Journal of Food Hygiene, Vol. 9, No. 33 Spring 2019

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2019.543640**

Phytochemical characteristics and antimicrobial effect of *Ziziphora clinopodioides* and *Coriandrum Sativum* seed essential oils and their combination on some food borne pathogenic bacteria

Abbaszadeh, S.[1], Kargozari, M.[2*], Gandomi Nasrabadi, H.[3]

1. MSc Graduate of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Hygiene, University of Tehran, Tehran, Iran
[*]Corresponding Author: mina_kargozari@ut.ac.ir
(Received: 2016/6/5 Accepted: 2018/9/2)

Abstract

Essential oils and their components have known to possess antibacterial effects. In this study the major components of essential oils of *Coriandrum sativum* seeds and aerial parts of *Ziziphora clinopodioides* were identified by means of GC-MS and the effect of different concentrations of them alone and in combination were then investigated in vitro to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against some foodborne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus, Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* using broth microdilution method. The most principle compounds composing Coriander seed essential oil (CEO) were Linalool L, γ-Terpinene, *α*-Pinene, Geraniol acetate, and cymene. Thymol, *α*-Terpineol, Carvacrol, Linalool L and *γ*-Terpinene were the main chemical compounds found in *Ziziphora* essential oil (ZEO). Considering the results of MIC and MBC, *B. cereus* was the most sensitive (MIC 500 ppm, MBC 1000ppm) and *S.* Typhimurium was the most resistant species (MIC 2000ppm and MBC 5000ppm) against CEO. ZEO also showed more antimicrobial effect against Gram-positive bacteria *S. aureus, L. monocytogenes* and *B. cereus* (MIC 500 ppm) compared to Gram-negative bacteria of *E. coli* O157: H7 and *S.* Typhimurium (MIC 1000 ppm). Combination effect of the aforementioned EOs indicated that ZEO+CEO could synergistically suppress the growth of *S. aureus* (MIC 125+250 ppm, 250+125 ppm). The results of this study showed that Ziziphora and Coriander EOs, when used in combination, are more effective against Gram-positive bacterial growth especially against *S. aureus* which is an important bacterial pathogen in the community and has become increasingly resistant to multiple antibiotics.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Phytochemistry, Ziziphora, Coriander, Pathogenic bacteria

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2019.543640

ویژگی‌های فیتوشیمی و اثر ضد میکروبی اسانس کاکوتی کوهی و اسانس بذر گشنیز و ترکیب آن‌ها بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از غذا

سارا عباس‌زاده[۱]، مینا کارگزاری[۲*]، حسن گندمی نصرآبادی[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: mina_kargozari@ut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۵/۳/۱۶ پذیرش نهایی: ۹۷/۶/۱۱)

چکیده

اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آن‌ها دارای اثرات شناخته شده ضدباکتریایی می‌باشند. در این پژوهش ترکیبات عمده اسانس بذر گشنیز (*Coriandrum Sativum*) و سرشاخه‌های هوایی کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides*) با استفاده از سیستم GC-MS شناسایی شده و سپس اثر غلظت‌های مختلف آن‌ها به‌صورت تنها و توأم باهم جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به‌روش ریزرقتِ مایع (Micro-dilution broth) در مورد باکتری‌های بیماری‌زای غذایی *اشریشیا کولای* O157:H7، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* بررسی گردید. نتایج مشخص کرد که بیش‌ترین ترکیبات اسانس بذر گشنیز (CEO) را لینالوئلL، γ-ترپینن، α-پینن، ژرانیول استات، سایمن و در مورد اسانس کاکوتی کوهی (ZEO)، تیمول، α-ترپینئول، کارواکرول، لینالوئلL و γ-ترپینن تشکیل داده‌اند. بر اساس نتایج تعیین MIC و MBC، *باسیلوس سرئوس* حساس‌ترین گونه (MIC معادل ۵۰۰ ppm و MBC معادل ۱۰۰۰ ppm) و *سالمونلا تیفی‌موریوم* مقاوم‌ترین گونه (MIC معادل ۲۰۰۰ ppm و MBC معادل ۵۰۰۰ppm) در برابر CEO بودند. ZEO نیز اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا - مونوسایتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* (MIC معادل ۵۰۰ ppm) در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کولای* O157:H7 و *سالمونلا تیفی‌موریوم* (MIC معادل ۱۰۰۰ppm) نشان داد. بررسی نتایج اثر ترکیبی اسانس‌های مذکور نشان داد که آن‌ها توانستند به‌صورت سینرژیستی (MIC معادل ۱۲۵ ppm+۲۵۰ و ۲۵۰ ppm+۱۲۵) رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را مهار نمایند. به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد CEO و ZEO به‌خصوص هنگامی‌که به‌صورت ترکیبی استفاده شوند، در برابر رشد باکتری‌هایی نظیر *استافیلوکوکوس‌اورئوس* که یکی از پاتوژن‌های مهم به‌شمار می‌رود و به‌طور فزاینده‌ای نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاومت نشان می‌دهد، بسیار اثربخش خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: فیتوشیمی، کاکوتی کوهی، گشنیز، باکتری‌های بیماری‌زا

مقدمه

اسانس‌های روغنی (Essential Oils) جزء ترکیبات Generally Recognized As Safe (GRAS) بوده و توجه بسیاری را در عرصهٔ صنعت غذا به خود جلب کرده‌اند. این موضوع به‌دلیل وضعیت نسبتاً ایمن آن‌ها، پذیرش گستردهٔ آن‌ها توسط مصرف‌کنندگان و امکان بهره‌برداری از آن‌ها به‌عنوان عوامل فراسودمند چندمنظوره می‌باشد (Smaoui *et al.*, 2016). خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های ضدتولید سم (Antitoxigenic) این ترکیبات در فراورده‌های غذایی ثابت شده است (Kakaei and Shahbazi, 2016; Gharibzahedi and Mohammadnabi, 2017).

فیتوشیمی، شاخه‌ای از علم شیمی است که موضوع آن، مطالعهٔ ترکیبات شیمیایی گیاهان است. از جمله این ترکیبات، متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی است. شواهد فیتوشیمیایی از جمله شواهد و صفات مورد استفاده در طبقه‌بندی‌های فیلوژنتیکی هستند، به‌گونه‌ای که در گونه‌های دارای قرابت و خویشاوندی با یکدیگر، ترکیبات مشابهی یافت می‌شود اما همیشه نیز این گونه نیست (Mahdavi *et al.*, 2013). ترکیبات شیمیایی اسانس‌های گیاهی معمولاً شامل ترپن‌ها (مانند ترپینن، *p*- سایمن، لیمونن و سابینن) و ترپنوئیدها (مانند تیمول، کارواکرول و لینالوئول) و در مورد برخی از آن‌ها شامل فنیل‌پروپانوئیدهای آروماتیک (مانند اوژنول و سینامآلدهید) می‌باشد (Burt, 2004). در غالب موارد خاصیت ضدمیکروبی اسانس‌های روغنی از طریق سازوکارهای مختلف از قبیل تخریب غشای دولایهٔ فسفولیپیدی دیوارهٔ سلولی، ایجاد اختلال در عملکرد سیستم‌های آنزیمی و غیر فعال‌سازی و تخریب مادهٔ ژنتیکی تحقق می‌یابد (Atarés and Chiralt, 2016).

گیاه کاکوتی کوهی با نام علمی *Ziziphora clinopodioides* متعلق به جنس زیزیفورا و تیرهٔ نعناعیان (*Labiatae/Lamiaceae*) می‌باشد. این گیاه دارای گونه‌های داروئی و معطرهٔ بسیار ارزشمندی است که تاکنون بالغ بر ۲۵ گونه از این جنس در جهان و ٤ گونهٔ یک ساله و چند ساله در ایران گزارش شده است. کاکوتی در معالجهٔ امراض معده و به‌عنوان ضدعفونی کننده برای رفع سرماخوردگی استفاده می‌شود (Batooli *et al.*, 2012). ترکیبات کاکوتی کوهی فعالیت آنتی‌توموری دارد و رشد نوعی از تومورهای بدخیم را تا ۳۲/٦ درصد و غدد سرطانی را تا ٤۷/۵ درصد کاهش می‌دهد (Chachoyan and Oganesyan, 1996).

گشنیز با نام علمی *Coriandrum Sativum* گیاه علفی یک‌ساله متعلق به خانوادهٔ چتریان (*Apiaceae*) است که دارای خواص متعدد دارویی می‌باشد. مصرف گشنیز در درمان بیماری‌های عفونی مختلف مانند تب تیفوئید توصیه شده است (Laribi *et al.*, 2015).

کاربرد صنعتی اسانس‌های گیاهی بنا به‌دلایل مختلفی همچون حلالیت پائین آن‌ها در آب، فراریت بالا، بوی قوی و قابلیت ناکافی در تأثیر مستقیم روی ریزسازواره‌ها با محدودیت‌هایی مواجه شده است (Gharibzahedi and Mohammadnabi, 2017). بنابراین به هنگام به‌کارگیری اسانس‌های روغنی در صنایع غذایی، استفاده از تکنولوژی ترکیبی (Hurdle technology) نظیر کاربرد توأم اسانس‌های روغنی و اشعه‌دهی و یا بسته‌بندی Modified Atmosphere Packaging (MAP) با هدف دست‌یابی هم‌زمان به

امنیت میکروبی و کیفیت مناسب حسی توصیه شده است (Ayari *et al.*, 2016; Mastromatteo *et al.*, 2009). فن‌آوری‌های نوین همانند انکپسولاسیون اسانس‌های روغنی در نانومولسیون‌ها نیز به‌منظور غلبه بر ضعف‌های کاربردی اشاره شده به‌ویژه تأثیرات سوء ارگانولپتیک، به‌کار گرفته می‌شوند (Gharibzahedi and Mohammadnabi, 2017). در رابطه با کاربرد ترکیبی اسانس‌های گیاهی، میان‌کنش ترکیبات ضدمیکروبی ممکن است از نوع سینرژیستی (هم‌افزایی)، افزایشی، بی‌اثر و یا آنتاگونیستی (هم‌ستیزی) باشد. بنابراین کشف چگونگی این تأثیرات متقابل به هنگام استفادهٔ هم‌زمان دو یا چند ترکیب نگهدارنده جالب توجه است تا بتوان به تأثیر سینرژیستی مطمئن و مناسبی از اسانس‌های طبیعی دست یافت. با توجه به ویژگی‌های ذکر شده برای گیاهان منتخب در این مطالعه و اثرات متنوع آن‌ها، ارزان بودن و قابل دسترس بودن آن‌ها در نقاط مختلف ایران، هدف این تحقیق، بررسی خاصیت ضدمیکروبی اسانس بذر گشنیز و اسانس کاکوتیِ کوهی و هم‌چنین اثر ترکیبی آن‌ها بر تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در محیط آزمایشگاهی بود. کاهش میزان غلظت مورد نیاز این دو ترکیب می‌تواند نهایتاً استفادهٔ عملی و مقرون به‌صرفهٔ آن‌ها را در صنعت غذا به‌همراه داشته باشد.

مواد و روش‌ها

- تهیهٔ اسانس گیاهی و سویه‌های باکتری

گیاه کاکوتی کوهی از مناطق کوهستانی مارمیشو واقع در شهرستان ارومیه در فصل اواخر اردیبهشت و اوایل خرداد ماه پس از گل‌دهی جمع‌آوری شد و نام علمی آن توسط پژوهشکدهٔ گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران تأیید شد. بذر تازهٔ گیاه گشنیز در تیرماه از مغازهٔ عطاری واقع در تهران خریداری شد. اسانس‌گیری از بذر گشنیز و از سرشاخه‌های هوایی گیاه کاکوتی در آزمایشگاه گروه بهداشت مواد غذایی دانشگاه تهران به‌روش تقطیر با بخار داغ توسط دستگاه کلونجر (Germany ،Schatt Duran) انجام شد (Dadalioglu and Evrendilek, 2004).

باکتری‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25922)، *اشریشیا کولای* O157:H7 (ATCC 35218)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (phage type III)، *لیستریا مونوسایتوژنز* (ATCC 19118) و *باسیلوس سرئوس* (ATCC 11778) از پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی، مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه شدند.

- آنالیز کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی (GC-MS) اسانس‌های گیاهی تهیه شده

آنالیز GC-MS اسانس‌های روغنی مربوط به بذر گشنیز و گیاه کاکوتی کوهی با استفاده از یک سیستم GC-MS ترموکوئست Finningan (مجهز به یک ستون کپیلاری 5% HP-5MS ۳۰ m × ۰/۲۵ mm × ۰/۲۵ µm ضخامت فیلم) انجام شد. هلیوم با نرخ جریان ۱/۲ ml/min به‌عنوان گاز حامل به‌کار گرفته شد. برنامهٔ دمایی آون دستگاه GC به‌این صورت تعریف شد: ۳ دقیقه دمای ثابت در ۵۰ درجه سلسیوس، تغییرات ۲/۵ درجه سلسیوس در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۶۵ درجه سلسیوس و اعمال دمای ثابت به‌مدت ٦ دقیقه بود. انرژی یونیزاسیون الکترونی (EI) ۷۰eV با محدودهٔ اسکن ۵۵۰-۳۰ amu مورد استفاده قرار گرفت. حجم

تزریق هم µl ۱ (با نسبت اسپلیت ۱:۲۰) بود. آنالیز اسانس‌های روغنی با استفاده از یک دستگاه GC-MS ترموکوئست Finningan با استفاده از همان ستون کپیلاری و شرایط آنالیتیکال توضیح داده شده انجام شد. ترکیبات اسانس‌های روغنی توسط مقایسهٔ اندیس بازداری (RT) و طیف جذبی با Wiley/NBS (Standard Mass Spectral fragmentation pattern) و NIST (National Institute of Standards and Technology) شناسایی شدند. درصد هر ترکیب از طریق مساحت پیک‌های GC-MS محاسبه شده توسط کامپیوتر تعیین شد (Kakaei and Shahbazi, 2016).

- تهیه میزان تلقیح باکتری

برای تهیه دوز تلقیح به‌روش جذب نوری از باکتری‌های نگهداری شده روی محیط کشت شیب‌دار به محیط آبگوشت BHI (Merck, Germany) انتقال داده و به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. پس از انجام کشت مجدد ۱۸ ساعته، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico, USA) جذب نوری سوسپانسیون باکتریایی در ۶۰۰ نانومتر، روی عدد ۰/۱ تنظیم شد. سپس رقت‌های متوالی تا 10^{-6} تهیه گردید و از طریق انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی آگار BHI از رقت‌های تهیه شده کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و پس از این مدت تعداد باکتری‌ها شمارش شد. کل آزمایش‌ها ۲ مرتبه تکرار شده و میانگین تعداد باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با جذب نوری ۰/۱ به‌ترتیب 1×10^{8}، 2×10^{8}، 7×10^{7}، 8×10^{6} و 6×10^{7} CFU/ml محاسبه گردید. با مشخص شدن این اعداد هر گاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه گردد، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده بوده و می‌توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دل‌خواه را تهیه نمود. در هر مورد تعداد دقیق باکتری تلقیح شده از طریق کشت هم‌زمان باکتری و شمارش تعداد کلونی محاسبه گردید (Rahman and Kang, 2009).

- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و حداقل غلظت باکتری‌کشی

جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (Minimum Inhibitory Concentration) به‌روش ریز رقت مایع از پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ خانه با چاهک ته‌گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر (Sarsted, Inc., USA) استفاده شد. غلظت‌های اسانس بذر گشنیز (صفر (کنترل)، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ppm ۴۰۰۰) و اسانس کاکوتی (صفر (کنترل)، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ppm ۴۰۰۰) در محیط آبگوشت BHI (Merck, Germany) حاوی ۱۰ درصد DMSO (Merck, Germany) تهیه گردیدند. صد میکرولیتر از غلظت‌های مختلف ZEO و CEO به هر چاهک انتقال داده شد و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تک تک باکتری‌های مورد مطالعه نیز اضافه شد، غلظت نهایی باکتری در هر چاهک 5×10^{5} CFU/ml بود که با تهیهٔ رقت‌های متوالی از سوسپانسیون هر باکتری و کشت در پلیت و شمارش تعداد کلونی تأیید گردید. در هر صفحهٔ پلیت یک چاهک بدون تلقیح باکتریایی به‌عنوان کنترل منفی و یک چاهک با تلقیح از کلونی تازهٔ باکتری مورد نظر به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

میکروپلیت‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از اتمام گرمخانه‌گذاری، کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به‌صورت چشمی مشاهده شد (Mohajerfar *et al.*, 2013). برای تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bactericidal Concentration) اسانس کاکوتی کوهی و بذر گشنیز، از تمامی چاهک‌هایی که در آن کدورتی مشاهده نشده بود مقداری برداشت شد و جهت تعیین MBC در محیط کشت آگار مغذی (Merck, Germany) کشت سطحی داده شد. غلظتی از اسانس که در کشت مربوط به آن اثری از رشد باکتری مشاهده نشد MBC تلقی گردید (Tabatabaei Yazdi *et al.*, 2016). به‌منظور تعیین غلظت ترکیبی اسانس‌ها در ستون‌های میکروپلیت‌های ۹٦ خانه اسانس بذر گشنیز (۰، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ppm) و در هر ردیف آن غلظت‌های ثابت اسانس کاکوتی کوهی (۰، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ppm) ریخته شد. سوسپانسیون هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه مطابق روش گفته شده در بالا اضافه گردید و غلظت‌هایی که در آن کدورت باکتریایی مشاهده نشد به‌عنوان MIC ترکیبی در نظر گرفته شد. ارزیابی میان‌کنش دو اسانس از طریق رسم نمودار ایزوبلوگرام با استفاده از مقادیر مختلف MIC صورت گرفت. جهت ارزیابی نوع میانکنش یا اثر ترکیبی ZEO و CEO شاخص FIC index (Fractional inhibitory concentration) از رابطهٔ زیر محاسبه شد:

رابطهٔ شماره (۱)

$$FIC = \frac{\text{MIC اسانس بذر گشنیز درحالت ترکیبی}}{\text{MIC اسانس بذر گشنیز به تنهایی}} + \frac{\text{MIC اسانس کاکوتی درحالت ترکیبی}}{\text{MIC اسانس کاکوتی به تنهایی}}$$

در رابطهٔ فوق، در صورتی‌که مقدار شاخص FIC مربوط به ترکیبات ضدمیکروبی کوچکتر از یک باشد، میان‌کنش ترکیبات ضدمیکروبی از نوع سینرژیستی، اگر برابر یک باشد اثر ترکیبی از نوع افزایشی و در صورتی‌که بزرگتر از یک باشد، میان‌کنش ترکیبات از نوع بی‌اثر و یا آنتاگونیستی (Antagonistic) خواهد بود (Pajouhi *et al.*, 2010).

- ارزیابی آماری

میانگین نتایج حاصل از ۳ تکرار در هر گروه با استفاده از نرم‌افزار SPSS18 و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه با سطح اطمینان ۹۵٪ به‌روش دانکن برای مقایسه معنی‌داری اختلاف میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمودارهای مربوطه نیز به‌وسیله نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 رسم شد.

یافته‌ها

- فیتوشیمی اسانس‌های گیاهی استفاده شده

نتایج آنالیز فیتوشیمی اسانس بذر گشنیز و کاکوتی کوهی مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از دستگاه GC-MS در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول (۱)- ترکیبات شیمیایی اسانس کاکوتی کوهی و بذر گشنیز شناسایی شده توسط GC-MS

اسانس کاکوتی کوهی			اسانس بذر گشنیز		
شماره	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری (دقیقه)	شماره	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری (دقیقه)
۱	*α*-Thujene	۰/۲۵	٦/۱۹	۱	*α*-Pinene	۷/٤٤	٦/٤٤
۲	*α*-Pinene	۱/۳۸	٦/٤۲	۲	Camphene	۰/۱۱	٦/۹۱
۳	Camphene	۰/٤٤	٦/۹۱	۳	Sabinene	۰/۲۲	۷/۸۱
٤	*β*-Pinene	۰/۱٤	۷/۹۱	٤	*β*-Pinene	۰/۷۲	۷/۹۱
٥	*β*-Myrcene	۰/٦۳	۸/٤۹	٥	*β*-Myrcene	۰/۳٦	۸/٤۹
٦	*α*-Phellandrene	۰/۱۱	۸/۹۹	٦	Octanal	۰/۱۰	۸/۹٤
۷	*α*-Terpinene	۰/۸٥	۹/٥۰	۷	Cymene	۲/٥۷	۹/۸۳
۸	Cymene	۳/۰۲	۹/۸۷	۸	*Δ*-Limonene	۰/۲۷	۹/۹۹
۹	1,8-Cineole	۲/٥٦	۱۰/۱۰	۹	*γ*-Terpinene	۷/۸۳	۱۱/۳٤
۱۰	Trans-β-Ocimene	۰/۳۰	۱۰/۸۷	۱۰	*trans*-Sabinene hydrate	۰/۰٥	۱۱/٦۸
۱۱	γ-Terpinene	٤/۱۰	۱۱/۳٥	۱۱	*cis*-Linalool oxide	۰/۱۸	۱۱/۹۱
۱۲	*cis*-Sabinene hydrate	۰/۳۲	۱۱/٦۸	۱۲	1-Octanol	۰/۲۳	۱۲/۱۳٥
۱۳	*cis*-Linalool oxide	۰/٤۸	۱۱/۹۰	۱۳	Linalool L	٦٥/۰٤	۱۳/۷۲
۱٤	*trans*-Linalool oxide	۰/٥۸	۱۲/٥۹	۱٤	(+)-Camphor	۰/۲۹	۱٥/۱۱
۱٥	Linalool L	٤/۱۲	۱۳/۳۱	۱٥	Citronella	۰/۳۱	۱٥/٥۹
۱٦	Camphor	۰/۹٥	۱٥/۰٥	۱٦	Borneol L	۰/۱٤	۱٦/۱۳
۱۷	Borneol L	۲/٦٥	۱٦/۱٦	۱۷	Terpinen-4-ol	۰/۲۱	۱٦/٦٥
۱۸	Terpinen-4-ol	۱/۲٤	۱٦/٦۷	۱۸	Decanal	۰/۸٦	۱۸/۰۰
۱۹	*α*-Terpineol	۷/۳۱	۱۷/٤٥	۱۹	*β*-Citronellol	۰/۳۰	۱۹/۲٤
۲۰	Citronellol	۰/۳۷	۱۹/٦۰	۲۰	Geraniol	۰/٦٦	۲۰/٦۳
۲۱	Carvacrol Methyl Ether	۰/٥۹	۱۹/۹۸	۲۱	(*E*)- 2-Decenal	۰/۹۰	۲۰/۹۰
۲۲	Z-Citral	۰/۱۲	۲۰/۲۰	۲۲	Cyclodecane	۰/۱۳	۲۱/٥۳
۲۳	Linalyl acetate	۰/۳۳	۲۰/٦۳	۲۳	Undecanal	۰/۱٦	۲۳/۰۸
۲٤	Geraniol	۲/٤۷	۲۱/۱۳	۲٤	Neryl acetate	۰/۱۹	۲٥/٥٤
۲٥	3,7-Dimethyl-2,6-octadienal	۰/۱٦	۲۱/۷۲	۲٥	Geraniol acetate	٤/۷۸	۲٦/۳۸
۲٦	Bornyl acetate	۰/۳۸	۲۲/۲۹	۲٦	Tridecanal	۰/۲۲	۲۷/۲٦
۲۷	Thymol	٤۱/۷۰	۲۳/۲۳	۲۷	trans-caryophyllene	۰/۱۱	۲۷/٥٥
۲۸	Carvacrol	٥/۳۹	۲۳/٤۷	۲۸	3-dodecen-1-al	۲/۲۸	۲۹/۳٥
۲۹	(+)-2-Carene	۰/٤٥	۲٥/۱۱	۲۹	β-Tumerone	۱/۲۳	۳٥/٦۳
۳۰	Eugenol	۰/۱۲	۲٥/۳٦	۳۰	α-Tumerone	۰/۳۷	۳٦/٦٦

ادامه جدول (۱)- ترکیبات شیمیایی اسانس کاکوتی کوهی و بذر گشنیز شناسایی شده توسط GC-MS

اسانس کاکوتی کوهی			اسانس بذر گشنیز		
شماره	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری (دقیقه)	شماره نام ترکیب	درصد	زمان بازداری (دقیقه)
۳۱	Piperitenone oxide	۰/۲۷	۲۵/۶۶			
۳۲	Copaene	۰/۰۹	۲۵/۹۴			
۳۳	Geranyl acetate	۱/۶۰	۲۶/۴۰			
۳۴	*trans*-Caryophyllene	۲/۰۴	۲۷/۶۰			
۳۵	Germacrene	۰/۱۲	۲۷/۹۴			
۳۶	(+)-Aromadendrene	۰/۱۴	۲۸/۲۹			
۳۷	γ-Muurolene	۰/۴۴	۲۹/۶۸			
۳۸	Germacrene	۰/۷۰	۲۹/۸۱			
۳۹	γ-Muurolene	۰/۴۳	۳۰/۲۹			
۴۰	γ-Cadinene	۰/۵۹	۳۰/۹۵			
۴۱	Δ-Cadinene	۰/۸۷	۳۱/۲۶			
۴۲	*cis*-α-Bisabolene	۰/۸۷	۳۱/۹۰			
۴۳	Valencene	۰/۱۶	۳۲/۱۴			
۴۴	*cis*-Geraniol	۰/۱۷	۳۲/۴۷			
۴۵	Nerolidol	۱/۲۸	۳۲/۶۲			
۴۶	(+)- Spathulenol	۰/۱۱	۳۳/۰۴			
۴۷	Caryophyllene oxide	۰/۸۸	۳۳/۱۵			
۴۸	Geranyl propionate	۰/۰۸	۳۳/۷۶			
۴۹	α-Cadinol	۰/۶۱	۳۴/۹۵			
۵۰	Caryophyllenol-II	۰/۱۹	۳۵/۸۵			
	مجموع	۹۸/۱۵			۹۸/۲۷	

ترکیبات غالب به‌صورت پررنگ نمایش داده شده‌اند.

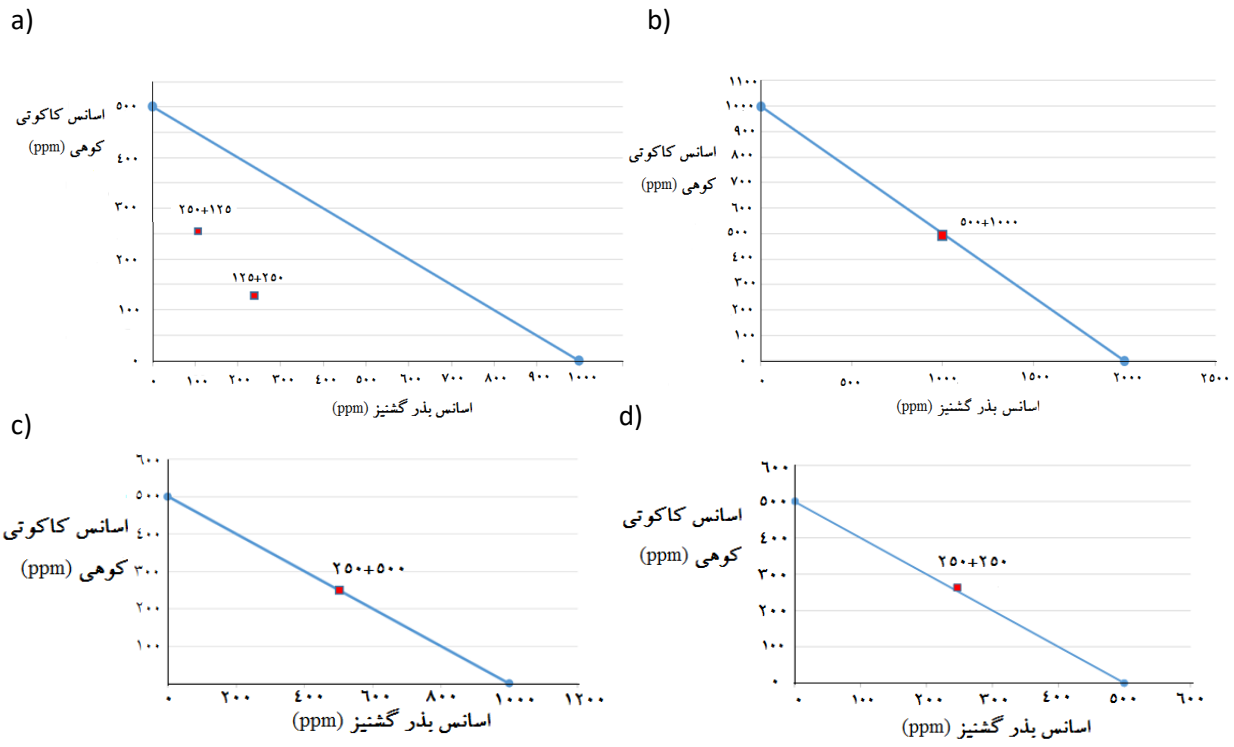
- بررسی تأثیر CEO و ZEO و اثر توأم آن‌ها بر پاتوژن‌های غذایی

همان‌طور که در جدول (۲) مشخص شده، اثر ضدمیکروبی روغن اسانسی بذر گشنیز و اسانس کاکوتی کوهی برعلیه تعدادی از بیماری‌های منتقله از غذا مشهود است.

جدول (۲)- MIC (ppm) و MBC (ppm) اسانس کاکوتی کوهی و اسانس بذر گشنیز به‌صورت مجزا و ترکیبی

گونه‌های باکتری	MIC (ZEO)	MBC (CEO)	MIC (ZEO)	MBC (ZEO)	MIC (ZEO+CEO)	اندیس FIC	اثر ترکیبی
اشریشیا کولای O157:H7 (ATCC 35218)	۲۰۰۰	۳۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰+۱۰۰۰	۱	افزایشی
استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25922)	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۵۰+۱۲۵ و ۱۲۵+۲۵۰	۰/۵۶	سینرژیستی
سالمونلا تیفی‌موریوم (phage type III)	۲۰۰۰	۵۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰+۱۰۰۰	۱	افزایشی
لیستریا مونوسایتوژنز (ATCC 19118)	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۵۰+۵۰۰	۱	افزایشی
باسیلوس سرئوس (ATCC 11778)	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۵۰+۲۵۰	۱	افزایشی

نوع اثر ترکیبی اسانس‌ها از طریق محاسبه شاخص FIC بررسی شد (جدول۲). هم‌چنین نوع اثر ترکیبی از طریق رسم نمودارهای ایزوبلوگرام مشخص گردید (نمودار ۱).



نمودار (۱)- ایزوبلوگرام مربوط به اثر ترکیبی اسانس‌های کاکوتی کوهی و بذر گشنیز علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (a)، *اشریشیا کولای* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* (b)، *لیستریا مونوسایتوژنز* (c) و *باسیلوس سرئوس* (d).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیشترین ترکیبات اسانس بذر گشنیز را لینالوئول L (٦٥/٠٤)، γ-ترپینن (٧/٨٣)، α-پینن (٧/٤٤)، ژرانیول استات (٤/٧٨) و سایمن (٢/٥٧) تشکیل داده است. طبق یافته‌های یک پژوهش، ترکیب غالب اسانس گشنیز لینالوئول (٦٨درصد) گزارش شده که با نتیجهٔ تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد (Bakkali *et al.*, 2008). هم‌چنین طبق یافته‌های یک مطالعهٔ دیگر اسانس بذر گشنیز حاوی ۳۵ ترکیب بوده که مهم‌ترین آن‌ها لینالوئول (۳۷/۷ درصد)، ژرانیول استات (١٧/٦درصد) و γ-ترپینن (١٤/٤درصد) بود و روغن اسانسی برگ گشنیز عمدتاً حاوی اسیدهای آروماتیک (شامل ترکیب اصلی ۲-دکانوئیک اسید) (۳۰/۸ درصد) بوده است (Bhuiyan *et al.*, 2009). در حالی‌که در مطالعه سایر محققین، D-کارون (٣٤/٥٠درصد) و لیمونن (٢٠/٧٠درصد) ترکیبات عمدهٔ اسانس بذر گشنیز جمع‌آوری شده از استان گرگان را تشکیل می‌داده است (Ghaderi *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای دیگر روی اسانس بذر گشنیز چنین یافت شد که ترکیب عمدهٔ گشنیز α-پینن است که خواص ضدمیکروبی دارد (Broomand *et al.*, 2009) که این نتایج با نتایج مطالعهٔ حاضر تطابق ندارد.

هم‌چنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در مورد اسانس کاکوتی کوهی، تیمول (٤١/٧٠)، α-ترپینئول (٧/٣١)، کارواکرول (٥/٣٩)، لینالوئول L (٤/١٢) و γ-ترپینن (٤/١٠) ترکیبات اصلی در پروفیل ترکیبات شیمیایی بودند. نتایج مطالعه‌ای نشان داد که به‌ترتیب کارواکرول، تیمول، p-سایمن و γ-ترپینن ترکیبات شیمیایی اصلی *Ziziphora clinopodioides* جمع‌آوری شده از منطقهٔ گیلان غرب استان کرمانشاه بوده‌اند که با نتایج پژوهش حاضر مشابه است (Kakaei and Shahbazi, 2016). با این حال عنصر اصلی در تعدادی از گیاهان خانوادهٔ نعناعیان از جمله کاکوتی، پولگون (Pulegone) معرفی شده است که این موضوع با نتایج ما هم‌خوانی ندارد. پولگون با فرمول بستهٔ $C_{10}H_{16}O$ یک مونوترپن اکسیژن‌دار حلقوی و نوعی ترکیب کتونی است (Smith-Palmer *et al.*, 2001; Ozturk and Ercisli, 2007). گیاهان خانوادهٔ نعناعیان انعطاف اکولوژیکی بسیار زیادی نسبت به اقلیم متنوع دارند و تغییرپذیری ترکیبات شیمیایی گونه‌های یکسان گیاهی را می‌توان علاوه بر سن گیاه، به اکوتایپ (Ecotype) و سایر عوامل محیطی نسبت داد (Shahbazi *et al.*, 2016). عوامل محیطی سبب تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و نیز کمیت و کیفیت مواد موثرهٔ آن‌ها نظیر آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها، اسانس‌ها و امثال آن‌ها می‌گردد (Mahdavi *et al.*, 2013).

نتایج MIC و MBC در مورد CEO در بازهٔ ppm ۵۰۰۰-۵۰۰ قرار داشت که در مطالعات سایر محققین نیز مقادیر مشابه گزارش شده است (Fernandes *et al.*, 2016; Silva and Domingues, 2017). رشد تمامی سویه‌های مورد مطالعه توسط CEO در مقادیر مختلف مهار شدند. *باسیلوس سرئوس* حساس‌ترین سروار (MIC معادل ppm ۵۰۰ و MBC معادل ppm۱۰۰۰) و *سالمونلا تیفی‌موریوم* مقاوم‌ترین سروار در برابر CEO بود که MIC معادل ppm ۲۰۰۰ و MBC معادل ppm ۵۰۰۰ نشان داد. گزارشات فراوانی مبنی بر تأثیر ضدباکتریایی اسانس بذر گشنیز وجود دارد و در برخی از این مطالعات چنین بیان شده است که باکتری‌های

گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به CEO دارند که این موضوع با نتایج ما سازگار بود (Goncharenko and Timoshchenko, 2014). علّت حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی می‌تواند به‌دلیل وجود غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی باشد که سبب محدود شدن انتشار اجزای آبگریز اسانس به لایهٔ لیپوپلی‌ساکارید می‌شود. یافته‌های مطالعه‌ای چنین نشان داده که CEO تأثیر بیشتری بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گونه‌هایی از باکتری گرم منفی *Xanthomonas* نشان داد و فعالیت اندکی بر علیه جدایه‌های *سودوموناس* داشت (Astrup and Brand-Miller, 2012). برخلاف این نتایج، در یک مطالعه نشان داده شده که CEO بر باکتری‌های گرم منفی تأثیرگذار بوده اما هیچ تأثیری بر باکتری گرم مثبت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نداشت (Wang *et al*., 2016). هم‌چنین مساوی بودن مقادیر MIC و MBC در مورد *لیستریا مونوسایتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشانگر ماهیت باکتری‌کشی CEO در مورد این باکتری‌ها بود (MIC و MBC معادل ۱۰۰۰ppm). باور بر این است که فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی مبتنی بر اجزای ترکیبی عمدهٔ آن‌ها و غلظت این ترکیبات می‌باشد. با این‌حال ترکیبات کم‌مقدار نیز می‌توانند در فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های روغنی نقش داشته باشد (Silva and Domingues, 2017).

در تحقیق حاضر ZEO اثرات مهارکنندگی بیشتری نسبت به CEO در برابر باکتری‌های مورد بررسی به استثنای *باسیلوس سرئوس* نشان داد که در مورد باکتری مذکور ZEO و CEO تأثیرات مهارکنندگی و باکتری‌کشی یکسانی بروز دادند ($p<0.05$). هم‌چنین مقادیر MIC و MBC در مورد *اشریشیا کولای* O157:H7 و *سالمونلا تیفی‌موریوم* یکسان بوده و بیان‌گر خاصیت باکتری‌کشی ZEO در مورد این باکتری‌ها بود. نتایج یک مطالعه نشان داد که عصارهٔ کاکوتی کوهی مانع از رشد باکتری‌های گرم منفی *کلبسیلا نومونیه* و *اشریشیا کولای* O157:H7 گردیده؛ در حالی‌که این عصاره در مقابل باکتری گرم منفی دیگر *سودوموناس آئروژینوزا* فعالیت ضدباکتریایی نشان نداد (Salehi *et al*., 2005). چنین گزارش شده که باکتری مذکور به‌طور کلی در برابر اثر مهارکنندگی اسانس‌های گیاهی مقاومت نشان می‌دهد (Raut and Karuppayil, 2014). نتایج حاصل از پژوهشی دیگر در رابطه با اثر ضدمیکروبی اسانس کاکوتی بر باکتری‌های گرم مثبت نشان داد که از میان باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش، *لیستریا مونوسایتوژنز* بیشترین حساسیت (MIC معادل µg ۰/۵/ml) و *باسیلوس سرئوس* کم‌ترین حساسیت (MIC معادل ml/ ۱µg) نسبت به اسانس کاکوتی را دارا بوده است (Soltaninezhad *et al*., 2009) که البته در مطالعهٔ حاضر هر دو باکتری با MIC برابر ml/ ۰/۵µg به یک میزان حساسیت نسبت به ZEO را از خود نشان دادند. عواملی همچون برهم‌کنش‌های میان ترکیبات اسانس‌های گیاهی با اسیدهای چرب، فسفولیپیدها و پلی‌ساکاریدهای غشای سلولی، موجب نفوذپذیری غشاهای باکتریایی شده و در نتیجه افت یون‌ها و محتویات سلولی منجر به مرگ باکتری می‌شود. هم‌چنین دناتوره شدن پروتئین‌های سیتوپلاسمی و غیرفعال شدن آنزیم‌های سلولی، سایر مواردی هستند که مرگ باکتری‌ها را در پی خواهند داشت (Raut and Karuppayil, 2014). با توجه به این‌که طیف گستردهٔ

باکتری‌ها، ساختارهای غشایی و سیتوپلاسمی متفاوتی دارند، تأثیرات اسانس‌های گیاهی بر باکتری‌های گوناگون متفاوت خواهد بود. به‌طور کلی در این تحقیق نتایج حاکی از آن بود که در شرایط آزمایشگاهی، اسانس کاکوتی کوهی و اسانس بذر گشنیز اثرات آنتی‌باکتریال بیشتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* نسبت به باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کولای* O157:H7 و *سالمونلا تیفی‌موریوم* نشان دادند (جدول ۱) به‌طور مشابهی نتایج تحقیقی نشان داد که عصارهٔ برگ گواوا (*Psidium guajava* L.) تأثیر مهارکنندگی روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* داشت در حالی‌که دو باکتری گرم منفی *سالمونلا انتریدیس* و *اشریشیا کولای* نسبت به این عصارهٔ گیاهی مقاومت نشان دادند (Biswas *et al.*, 2013). یافته‌های مطالعه‌ای نشان داد که *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دلیل دارا بودن دیوارهٔ سلولی یک لایه، در مقایسه با میکروارگانیسم‌هایی چون *اشریشیا کلای* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مقابل ترکیبات مختلف حساس‌تر است (Oussalah *et al.*, 2007).

در پژوهش حاضر میزان اندیس FIC ترکیب دو اسانس مورد آزمایش در مورد باکتری‌های *اشریشیا کولای* O157:H7، *سالمونلا تیفی موریوم*، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* برابر با ۱ محاسبه گردید که نشانگر اثر افزایشی و برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر ۰/۵۶ محاسبه شد که نشانگر اثر سینرژیستی اسانس‌های مورد آزمایش می‌باشد (نمودار۱). این نتیجه بسیار حائز اهمیت می‌باشد زیرا باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از پاتوژهای مهم در بیمارستان و جامعه به‌شمار رفته و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاومت نشان می‌دهد (Schaffer and Lee, 2008). همان‌طور که در نمودارهای (۱) مشخص است نقطهٔ مربوط به MIC ترکیبی اسانس‌ها در مورد باکتری‌های مورد *اشریشیا کولای* O157:H7، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* روی خط تراز واقع شده که بیان کنندهٔ اثر افزایشی است. در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* نقطهٔ مربوط به MIC پایین‌تر از خط تراز بوده و در صورتی‌که این نقطه پایین‌تر باشد نوع اثر سینرژیستی را نشان می‌دهد. طبق یافته‌های یک پژوهش، تأثیر سینرژیستی ترکیب اسانس‌های دو گیاه *Myrtus communis* و *Thymus vulgaris* بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* با اندیس‌های FIC به‌ترتیب برابر با ۰/۳۷۵ و ۰/۵۱۲، سینرژیستی و نسبتاً سینرژیستی گزارش شد (Sadiki *et al.*, 2014).

به‌طور کلی نتایج این مطالعه بیانگر اثر ضدمیکروبی اسانس‌های بذر گشنیز و کاکوتی کوهی بر باکتری‌های مورد *اشریشیا کولای* O157:H7، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده است. نتایج بررسی‌های انجام شده در محیط‌های کشت آزمایشگاهی و به‌روش ریز رقت مایع، نشان‌دهندهٔ اثرات سینرژیستی استفادهٔ توأم از اسانس‌های بذر گشنیز و کاکوتی در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و اثرات افزایشی در رابطه با سایر باکتری‌های مورد آزمایش بود. با توجه به تأکید سازمان بهداشت جهانی بر استفاده از مواد نگهدارندهٔ طبیعی در مواد غذایی و نتایج حاصل از این

پـژوهش می‌تـوان انجـام مطالعـات تکمیلـی در جهـت استفاده از اسانس کاکوتی کوهی و اسانس بذر گشنیز را به‌عنـوان ترکیبـات نگهدارنـدۀ طبیعـی در فرآورده‌هـای غذایی پیشنهاد نمود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونـه تعـارض منـافعی بـرای اعلـام ندارند.

منابع

- Astrup, A. and Brand-Miller, J. (2012). Diet composition and obesity. The Lancet, 379(9821): 1100-1101.
- Atarés, L. and Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. Trends in Food Science and Technology, 48: 51-62.
- Ayari, S., Han, J., Vu, K.D. and Lacroix, M. (2016). Effects of gamma radiation, individually and in combination with bioactive agents, on microbiological and physicochemical properties of ground beef. Food Control, 64: 173-180.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils–a review. Food and chemical toxicology, 46(2): 446-475.
- Batooli, H., Akhbari, M., and Hosseinizadeh, S.M.J. (2012). Effect of different distillation methods on quantity and quality of essential oil of two Ziziphora L. species. Journal of herbal drugs, 3(3): 135-146. [In Persian]
- Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D., and Yadav, A. (2013). Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*Psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. International journal of microbiology, DOI: org/10.1155/2013/746165.
- Bhuiyan, M.N. I., Begum, J. and Sultana, M. (2009). Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh. Bangladesh Journal of Pharmacology, 4: 150-153.
- Broomand, A., Hamedi, M., Emamjomeh, Z., Razavi, S.H., and Gholmakani, M.T. (2009). Investigation on the antimicrobial effects of essential oils from dill and coriander seeds on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium. Food Science and Technology Research Journal, 4(1): 59-68. [In Persian]
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International journal of food microbiology, 94(3): 223-253.
- Chachoyan A.A. and Oganesyan G.B. (1996). Antitumor activity of some spices of the family Lamiaceae. Rastitelnye Resursy, 32(4): 59-64.
- Dadalioglu, I. and Evrendilek, G.A. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. Journal of agricultural and food chemistry, 52(26): 8255-8260.
- Fernandes, R., Do Rosario, V. A., Mocellin, M.C., Kuntz, M.G. and Trindade, E.B. (2016). Effects of inulin-type fructans, galacto-oligosaccharides and related synbiotics on inflammatory markers in adult patients with overweight or obesity: A systematic review. Clinical Nutrition, DOI:org/10.1016/j.clnu.2016.10.003.
- Ghaderi S., Falahati-HosseinAbad, A., Sarailoo, M.H., and Ghanbari, V. (2012). Investigation of the components and antibacterial effects of three plant's essential oil Coriandrum sativum, Achillea

millefolium, Anethum graveolens in vitro, Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 14(5): 74-82. [In Persian]

- Gharibzahedi, S. M.T. and Mohammadnabi, S. (2017). Effect of novel bioactive edible coatings based on jujube gum and nettle oil-loaded nanoemulsions on the shelf-life of Beluga sturgeon fillets. International Journal of Biological Macromolecules, 95: 769-777.
- Goncharenko, A. and Timoshchenko, A. (2014). Evaluation of the grain antioxidant activity of winter rye varieties. Russian Agricultural Sciences, 40(5): 303-308.
- Kakaei, S. and Shahbazi, Y. (2016). Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. LWT-Food Science and Technology, 72: 432-438.
- Laribi, B., Kouki, K., M'hamdi, M. and Bettaieb, T. (2015). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. Fitoterapia, 103: 9-26.
- Mahdavi, S.Kh., Asghari, P., Mazandarani, M., Hosseini, S.A., and Human, B. (2013). Evaluation of hypericin in *Hypericum perforatum* L. (Case study: Golestan National Park and Ramian). Eco-phytochemical Journal of Medical Plants, 2: 71-84. [In Persian]
- Mastromatteo, M., Lucera, A., Sinigaglia, M. and Corbo, M.R. (2009). Combined effects of thymol, carvacrol and temperature on the quality of non conventional poultry patties. Meat science, 83(2): 246-254.
- Mohajerfar, T., Hosseinzadeh, A., Akhondzadeh-Basti, A., Khanjari, A., Misaghi, and Gandomi Nasrabadi, H. (2013). Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of *Zataria multiflora* boiss. essential oil and lysozim on *L. monocytogenes.* Journal of Medicinal Plants, 4(44): 70-78. [In Persian]
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food control, 18(5): 414-420.
- Ozturk, S. and Ercisli, S. (2007). Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. Food control, 18: 535-540.
- Pajouhi, M.R., Taajik, H., Akhondzadeh, A., Gandomi Nasrabadi, H., Ehsani, A., and Shokouhi Sabet Jalali, F. (2010). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of oregano (*Mentha longifolia* L.) and cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.) alone and in combination with nisin. Urmia University of Medical Science, 21(4): 324-331. [In Persian]
- Rahman, A., and Kang, S. C., (2009). *In vitro* control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera Japonica* Thunb. Food Chemistry, 116(3): 670-675.
- Raut, J.S., and Karuppayil, S.M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial Crops and Products, 62: 250-264.
- Sadiki, A.Y., Balouiri, M., Barkai, H., Maataoui, H., Koraichi, S.I., and Elabed, S. (2014). Synergistic antibacterial effect of *Myrtus communis* and *Thymus vulgaris* essential oils fractional inhibitory concentration index. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6: 121-124.
- Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhar, F., Nejad-Ebrahimi, S. and Yousefzadi, M. (2005). Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. rigida (Boiss.) RECH. f. from Iran. Biological and pharmaceutical bulletin, 28: 1892-1896.
- Schaffer, A.C. and Lee, J.C. (2008). Vaccination and passive immunisation against Staphylococcus aureus. International journal of antimicrobial agents, 32: S71-S78.
- Shahbazi, Y., Shavisi, N. and Mohebi, E. (2016). Potential application of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin as natural preservatives against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* O157: H7 in commercial barley soup. Journal of Food Safety, 36(4): 435-441.

- Silva, F. and Domingues, F.C. (2017). Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative. Critical reviews in food science and nutrition, 57(1): 35-47.
- Smaoui, S., Hsouna, A.B., Lahmar, A., Ennouri, K., Mtibaa-Chakchouk, A., Sellem, I., *et al*. (2016). Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic Mentha piperita used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat. Meat science, 117: 196-204.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiology, 18(4): 463-470.
- Soltaninezhad, S.H., Mokhtari, T. and Rahbarian, P. (2009). Antibacterial activity of the essential oil and methanolic extract of Ziziphora clinopodioides on some pathogenic bacteria. Microbial Biotechnology, 2(5): 1-6. [In Persian]
- Tabatabaei Yazdi, F., Alizadeh Behbahani, B. Vasiee, A.R., Mortazavi, S.A., and Moradi, S. (2016). Investigation of the extracts antibacterial effect of Hibiscus Sabdariffa against strains of antibiotic resistance on pathogenic bacteria “in vitro”, Iranian Journal of Food Science and Industry, 13(55): 23-31. [In Persian]
- Wang, Y., Xia, Y., Zhang, P., Ye, L., Wu, L. and He, S. (2017). Physical Characterization and Pork Packaging Application of Chitosan Films Incorporated with Combined Essential Oils of Cinnamon and Ginger. Food and Bioprocess Technology, 10(3): 503-511.