

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^۱، سید مهدی رضوی روحانی^۲، حسین تاجیک^۳، فرحناز خلیقی سیگارودی^۴، محمود رضازاد باری^۵

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 جهاد دانشگاهی، 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.

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



مقدمه

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 رایج ترین 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 مسئول تولید انرژی یا سنتز ترکیبات ساختمانی سلولی نیز موثر می‌باشند [۵،۹،۱۰].

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 ارگانسیم‌های 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^۱ 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 کلسترییدیوم 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 دربرداشته 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^۲ 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

^۱ Generally Recognized As Safe

^۲ 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 مونوسیتوزن

این باکتری یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای‌شکل، 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 مونوسیتوزن 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 جمع‌آوری‌شده 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 موردنظر 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 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 اتاق 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 ارگانسیم

کشت لیوفیلیزه لیستریا مونوسیتوزن ATCC 19118 تهیه شده از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی تهران جهت این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا این کشت لیوفیلیزه در محیط آگار گشت 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 آگار گشت 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 آگار گشت BHI دیگر (به مدت ۱۸ ساعت، ۳۵ درجه سانتی گراد) تهیه شد. سپس لوله های حاوی ۵ میلی لیتر آگار گشت BHI استریل تهیه شد. در مرحله بعد مقادیر مختلفی از کشت آگار گشت BHI ۱۸ ساعت دوم به لوله های مختلف منتقل شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر 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 1×10^7 باکتری در هر میلی لیتر بود، مشخص شد. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش از رقت های با جذب نوری معادل 1×10^7 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 1×10^5 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 براث طی این مطالعه از روش شرح داده شده به وسیله بستی (۲۰۰۷) استفاده شد. به طور خلاصه دی متیل سولفوکسید



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 1×10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر (با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر) و رقت‌سازی سریالی، دوز تعیین شده 1×10^5 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 1×10^5 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

ردیف ضمن بررسی کدورت، کشت باکتریایی^۱ از تمامی لوله‌ها بر روی آگار^۲ صورت گرفت و بر اساس میزان اولیه تلقیح حداقل غلظت بازدارندگی^۳ و حداقل غلظت کشندگی^۴ 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 سزکویی‌ترپن‌های اکسیژنه (۰/۴ درصد) می‌باشد. همچنین ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس شامل کارواکرول (۲۳/۰ درصد)، تیمول (۱۷/۷ درصد)، گاما- ترپنین (۹/۰ درصد)، پارا- سیمن (۷/۹ درصد)، کارواکرول متیل اتر (۵/۹ درصد) و آلفا- پینن (۵/۲ درصد) می‌باشند.

تأثیر 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

^۱ Pour Plate
^۳ MIC

^۲ BHI
^۴ MBC



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

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



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	α -Copaene	۱۳۷۶	۱۳۸۹	۰/۱
۳۰	β -Caryophyllene	۱۴۱۸	۱۴۳۹	۴/۸
۳۱	Aromadendrene	۱۴۳۹	۱۴۵۵	۰/۸
۳۲	α -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	سزکویی ترپن‌های 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 مونوسیٹوژن

نام گیاه	نایسین	لیستریا مونوسیٹوژن
		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^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثرات ضد میکروبی اسانس آویشن^۲ 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 ضد باکتریایی 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^۳ و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده شد به کارگیری اسانس آویشن شیرازی منجر به بروز خواص سینرژیستی 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 مهار 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^۴ و همکاران (۱۹۹۵) و جامونا^۵ 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، نیترا 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 ضد باکتریایی 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 ضد باکتریایی آنها، خصوصیات متفاوت سویه‌های مختلف باکتریایی و محیط کشت مورد استفاده می‌باشد [۲۵]. در مطالعات مختلف به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی 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 ضد باکتریایی اسانس‌ها استفاده شده است [۲۴، ۲۵]. در این مطالعه ما به بررسی اثرات بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری لیستریا مونوسیتوزن به تنهایی 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 میثاقي 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 اشریشاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی نمودند و نتیجه‌گیری نمودند که فعالیت باکتریسیدال اسانس آویشن شیرازی نسبت به

¹ Bagamboila

² *Thymus vulgaris*

³ Fujita

⁴ Buncic

⁵ Jamuna



پل^۱ و همکاران (۱۹۹۹) از اسانس‌های گیاهی به همراه نایسین و استرهای دی گلیسرید اسیدهای چرب برای مهار باکتری لیستریا منوسیتوژن استفاده نمودند. در این بین کارواکرو 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 اسیدهای چرب، دی گلیسرول منو لورات موثرترین ترکیب علیه لیستریا منوسیتوژن بود. در استفاده توام از این ترکیبات، این مطالعه نشان داد که میتوان از نایسین و دی گلیسرول منولورات برای بالا بردن اثر ضد لیستریایی ترکیبات گیاهی (کارواکرو، تیمول و اوژنول) استفاده نمود که در این حالت از مقدار (دز) کمتری از اسانس گیاهی در ماده غذایی استفاده می شود و در نتیجه از اثرات نامطلوب اسانس گیاهی روی طعم و مزه غذا جلوگیری می شود [۴۹].

برای بررسی حساسیت لیستریا منوسیتوژن به نایسین مطالعه ای توسط یامازاهی^۲ و همکاران (۲۰۰۴) تحت شرایط زیر صورت گرفت:

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

۳) استفاده توام از دو روش فوق

براساس نتایج به دست آمده تاثیر ضد میکروبی نایسین روی باکتری لیستریا منوسیتوژن به طور قوی بستگی به روش مورد استفاده دارد. استفاده از روش ۱ و ۲ باعث مهار لیستریا منوسیتوژن می شود ولی در طول زمان باکتری به نایسین مقاومت پیدا می کند 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 بسته بندی نیز نایسین به تدریج وارد غذا شود، روش مؤثری در مهار لیستریا منوسیتوژن می باشد [۵۰].

اخیراً بحث تشدیدکنندگی اثرات بازدارندگی اسانس ها در همراهی با سایر مواد ضد میکروبی مطرح شده است. برای مثال

فعالیت کارواکرو و تیمول در حضور نایسین افزایش می یابد [۱۴،۱۵،۲۱،۴۹]. نتایج یک بررسی توسط چی ژانگ^۱ و همکاران (۲۰۰۴) نشان داد که استفاده توام از نایسین و کارواکرو به صورت سینرژیست عمل کرده و باعث کاهش تعداد باکتری های زنده لیستریا منوسیتوژن و باسیلوس سرئوس می شود [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 سانتی گراد به ۱۰ درجه سانتی گراد اثرات ضد میکروبی هر کدام به تنهایی یا توام افزایش می یابد [۲۱].

این بررسی تاثیر اسانس آویشن شیرازی را به تنهایی و در همراهی با نایسین نشان می دهد. این همراهی به صورت سینرژیست سبب بالارفتن اثرات بازدارندگی آنها می شود. این نتایج مشابه به مشاهدات اتایی^۲ و همکاران (۲۰۰۰)، پرگو^۳ و همکاران (۲۰۰۱) و میثاقی و همکاران (۲۰۰۷) بود که به نقش بازدارندگی و ضد میکروبی تیمول و کارواکرو اشاره کرده بودند [۱۴،۱۵،۲۱،۴۹،۵۱].

نتیجه گیری

میزان غلظت اسانسی که برای اثرات بازدارندگی بر باکتری ها مورد نیاز است بیشتر از میزان اسانسی است که جهت معطر کردن غذا استفاده می شود. 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 تکنیک های نگهداری از قبیل کاهش درجه حرارت گرمخانه گذاری، تغییرات pH و سایر مواد نگهدارنده مثل نایسین با توجه به اثرات سینرژیست آنها می تواند راهکار مناسبی باشد. در این حالت با کاهش غلظت اسانس مورد نیاز می توان از تاثیر منفی آن بر روی مزه غذا تا حد زیادی جلوگیری کرد. در این مطالعه تاثیر اسانس آویشن شیرازی را

¹ Chi Zhang

² Ettayebi

³ Perigo

¹ Pol

² 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

- 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.
- 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.
- Schuenzel KM and Harrison MA. Microbial antagonists of foodborne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. *J. Food Protect.* 2002; 65 (12): 1909 - 15.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 94 (3): 223 - 53.
- Singh N, Singh RK, Bhunia AK and Stroshine RL. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Smid EJ and Corris LGM. Natural antimicrobials for food preservation. In: Shafiurrahman. *Handbook of food preservation*. Marcel Dekker. New York. 1999, pp: 285 - 308.
- Ross RP, Morgan S and Hill C. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 2002; 79: 3 - 16.
- 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.
- 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. Antimicrobiol 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 kotschyianus* 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. 4th 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 Baicalein and Tetracycline, and Baicalien and β -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 *Basillus 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 constituents 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.

