱ درصد (وزن به حجم) پس از حل نمودن آن در آب مقطر استریل به شیر افزوده شده و در همین زمان اسانس زیره سبز نیز در غلظت‌های مذکور اضافه شد. به منظور کارایی بهتر rennet، دمای شیر در مدت زمان تشکیل لخته در حدود ۳۵ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. پس از گذشت مدت زمان یک ساعت، لخته تشکیل شده به قطعات ۲ - ۱ سانتی‌متر مکعبی برش داده شد و طبق دستورالعمل ساخت پنیر سفید ایرانی جهت آب‌گیری به مدت شش ساعت تحت فشار وزنه استریل ۱۰ کیلوگرمی قرار گرفت. سپس لخته به صورت قطعاتی به ابعاد $6 \times 8 \times 12$ سانتی‌متری برش داده شد و در آب نمک ۲۲ درصد (وزن به حجم) استریل به مدت ۸ ساعت در دمای ۱۲ - ۱۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از آن نمونه‌های پنیر ضمن انتقال به آب نمک ۱۲ درصد استریل، تا ۱۵ روز در دمای ۱۲ - ۱۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۴]. پس از طی دوره رسیدن اولیه جهت دوره رسیدن نهایی نمونه‌ها به



۰/۵ درصد به طور معنی‌داری از رسیدن شمار این باکتری به در مسمومیت‌زای خود در فرآورده غذایی مورد بررسی جلوگیری کردند. با مقایسه رشد باکتری *Staphylococcus aureus* در این دو گروه می‌توان نتیجه گرفت که این اسانس در دو غلظت ۰/۱۵ و ۰/۰۳ درصد قادر به مهار رشد این باکتری بوده و در غلظت ۰/۰۳ درصد کاملاً از نزدیک شدن شمار این باکتری به دوز مسمومیت‌زای خود یعنی $\log 6 \text{ cfu/gr}$ جلوگیری نموده است که البته ضمن مقایسه آن با گروه فاقد پروبیوتیک چنین نتیجه‌گیری شد که این اثر به طور سینرژیک و در ترکیب با پروبیوتیک تقویت شد. ضمناً نتایج کشت کلیفرم‌ها و کپک و مخمر که حین هر نمونه‌گیری انجام شد هیچ‌گونه آلودگی را نشان نداد و نیز میزان نمک، ماده خشک، رطوبت، پروتئین و چربی در محدوده استاندارد ملی ایران قرارداشت.

شدند و نیز جهت حصول اطمینان از عدم اثر ممانعت‌کنندگی این اسانس بر رشد استارترها، در تمامی مراحل نمونه‌برداری، اندازه‌گیری pH نیز انجام گرفت و با توجه به اختلاف آن در دو گروه مذکور و پایین‌تر بودن pH در گروه حاوی استارتر، می‌توان چنین نتیجه گرفت که این اسانس به طور معنی‌داری بر رشد استارتر پنیر تاثیر ندارد ($p < 0.05$). نتایج نشان داد که تک‌تک حالات کاملاً معنی‌دار بودند، اسانس به تنهایی و پروبیوتیک به تنهایی نسبت به کنترل معنی‌دار بودند، اثر سینرژیستی بین حالت‌های مختلف اسانس و پروبیوتیک نیز نسبت به کنترل معنی‌دار بود، اثر سینرژیستی نسبت به تک‌تک حالات مختلف اسانس و پروبیوتیک معنی‌دار بود و اسانس مذکور درد و غلظت ۰/۱۵ و ۰/۰۳ درصد به ترتیب از بالاترین تاثیر بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس برخوردار بوده و در ترکیب با استارتر پنیر و پروبیوتیک به میزان هر کدام

جدول شماره ۲- نمایش شمارش باکتری‌ها بر حسب cfu/g تحت تاثیر حالت‌های مختلف غلظت اسانس و پروبیوتیک، A: دارای پروبیوتیک B: بدون پروبیوتیک

نمونه	پروبیوتیک	درصد اسانس	۰ ساعت		۱ ساعت		۷ ساعت		۱۶۸ ساعت	
			شمارش کلی‌ها	انحراف استاندارد	شمارش کلی‌ها	انحراف استاندارد	شمارش کلی‌ها	انحراف استاندارد	شمارش کلی‌ها	انحراف استاندارد
۱A	۱	۰	۱۱۰۰	۱۰۰	۱۳۰۰	۲۰۰	۱۵۳۳/۳	۶۶۱/۲	۶۵۰۰	۵۰۰
۲A	۱	۰/۰۰۷۵	۱۳۰۰	۲۰۰	۱۵۳۳/۳	۶۶۱/۲	۱۸۶۶/۶	۳۰۵/۵	۵۵۶۶/۶	۴۰۴/۱
۳A	۱	۰/۰۱۵	۱۱۶۶/۶	۱۵۲/۷	۱۳۳۳/۳	۱۵۲/۷	۱۶۶۶/۶	۱۵۲/۷	۴۱۰۰	۱۰۰
۴A	۱	۰/۰۳	۱۷۳۳/۳	۶۶۱/۲	۲۰۶۶/۶	۲۰۸/۱	۲۲۶۶/۶	۳۰۵/۵	۱۴۰۰	۱۰۰
B1	۰	۰	۱۱۶۶/۶	۱۵۲/۷	۱۳۳۳/۳	۱۵۲/۷	۱۷۰۰	۱۰۰	۷۸۳۳/۳	۳۵۱/۱
B2	۰	۰/۰۰۷۵	۱۲۳۳/۳	۶۶۱/۲	۱۵۰۰	۳۰۰	۱۷۶۶/۶	۳۰۵/۵	۵۴۰۰	۲۶۴/۵
B3	۰	۰/۰۱۵	۱۱۰۰	۱۰۰	۱۴۰۰	۱۷۳/۲	۱۷۳۳/۳	۱۵۲/۷	۴۰۳۳/۳	۵۷/۷
B4	۰	۰/۰۳	۱۷۰۰	۱۰۰	۲۰۳۳/۳	۱۵۲/۷	۲۳۰۰	۲۰۰	۲۱۰۰	۲۰۰

جدول شماره ۳- نمایش شمارش باکتری‌ها بر حسب cfu/g تحت تاثیر حالت‌های مختلف غلظت اسانس و پروبیوتیک، A: دارای پروبیوتیک B: بدون پروبیوتیک

نمونه	پروبیوتیک	درصد اسانس	۳۶۰ ساعت		۷۲۰ ساعت		۱۰۸۰ ساعت		۱۴۴۰ ساعت		۱۸۰۰ ساعت	
			انحراف استاندارد	میانگین شمارش کلنی‌ها	انحراف استاندارد	میانگین شمارش کلنی‌ها	انحراف استاندارد	میانگین شمارش کلنی‌ها	انحراف استاندارد	میانگین شمارش کلنی‌ها	انحراف استاندارد	میانگین شمارش کلنی‌ها
A1	۱	۰	۱۳۲۲/۸	۱۰۵۰	۳۲۶۶/۶	۲۰۸۱/۶	۲۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	۵۰۳۳۳/۳	۵۵۰۷۵/۷	۵۶۰۰۰۰	۳۴۶۴۱
A2	۱	۰/۰۰۷۵	۲۵۱/۶	۸۸۳۳/۳	۲۷۶۶/۶	۱۵۲۷/۵	۸۲۳۳۳/۳	۳۲۱۴/۵	۳۳۳۳۳/۳	۶۱۱۰۱	۴۴۳۳۳/۳	۲۰۸۱۴
A3	۱	۰/۰۱۵	۴۰۴/۱	۶۷۷۸/۶	۲۴۲۳۳/۳	۲۰۸۱/۶	۵۴۶۶۶/۶	۳۰۵۵	۱۸۰۰۰۰	۶۰۵۵۵/۷	۳۹۰۰۰۰	۱۰۰۰۰
A4	۱	۰/۰۳	۴۵۸/۲	۲۸۰۰	۴۶۰۰	۶۰۰۰	۳۹۳۳/۳	۸۳۲/۶	۲۶۳۳/۳	۱۰۱۱/۵	۱۱۰۰	۱۰۰۰
B1	۰	۰	۲۲۶۶/۶	۲۰۸۱/۶	۶۸۰۰۰	۲۶۴۵۰/۷	۴۰۲۳۳۳/۳	۸۶۲۱۶/۷	۸۷۳۳۳۳/۳	۸۷۳۳۳/۹	۱۸۰۰۰۰۰	۳۰۰۰۰۰
B2	۰	۰/۰۰۷۵	۸۸۶۶/۶	۸۰۸/۲	۲۶۶۶۶/۶	۲۰۸۱/۶	۱۸۶۶/۶	۷۰۹۴۵/۹	۲۷۰۰۰۰	۳۴۶۴۱	۳۵۶۶۶/۶	۴۰۴۱۴
B3	۰	۰/۰۱۵	۷۱۰۰	۳۶۰/۵	۲۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	۶۴۳۳۳/۳	۱۵۰۴۴/۹	۵۶۳۳۳/۳	۸۳۸۶/۴	۴۹۶۶۶/۶	۶۵۰۴
B4	۰	۰/۰۳	۳۵۶۶/۶	۳۰۵/۵	۵۶۶۶/۶	۵۵۰/۷	۳۵۳۳/۳	۷۵۰/۵	۲۶۳۳/۳	۴۱۶/۳	۱۳۳۳	۱۵۲/۳

جدول شماره ۴- تغییرات میزان pH در پنیر سفید ایرانی، A: دارای پروبیوتیک، B: بدون پروبیوتیک، C: کنترل، ۱: بدون اسانس، ۲: غلظت ۰/۰۰۷۵ درصد اسانس، ۳: غلظت ۰/۰۱۵ درصد اسانس، ۴: غلظت ۰/۰۳ درصد اسانس

pH	۰ ساعت	۱ ساعت	۷ ساعت	۱۶ ساعت	۳۰ ساعت	۷۲۰ ساعت	۱۰۸۰ ساعت	۱۴۴۰ ساعت	۱۸۰۰ ساعت
A1	۶/۷۲	۶/۵۹	۵/۶۳	۵/۲۳	۴/۹۸	۴/۸۷	۴/۸۳	۴/۷۸	۴/۷۴
A2	۶/۷۲	۶/۶۲	۵/۶۰	۵/۲۰	۴/۹۶	۴/۸۵	۴/۸۱	۴/۷۵	۴/۷۱
A3	۶/۷۲	۶/۶۱	۵/۵۷	۵/۱۸	۴/۹۳	۴/۸۳	۴/۷۸	۴/۷۲	۴/۶۸
A4	۶/۷۲	۶/۶۲	۵/۵۳	۵/۱۳	۴/۹۰	۴/۷۹	۴/۷۵	۴/۷۰	۴/۶۴
B1	۶/۷۲	۶/۵۹	۵/۶۵	۵/۲۸	۴/۹۹	۴/۸۸	۴/۸۵	۴/۸۲	۴/۷۶
B2	۶/۷۲	۶/۶۰	۵/۶۱	۵/۱۹	۴/۹۶	۴/۸۴	۴/۸۳	۴/۷۶	۴/۷۰
B3	۶/۷۲	۶/۵۹	۵/۵۸	۵/۱۵	۴/۹۲	۴/۸۰	۴/۸۰	۴/۷۴	۴/۶۴
B4	۶/۷۲	۶/۶۱	۵/۵۱	۵/۱۰	۴/۸۸	۴/۷۷	۴/۷۲	۴/۶۸	۴/۶۲
C	۶/۷۲	۶/۵۹	۵/۶۲	۵/۲۱	۴/۹۵	۴/۸۶	۴/۸۴	۴/۷۹	۴/۷۵



بحث

با توجه به نگرانی مصرف‌کنندگان و متولیان بهداشتی در مورد استفاده از نگه‌دارنده‌های شیمیایی و ضررهای آنها، در سال‌های اخیر تولیدکنندگان مواد غذایی گرایش به استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی در مواد غذایی پیدا نموده‌اند. لذا بررسی‌های مختلفی در ارتباط با اثر اسانس و عصاره‌های گیاهی مختلف بر روی پاتوژن‌های مهم غذایی در محیط کشت و غذا انجام گرفته است. همان‌گونه که عنوان شد، بررسی‌هایی در مورد اثر ترکیبی پینن و ترپینن که یکی از ترکیبات ضد میکروبی زیره سبز است انجام شده ولی هیچ پژوهشی در مورد اثر توأم ضد میکروبی اسانس زیره سبز و باکتری‌های پروبیوتیک بر روی استافیلوکوکوس اورئوس انجام نپذیرفته است. در پژوهش انجام شده توسط یانو^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۱، آثار ضد میکروبی اسانس زیره سبز بر رشد ویبریو پاراهمولیتیکوس بررسی شد و آثار بازدارندگی در غلظت ۰/۰۲ درصد تایید شد [۶]. درخشان^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۷، آثار ضد میکروبی اسانس زیره سبز بر رشد کلبسیلانمونیه بررسی شد و آثار بازدارندگی در غلظت ۰/۰۳ درصد تایید شد [۷]. میلته^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۷، آثار ضد میکروبی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را بر لیستریامونوسایتوزن بررسی کرد [۸]. پَن^۴ و همکاران در سال ۲۰۰۹ خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را در شرایط اسید معده و صفرا مورد بررسی قرار داد و متوجه پایداری این اثر در شرایط فوق شد [۹]. زالاشک^۵ و همکاران در سال ۲۰۰۰ آثار سودمند و ترمیمی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گاستروانتریت و نیز تقویت سیستم ایمنی بدن به اثبات رساند [۱۰]. بررسی‌های دیگری بر روی نقش و آثار اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دیگر بر روی پاتوژن‌های مهم غذایی و سلامت غذا، در مدل‌های محیط کشت و غذایی انجام شده است:

در پژوهش انجام شده توسط بهوریندر^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۱ آثار سینرژیک عصاره آلی سیر و نیسین که یکی از نگه‌دارنده‌های طبیعی دیگر است به صورت تغییرات حداقل غلظت نگه‌دارنده بر روی ۶ سویه لیستریا منوسیتوزن در یک مدل محیط کشت مایع^۲ بررسی شد و یک تاثیر سینرژیک ضد باکتریایی بر روی سویه‌های لیستریا در هنگام استفاده این دو ماده با هم مشاهده شد. علاوه بر این، تاثیر سایر فاکتورهای رشدی از قبیل pH و دماهای ۴ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که افزایش pH باعث کاهش تاثیر هر دو ماده شد. در ضمن تاثیر هر دو ماده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود [۱۱]. در بررسی دیگری از سوی اسمیت^۳ و همکاران ۲۰۰۱ آثار چهار اسانس طبیعی گیاهی یعنی اسانس زیره، میخک، دارچین و آویشن، به عنوان یک نگه‌دارنده غذایی طبیعی در غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ درصد در پنیرهای نرم با چربی کم^۴ و زیاد^۵، علیه لیستریا منوسیتوزن و سالمونلا انتریتیدیس در دماهای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد در طی ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. در پنیر با چربی کم هر چهار اسانس طبیعی در غلظت ۱ درصد باعث کاهش رشد لیستریا منوسیتوزن تا کمتر از یک کلنی در هر گرم شدند، در مقابل در پنیر با چربی زیاد اسانس میخک تنها اسانسی بود که باعث کاهش مشابه گردید [۱۲]. همین افراد در بررسی دیگری در سال ۲۰۰۴، توانایی غلظت‌های زیرمهرای اسانس‌های گیاهی را برای تاثیر بر تولید انترتوکسین‌های A، B و توکسین آلفا از استافیلوکوکوس اورئوس مورد سنجش قرار دادند. غلظت‌های زیرمهرای در اسانس‌های زیره، میخک، دارچین، جوز هندی و آویشن اثر شاخصی بر کمیت کلی پروتئین خارج سلولی تولید شده نداشتند. همولیز مربوط به اثر توکسین آلفا به طور شاخصی پس از کشت با پنج اسانس گیاهی مذکور کاهش یافت. بالاترین کاهش در نمونه‌های حاوی زیره، دارچین و میخک بود. همچنین، این سه اسانس به طور شاخصی تولید

¹ Bhurinder³ Smith⁵ Full-fat² Triptose phosphate broth⁴ Low-fat¹ Yano³ Millette⁵ Zalashk² Derakhshan⁴ Pan

توسط پاو چان هدی^۱ و همکاران و اسکندامیس^۲ و همکاران (۲۰۰۱) در مورد آثار ضدباکتریایی و ضدقارچی برخی از اسانس‌های طبیعی گیاهی بر روی پاتوژن‌های مهم غذایی در مدل‌های غذایی و محیط کشت انجام شده است [۱۶، ۱۷].

همچنین آرکیوس^۳ و همکاران (۲۰۰۵) اثر ترکیبی تیمار با فشار بالا و باکتری‌های اسیدلاکتیک مولد باکتریوسین^۴ را بر روی بقای لیستریا منوسیتوژنز Scott A در لگاریتم BP-LAB در پنیر حاصل از شیر خام بررسی کردند. در روز سوم، شمار لیستریا منوسیتوژنز در پنیر کنترل (بدون BP-LAB و تیمار با فشار بالا) به $7.03 \log \text{cfu/g}$ ، در پنیرهای حاوی BP-LAB به $7.4 \log \text{cfu/g}$ - 6.06 ، در یک پنیر فاقد BP-LAB که در روز دوم با فشار ۳۰۰ MPa تیمار شده بود به $2.01 \log \text{cfu/g}$ ، در پنیرهای حاوی BP-LAB که در روز دوم با فشار ۳۰۰ MPa تیمار شده بودند به $5.43 \log \text{cfu/g}$ - 3.83 و در نمونه‌های مشابهی که با فشار ۵۰۰ MPa تیمار شدند $1.81 \log \text{cfu/g}$ یا کمتر رسید [۱۸].

اوسالاح^۵ و همکاران (۲۰۰۵) آثار مهارکنندگی ۲۸ نوع اسانس گیاهی انتخاب شده را بر روی رشد چهار باکتری پاتوژن شامل: اشرشیا کلی 0157:H7، سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا منوسیتوژنز بررسی نمودند. نتایج نشان داد که *Corydothimus*، *Cinnamomum Cassia* و *capitatus* و *Origanum heracleoticum* فعال‌ترین اسانس‌ها علیه باکتری‌های مذکور هستند [۱۹].

آیرگلینی^۶ و همکارانش (۲۰۰۵) نشان دادند که علی‌رغم اعمال استرس حرارتی به میزان ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در طی روند تولید پنیر گرانا پادانو و بیشترین میزان اثر آن در بخش مرکزی نسج پنیر، این فرآیند از تأثیری نسبی بر مهار باکتری‌های تلقیح شده اشرشیاکلائی، سالمونلاتیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس برخوردار است [۲۰].

انترتوکسین A را کاهش دادند [۱۲]. تاسو و نیکاس در سال ۱۹۹۴ اولئوروپین و ترکیبات فنولیک خالص تجاری را از زیتون استخراج کرده و رشد و تولید انترتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس S-6 را در محیط مایع و همچنین در شیر بازساخته (سیستم غذایی مدل) مهار نمودند. آنان دریافتند که مهار این ارگانیزم در محیط مایع N-Z amine A توسط میزان تلقیح، اندازه pH محیط و غلظت افزودنی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به ویژه، رشد و تولید انترتوکسین B در محیط مایع با غلظت بالای اولئوروپین (۰/۶ درصد) و همچنین در مورد شیر با غلظت اولیه عصاره، مهار شد [۱۳]. در بررسی دیگری توسط کانیللاس^۱ و همکاران (۲۰۰۱) آثار ضدباکتریایی، یعنی MIC و LBC^۲ اسانس طبیعی *Picea excelsa* بر روی یک سویه *Listeria ivanovi* ۶ سویه *L. monocytogenes* ۱ سویه *Enterobacter cloacae* در یک مدل محیط کشت مایع یعنی Tripitcase soy broth همراه با مکمل عصاره مخمر بررسی شد. غلظت‌ها به میزان ۰ تا ۱۶ درصد از اسانس موردنظر در محیط کشت مذکور مورد استفاده قرار گرفت و بعد از تلقیح باکتریایی نتایج به این ترتیب به دست آمد که برای باکتری‌های گرم مثبت غلظت ۰/۰۷ درصد اسانس گیاه مذکور سبب جلوگیری از رشد حدود 10^0 باکتری در هر میلی‌لیتر از محیط کشت شد و غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۳ درصد دارای خاصیت باکتریوسیدی برای حدود 10^0 - 10^7 باکتری در محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. در حالی که کلی‌فرم‌ها در تعداد 10^0 در هر میلی‌لیتر مقاوم بوده و در ۸ درصد از این اسانس طبیعی پایدار بودند [۱۴]. در بررسی دیگری توسط ویریندا و همکاران، آثار ضدلیستریایی روغن میخک در مدل‌های غذایی یعنی گوشت و پنیر در دو دمای ۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. غلظت ۱ درصد اسانس میخک سبب جلوگیری از رشد لیستریا منوسیتوژنز در هر دو دما و هر دو مدل غذایی شد. بنابراین، چنین نتیجه‌گیری شد که اسانس میخک دارای یک اثر بالقوه به عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی در گوشت و پنیر است [۱۵]. بررسی‌های مشابه دیگر

^۱ Pao chun hedieh^۲ Skandamis^۳ Arques^۴ BP-LAB^۵ Oussalah^۶ Aercolini^۱ Canillac^۲ Lowest Bactericidal Concentration

نظر تاثیر ضد میکروبی است ($p < 0.05$). با مقایسه میزان تغییرات و کاهش مقادیر pH و پایین تر بودن میزان آن در گروه حاوی پروبیوتیک، به ویژه در چهارده روز نخست دوره رسیدن پنیر، می توان چنین نتیجه گیری نمود که خوشبختانه این اسانس گیاهی در کنار اثر مهارکنندگی خود بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، تاثیر بازدارنده معنی داری بر فعالیت استارتر پنیر نداشته و بدین ترتیب اختلالی در پنیر سفید ایرانی و کیفیت آن نداشته است. با توجه به نتایجی که در طول فرآیند آب گیری لخته بیشترین تعداد باکتری ها در بافت لخته به دام افتاده و شمار کمتری وارد فاز آب پنیر شده، لذا در قسمت آب پنیر آلودگی کمتری حاصل شده است، به گونه ای که پایین ترین میزان آن در نمونه حاوی استارتر و دارای اسانس با غلظت ۰/۰۳ درصد و بالاترین میزان در نمونه های فاقد این دو متغیر مشاهده شد.

بدین ترتیب بررسی متون نشان می دهد که تاکنون در زمینه آثار ضد میکروبی توام اسانس های گیاهی و پروبیوتیک در طی مراحل تولید و رسیدن پنیر پژوهشی صورت نگرفته است. در این بررسی، غلظت ۰/۰۳ درصد اسانس زیره سبز بالاترین اثر مهارکنندگی را بر روی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد، که در ترکیب با غلظت ۰/۵ درصد پروبیوتیک توانستند به طور سینرژیک از رسیدن شمار این باکتری بیماری زا به دوز مسمومیت زا در پنیر ممانعت نمایند، زیرا پروبیوتیک هائیز قادرند با افزایش اسیدیته و رقابت میکروبی تا حدودی از رشد بسیاری از باکتری های دیگر جلوگیری نمایند. در گروه فاقد پروبیوتیک، به غیر از نمونه های حاوی بالاترین غلظت اسانس مذکور، میزان آلودگی بقیه نمونه ها به بالاتر از دوز مسمومیت زای این باکتری رسید، که نشانگر ارتباط معنی دار بین پروبیوتیک و اسانس زیره سبز از

منابع

1. Radmehr B. Growth modeling of *Staphylococcus aureus* in combination *Zataria multiflora* and growth factors. Thesis of food hygiene (Ph.D) University of Tehran, Aug 2006; 237: 54 - 57.
2. Akhondzadeh Basti A, Razavilar V, Misaghi A, Abasifar R, Radmehr B and Sigarodi F. Evaluation of *Zataria Multiflora* on *slamonella Typhimurium* in heart broth. *J. Medical Plants*, March 2004; 9: 85 - 93.
3. Mousavi T. Study of behavior of *staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Iranian White cheese. Thesis of food hygiene (Ph.D) Azad University of Tehran, jan 2005; 237: 60 - 70.
4. Karim G. Milk and Dairy product. First ed. University of Tehran Press. Iran. 1997, pp: 206 - 237.
5. Zargari A. Handbook of Medical Plants. 6nd ed. University of Tehran Press. Iran. 1997, pp: 1 - 154.
6. Yano Y, Satomi M, Oikawa H. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International J. Food Microbiol.* Aug 2006; 111 (1): 6 - 11.
7. Derakhshan S, Sattari M, Bigdeli M. Effect of sub inhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumonia*. *International J. Antimicrobial Agents*, Nov 2008; 32 (5): 432 - 6.
8. Millette M, Luquet F, Lacroix, M. In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk. *J. Applied Microbiol.*



Mar 2007; 44: 314 - 9.

9. Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *J. Food Control* Jun 2009; 20 (6): 598 - 602.

10. Zalashk M, Kiani S and Azizi H. Relaxant effect *Cuminum cyminum* on guinea pig tracheal chains and its possible mechanism. University of Toronto, jun 2006; 188: 10 - 18.

11. Bhurinder S, Bernadette F, Martin R. Synergistic inhibition of *listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *J. Food Microbiol.* 2001; 18: 133 - 9.

12. Smith P, Stewart JA, Fyfe L. Influence of sub inhibitory conditions of plant essential oils on the productions A and B and alfa- toxin by *staphylococcus aureus*. *J. Medical Microbiol.* 2004; 53: 1023 - 7.

13. Tassou C, Nychas G. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Olive Phenolics in Broth and in a Model Food System. *J. Food Protection* 1994; 57: 120 - 4.

14. Canillac N and Moury. Antibacterial activity of the essential oil of *picea excelsa* on *listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *J. Food Microbiol.* 2004; 18: 261 -8.

15. Vrinda MK, Grag R. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and Cheese. *J. Food Microbiol.* 2004; 18: 647 - 50.

16. Heieh PC, Mau JL, Huang SH. Antimicrobial effect of combination of plant extracts. *J. Food Microbiol.* 2004; 18: 35 - 43.

17. Skandamis P, Tsingarida E, Nychas G. the effect of organo essential oil on survival/ death of *salmonella Thyphimurium* in meat stored at 5 under aerobic, VP/MAP Conditions. *J. Food Microbiol.* 2002; 19: 379 - 85.

18. Arques JL, Rodriquez E, Gaya P, Medina M, Nunez M. Effect of combinations of high pressure Treatment and bacteriocin producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International Dairy J.* 2005; 15: 893 - 900.

19. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on The growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *slamonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria momocytogenes*. *J. Food Control*, 2007; 18: 414 - 20.

20. Aercolini D VF, Blaiotta G, Sarghini F and Coppola S. Response of *Escherichia coli*O157: H7, *Listeia monocytogenes*, *salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* to the Thermal Stress Occurring in Model Manufactures of Grana Padano Cheese. *J. Diary Sci.* 2005; 88: 18 - 25.

