

اثر ضد میکروبی آویشن شیرازی بر روی *E. coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده گوساله در طی نگهداری در یخچال (سردخانه)

نگین نوری^{۱*}، نوردهر رکنی^۱، افشین آخوندزاده^۱، علی میثاقی^۱، فهیمه توریان^۱

۱- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: nnoori@ut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۸۹/۱۰/۱۸ پذیرش نهایی: ۸۹/۱۲/۹)

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، تعیین اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی رشد باکتری *E. coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده متأثر از غلظت‌های مختلف (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۳ و درصد) آویشن شیرازی در درجه حرارت‌های ۴ و ۱۰ درجه سلسیوس در مدت ۱۴ روز است. در همه غلظت‌های فوق خواص حسی قابل‌قبولی مشاهده گردید. در غلظت ۰/۰۳ درصد اثر ضدباکتریایی قوی مشاهده گردید. ضریب همبستگی غلظت اسانس آویشن شیرازی با لگاریتم تعداد باکتری مورد مطالعه در دماهای ۴ و ۱۰ درجه سلسیوس به ترتیب ۰/۷۰۱- و ۰/۵۹۹- بود، که نشان می‌دهد با افزایش غلظت اسانس، میزان رشد باکتری در طی دوره نگهداری کاهش می‌یابد و از نظر آماری اثر اسانس بر روی رشد باکتری معنی‌دار بود ($p < 0/01$). یافته‌های این مطالعه نشان‌دهنده این است که جمعیت باکتری *E. coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش بیشتری نسبت به نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد (دمای یخچالی نامناسب) داشتند که این مسأله نشان‌دهنده نقش مفید نگهداری در شرایط سرد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آویشن شیرازی، اسانس، *E. coli* O157:H7، گوشت چرخ کرده

مقدمه

و آنتی‌اکسیدان که اکثر اوقات سنتتیک هستند استفاده می‌شود (Imaida, 1983). این در حالی است که امروزه مصرف کنندگان نیز آگاهی بیشتری در مورد عوارض استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی پیدا کرده‌اند و تقاضای غذاهای تازه‌تر، طبیعی‌تر و همراه با کنترل بیشتر را دارند.

مکانیسم اثر ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی به خاصیت آب‌گریزی آنها برمی‌گردد که موجب نفوذ این مواد به فسفولیپیدهای غشاء سلول باکتری و باکتری‌ها شده و سبب اختلال در ساختمان‌های آنها و افزایش نفوذپذیری می‌گردد. این مسئله موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر

گوشت و فرآورده‌های گوشتی می‌توانند به‌آسانی با میکروارگانیزم‌های مختلف آلوده شوند و اگر شرایط حمل و نقل و نگهداری آنها مناسب نباشد، منجر به رشد باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زا می‌شود و در نهایت کیفیت کاهش یافته و بهداشت عمومی در معرض خطر قرار می‌گیرد (Vernozy, 2002).

نگهداری در سردخانه معمولاً متداول‌ترین روش نگهداری در گوشت و فرآورده‌های گوشتی محسوب می‌شود. اغلب به‌منظور افزایش مدت زمان نگهداری، از مواد ضد میکروبی

باکتری در سال ۱۹۹۳ در آمریکا نتیجه مصرف همبرگرهای نیم‌پز بود که در اثر مصرف آنها ۶۰۰ نفر دچار بیماری شده و ۴ کودک تلف شدند. همچنین در سال ۱۹۹۶ باعث ابتلای ۵۰۰ نفر در اسکاتلند شد که ۲۰ نفر جان خود را از دست دادند (Mortazavi, 2006).

در این مطالعه، اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر روی *E.coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده گوساله نگهداری شده در یخچال بررسی شد.

مواد و روش‌ها

باکتری مورد مطالعه

سوش *E.coli* O157:H7 (مولد ورو توکسین II)، اهدایی توسط خاشابی از انستیتو تحقیقات میکروبیولوژی اتریش می‌باشد. در ابتدا این کشت لیوفیلیزه در محیط آبگوشت قلب و مغز (BHI) در ۳۵ درجه سلسیوس ۱۸ ساعت، ۲ مرتبه متوالی مورد تجدید کشت قرار گرفت. سپس کشت دوم به میزان ۵ به ۱ با گلیسرین سترون مخلوط شد و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفوژ اپندرف سترون در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

تهیه میزان تلقیح باکتریایی

برای تعیین میزان تلقیح باکتریایی مورد مطالعه، باکتری منجمد داخل میکروسانتریفوژ اپندرف را به محیط آبگوشت BHI منتقل کرده و ۲ مرتبه متوالی در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس از کشت ۱۸ ساعته دوم مقادیر مختلفی به لوله‌های کووت حاوی ۵ میلی‌لیتر آبگوشت BHI سترون اضافه کرده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Milton Roy company, USA) جذب نوری آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید.

محتویات سلولی شده که در نهایت مرگ سلول را دربر خواهد داشت (Bart, 2004 and Nazer, 2005).

تاکنون مطالعات بسیاری در زمینه اثر ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی بر روی میکروب‌های بیماری‌زای مواد غذایی صورت گرفته است اما تحقیقات زیادی بر روی اثر ضد میکروبی آویشن شیرازی بر روی *E.coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده انجام نشده است.

آویشن شیرازی یکی از گیاهان خانواده نعناع می‌باشد که بومی ایران، افغانستان و پاکستان است. از این گیاه در طب سنتی به عنوان آنتی‌سپتیک، ضد اسپاسم و ضد التهاب یاد شده است و به عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی کاربرد فراوانی دارد (Hosseinzadeh, 2000). آویشن شیرازی دارای اثر ضد میکروبی می‌باشد که این اثر به طور عمده مربوط به ترکیبات فنلی آن است (Bart, 2004). هر قدر مقدار مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص ضد میکروبی آن بیشتر خواهد بود. این مواد شامل کارواکرول، اوژنول و تیمول هستند (Bagamboula, 2004 and Bart, 2004). استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی برای مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زای مهم مانند *E.coli* O157:H7 یک ایده ارزشمند در صنعت فرآورده‌های گوشتی به شمار می‌آید.

E.coli O157:H7 یک باکتری فوق‌العاده بیماری‌زا است. این باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری است و دوز بیماری‌زایی آن پایین در حدود ۵۰-۵ ارگانیزم است (Betts, 2000). این باکتری وروتوکسین I و II که سیتوتوکسیک هستند و همچنین همولیزین را تولید می‌کند. می‌تواند به سطح روده چسبیده و در آنجا کلونیزه شود. این باکتری سبب ایجاد کولیت خونریزی‌دهنده، سندروم همولیز ناشی از اورمی (HUS) و ترومبوسیتوپاتیک پورپورا شده و می‌تواند منجر به مرگ شود (karmali, 1989). شیوع بیماری ناشی از این

۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه بود. دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس، سرعت گاز هلیوم ۱/۵ میلی‌متر در دقیقه، انرژی یونیزاسیون شناسگر EI ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سلسیوس بود.

تلقیح باکتری و اضافه نمودن اسانس به گوشت چرخ کرده

مقدار ۲۵ گرم گوشت چرخ کرده به همراه غلظت‌های مورد نظر اسانس آویشن شیرازی و دوز تعیین شده باکتری را در داخل کیسه‌های استریل (bag mixer) به ابعاد ۳۵×۱۹cm قرار داده سپس کیسه‌های استریل را در استوماکر interscience 400vw, France-Model: W (window door/porte fenetre) قرار داده و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق به منظور توزیع یکنواخت اسانس و باکتری در گوشت چرخ کرده یکنواخت گردید، سپس کیسه‌های استوماکر با درب بسته را در دماهای ۴ و ۱۰ درجه سلسیوس به ترتیب دمای یخچالی مناسب و نامناسب به مدت ۱۴ روز نگهداری گردید و از روز صفر، هر ۲ روز یکبار تا روز ۱۴ شمارش میکروبی انجام شد.

آنالیز میکروبی

در زمان‌های مورد نظر، به نمونه‌های گوشت چرخ کرده گوساله (۲۵ گرم) در کیسه‌های استوماکر در شرایط سترون ۲۲۵ میلی‌لیتر آب پیتونه ۰/۱ درصد اضافه کرده و ۲ دقیقه در دمای اتاق توسط استوماکر یکنواخت‌سازی شد و سپس رقت‌های بعدی را با استفاده از لوله‌های رقت حاوی آب پیتونه ۰/۱ درصد به دست آورده و در پلیت حاوی آگار قلب و مغز (BHI) کشت داده و در ۳۵ درجه سلسیوس

همزمان با عمل فوق، نمونه‌برداری از محتویات لوله‌های کووت صورت گرفته و شمارش باکتریایی انجام شد و در نهایت لوله کووت که حاوی 1×10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر بود مشخص گردید. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش با مشخص شدن جذب نوری معادل تقریباً 1×10^8 باکتری در میلی‌لیتر که با کشت دادن سطحی نیز تأیید شد، لوله کووت حاوی تقریباً 1×10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص گردید. سپس از این لوله رقت‌های ده‌تایی تهیه نموده و از این رقت‌ها جهت به دست آوردن دوز تلقیح 10^3 در این آزمایش استفاده شد (Bouchra, 2003 and Rasavilar, 1998).

تهیه و آماده‌سازی گوشت چرخ کرده

مقدار ۵ کیلوگرم گوشت چرخ کرده نمونه‌گیری شد و به اندازه‌های ۲۵ گرمی در داخل پلاستیک‌های استریل بسته‌بندی شد. سپس در آزمایشگاه سازمان انرژی اتمی به منظور استریل نمودن تحت اشعه‌دهی گاما به میزان ۵ کیلوگری (5KGy) قرار گرفت و در تأیید سترون بودن، کشت میکروبی انجام شد.

تهیه اسانس و آنالیز آن

گیاه آویشن شیرازی در فصل تابستان از استان فارس جمع‌آوری شد و توسط هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تهران تأیید نام علمی گردید. اسانس از سرشاخه‌های گیاه توسط دستگاه Clevenger type apparatus به روش تقطیر با بخار داغ تهیه و توسط گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (MS-GC) آنالیز گردید. دستگاه (MS-GC) مورد استفاده از نوع Thermoquest Finnigan با ستون موئینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی

یافته‌ها

نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از GC/MS در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که در جدول آمده، بیشترین ترکیب (۷۱/۱۲ درصد) تشکیل‌دهنده اسانس، کارواکرول (Carvacrol) است.

نتایج بررسی رشد *E. coli* O157:H7 تلقیح‌شده (10^3 cfu/g) در گوشت چرخ‌کرده متأثر از غلظت‌های مختلف (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) اسانس مذکور در طی ۱۴ روز نگهداری در دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد در جدول ۲ و ۳ آمده است.

به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد، لازم به ذکر است که این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد و سپس نتایج در فرم‌های مربوطه ثبت گردید (Thomas, 2004).

آنالیز آماری

ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی حرارت بر روی رشد *E. coli* O157:H7 با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA انجام شد و از نرم‌افزار SPSS 16.0 استفاده گردید. جهت مقایسه بین میانگین‌ها از تست Post Hoc (LSD), Tukey استفاده شد.

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

درصد	اندیس بازدارنده	نام ترکیب
۰/۱۹	۹۳۰	Thujene
۴/۲۶	۹۳۷	Alpha_Pinene
۰/۴۳	۹۷۶	Beta Pinene
۰/۸۵	۹۸۵	Beta myrcene
۳/۳۷	۱۰۲۴	Eucaliptol
۷/۳۴	۱۰۵۵	Gama terpinene
۰/۶۸	۱۰۹۰	Linalool
۰/۴۷	۱۲۳۶	Thymol methyl ether
۰/۴۶	۱۲۴۳	Carvacrol methyl ether
۷۱/۱۲	۱۲۹۹	Carvacrol
۰/۴۱	۱۴۱۸	Trans_Caryophyllen
۲/۳۲	۱۵۸۲	Globulol
۹۱/۹۰	-	جمع

جدول ۲: اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی رشد *E. coli* O157:H7 در گوشت چرخ‌کرده طی ۱۴ روز نگهداری در دمای ۱۰ درجه سلسیوس

روز	تعداد باکتریایی (Log cfu/g) ^A در غلظت‌های مختلف آویشن		
	شاهد	۰/۰۰۵	۰/۰۱۵
۰	۳/۰۵±۰/۰۹	۳/۰۳±۰/۰۵	۳/۰۳±۰/۰۵
۲	۴/۴۲±۰/۳۴	۴/۰۱±۰/۰۷	۳/۰۱±۰/۰۲
۴	۵/۴۲±۰/۳۳	۴/۴۲±۰/۲۷	۳/۱۹±۰/۲۱
۶	۶/۰۶±۰/۰۹	۵/۰۴±۰/۲۱	۳/۴۶±۰/۴۳
۸	۷/۲۸±۰/۵۲	۵/۶۹±۰/۵۱	۳/۵۵±۰/۶۷
۱۰	۸/۰۵±۰/۱۵	۶/۳۸±۰/۲۹	۳/۶۶±۰/۱۷
۱۲	۸/۸۳±۰/۳۵	۶/۸۳±۰/۳۸	۳/۶۵±۰/۸۱
۱۴	۹/۱۶±۰/۶۳	۷/۴۳±۰/۵۳	۳/۸۱±۰/۹۸

A میانگین ± انحراف معیار

جدول ۳: اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی رشد *E. coli* O157:H7 در گوشت چرخ کرده طی ۱۴ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس

روز	تعداد باکتریایی (Log cfu/g) ^A در غلظت‌های مختلف آویشن		
	۰/۰۳	۰/۰۱۵	۰/۰۰۵
۰	۳/۰۳±۰/۰۶	۳/۰۴±۰/۰۶	۳/۰۷±۰/۰۷
۲	۳/۰۷±۰/۰۷	۳/۰۷±۰/۰۷	۳/۰۷±۰/۰۷
۴	۳/۰۵±۰/۰۸	۳/۱۶±۰/۰۴	۴/۱۷±۰/۰۴
۶	۳/۱۲±۰/۰۶	۳/۴۲±۰/۱۵	۴/۷۸±۰/۰۶
۸	۲/۸۶±۰/۰۸	۴/۲۳±۰/۱۲	۵/۲۲±۰/۱
۱۰	۲/۶۲±۰/۱	۴/۸۴±۰/۱	۶/۱۴±۰/۰۷
۱۲	۲/۰۴±۰/۰۶	۵/۲۶±۰/۱۱	۶/۴۶±۰/۱۲
۱۴	۲/۰۳±۰/۰۵	۴/۸۷±۰/۰۷	۶/۸۷±۰/۰۸

A میانگین ± انحراف معیار

بحث و نتیجه گیری

اگرچه مدت‌هاست که اثر بازدارندگی ادویه‌جات، عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی شناخته شده است، اما در سال‌های اخیر توجه زیادی به تأثیر عصاره‌های معطر و اسانس‌های گیاهی و یا مواد مؤثره این اسانس‌ها بر روی عوامل بیماری‌زا و میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی شده است (Valero, 2006; Akgual, 1988; Ali, 1999). بر طبق نتایج این مطالعه، غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس آویشن شیرازی اثر مهاری کمی بر روی رشد باکتری داشت. همان‌طور که در مطالعات انجام‌شده توسط Friedman و همکاران در سال ۲۰۰۲، Marino و همکاران در سال ۱۹۹۹ و Sagdic در سال ۲۰۰۳ نشان داده شده است، اسانس‌های گیاهی اثر ضد میکروبی بر روی *E. coli* O157:H7 داشته‌اند. در مطالعات متعددی گزارش شده است که اثر ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی وابسته به دوز است (Burt, 2004 and Sagdic, 2003) که مطالعه حاضر نیز مؤید این مسأله است. Ozcan و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که با استفاده از روش انتشار دیسکی اسانس آویشن در غلظت ۰/۲ درصد هیچ فعالیت ضد میکروبی بر علیه *E. coli* O157:H7 ندارد، در حالی که در غلظت ۰/۴ درصد فعالیت زیادی دارد.

این مطالعه نشان می‌دهد که در بالاترین غلظت اسانس آویشن شیرازی (۰/۰۳ درصد) در ۴ درجه سلسیوس هر چه مدت زمان نگهداری بیشتر شود میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد ($P < 0/01$). تعداد *E. coli* O157:H7 در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف آویشن شیرازی نسبت به گروه کنترل در دمای ۴ درجه و ۱۰ درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0/05$). در غلظت ۰/۰۳ درصد آویشن شیرازی تعداد *E. coli* O157:H7 در روز هشتم به $2/86 \text{ Log cfu/g}$ در دمای ۴ درجه سلسیوس رسید که این مقدار تقریباً تا انتهای دوره نگهداری بدون تغییر ماند ($P < 0/01$). در دمای ۱۰ درجه سلسیوس جمعیت باکتری مورد نظر در گروه کنترل طی دوره نگهداری سیر افزایشی داشت و در پایان دوره به $9/16 \text{ Log cfu/g}$ رسید اما در غلظت ۰/۰۳ درصد در همین دما جمعیت باکتری، $3/81 \text{ Log cfu/g}$ نشان داده شده است که نشان‌دهنده تأثیر مثبت غلظت اسانس آویشن شیرازی است ($P < 0/01$).

با ۰/۷۰۱ - و ۰/۵۹۹ - بود. منفی بودن این ضریب بدین معنی است که با افزایش غلظت اسانس، میزان رشد باکتری در طی دوره نگهداری کاهش می‌یابد. همچنین نشان داده شد که تأثیر مقادیر مختلف اسانس بر میزان رشد باکتری معنی‌دار می‌باشد (P < ۰/۰۱). بر اساس نتایج به دست آمده، تأثیر معنی‌دار اسانس بر روی رشد باکتری مورد مطالعه نشان داد که اثر بازدارندگی اسانس در ۴ درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌دار (P < ۰/۰۱) افزایش پیدا کرده که این موضوع با یافته‌های بسیاری از محققین هم‌خوانی دارد (Blackburn, 2002; Fujikawa, 2006; Vaiero, 2003). در مطالعه حاضر مشخص گردید دمای نگهداری، مدت زمان نگهداری و غلظت اسانس آویشن شیرازی بر میزان رشد باکتری تأثیر آماری معنی‌داری دارد (P < ۰/۰۱). بنابراین می‌توان اذعان نمود که اسانس گیاه مورد مطالعه می‌تواند به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی و ضدباکتریایی مناسب علیه باکتری‌های گرم منفی از جمله *E. coli* O157:H7 در فرآورده‌های گوشتی مورد استفاده قرار گیرد.

Burt و همکاران (۲۰۰۳) فهمیدند که اسانس آویشن در غلظت‌های پایین مانند ۰/۱۲ و ۰/۲۵ درصد به ترتیب اثر باکتریواستاتیکی و باکتریوسیدی دارند.

به‌علاوه، Sagdic و همکاران (2002) گزارش کردند که اسانس آویشن در غلظت‌های ۰/۵، ۱/۵ و ۲ درصد در نوترینت برات بر روی *E. coli* O157:H7 اثر باکتریوسیدی وابسته به دوز در طی نگهداری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز دارد. کارواکرول و تیمول، دو ترکیب فنلی مهم در آویشن شیرازی هستند که اثر قوی ضد میکروبی آنها توسط محققین نشان داده شده است (Akgul, 1988; Bagamboula, 2004; Bouchra, 2003; Chami, 2004; Lopez, 2005; (Didry, 1994; Periago, 2001).

ماده Gama - terpinene یک ترکیب هیدروکربنی مونوترپنی است که در اسانس آویشن شیرازی و *thyme* وجود دارد و هیچ‌گونه اثر ضد میکروبی در محیط‌های آزمایشگاهی بر علیه *E. coli* O157:H7 بر طبق یافته‌های Burt و همکاران در سال ۲۰۰۵ ندارد. هر چند که Roller و Kisko در سال ۲۰۰۵ یافتند که این ماده فعالیت ضد میکروبی بر علیه *E. coli* O157:H7 در آب سبب دارد.

در مطالعه حاضر، ضریب همبستگی غلظت اسانس با لگاریتم تعداد باکتری در دماهای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برابر

منابع

- Akgul, A. and Kivanc. M. (1988). Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some food borne fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 69:263-268.
- Ali, M., Saleem, M., Akhtar, F., Jahangir, M., Parvez, M. and Ahmad, V. U. (1999). Three p-cymene derivatives from *Zataria multiflora*. *Phytochemistry*, 52: 685-688.
- Burt, s. (2004). Their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *International Food microbiology*, 94:223- 253.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards shigella sonnei and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21: 32-42.

- Betts, C. D. (2000). Controlling *E.coli* O157:H7. *Nutrition and Food Science*, 30: 183–186.
- Blackburn, C.W. and McClure, P.J. (2002). Food borne pathogens, Hazard, Risk analysis and control. CRC press, pp.385- 390.
- Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L. M. I., and Hmamouchi, M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiate against *Botrytis cinera pers.* *Journal of Ethnopharmacology*, 89:165-169.
- Burt, S., Vlieland, R., Haagsman, H. and Veldhuizen, E. (2005). Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157: H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection*, 68: 919–926.
- Burt, S. A. and Reinders, R. D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36:162–167.
- Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J. and Remmal, A. (2004). Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Brazilian Journal of Infectious Disease*, 8: 217-226.
- Didry, N., Dubreuil, L. and Pinkas, M. (1994). Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 69:25-28.
- Friedman, M., Henika P, R. and Mandrell R.E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65: 1545–1560.
- Fujikawa, H. and Morozumi, S. (2006). Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology*, 23: 260-267.
- Hosseinzadeh, H., Ramezani, M. and Salmani, G. (2000). Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora Boiss* extracts in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 73:379-385.
- Imaida, K., Fukushima, S., Shirai, T., Ohtami, M., Nakamish, K. and Ito, N. (1983). Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of gamma-glutamyl trans-peptide-positive for development in the liver of rats. *Carcinogenesis*, 4: 895–899.
- Karmali, M.A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, *Clinical Microbiology Reviews*, pp.15–38.
- López-Malo, A., Alzamora, S. M. and Palou, E. (2005). *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservative and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 99:119-128
- Marilena, M., Carla, B. and Giuseppe, C. (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* measured using a bioluminescent method. *Journal of Food Protection*, 62: 1017–1023.
- Mortazavi, S. A. and Sadeghi Mahoonak, A. R. (2006). *Adams food microbiology*, 3rd E Ferdowsi University of Mashhad Publication, NO: 326, pp.28-29, 293-298. [In Farsi]
- Nazer, A.I., Kobilinsky, A., Tholozan, J.-L. and Dubois-Brissonnet, F. (2005). Combination of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella sv.typhimurium*: a synergistic effect. *Food Microbiology*, 22:391-398.
- Ozkan, G., Sagdic, O., Baydar, N. G. and Baydar, H. (2003). Note: Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. *Food Science and Technology International*, 9: 85–88.
- Periago, P. M. and Moezelaar, R. (2001). Combined effect of nisin and carvacrol at different strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 68:141-148.
- Razavilar, V. and Genigeorgis, C. (1998). Prediction of *Listeria* spp growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in model broth. *International Journal of Food Microbiology*, 40:149-157.
- Sagdic, O. (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36: 467–473.
- Sagdic, O., Kuscu, A., Ozcan, M., and Ozcelik, S. (2002). Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 19:473–480.
- Thomas, L. V., Ingram, R. E., Yu, S. and Broughton, J. D. (2004). Investigation of the effectiveness of Ascopyrone P as a food preservative. *International Journal of Food Microbiology*, 93:319-323.

- Valero, M. and Giner, M. J. (2006). Effect of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 106:90-94.
- Valero, M. and Salmeron, M. C. (2003) Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 73-81.
- Vernozy-Rozand, C., Ray-Gueniot, S., Ragot, C., Bavai, C., Mazuy, C., Montet, M.P., Bouvet, J. and Richard, Y. (2002). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in industrial minced beef. *Letters in Applied Microbiology*, 35:7-11.

Archive of SID