

مطالعه تأثیر ضد میکروبی روغنهای فرار برخی گیاهان بر باکتری *E. coli* در پنیر سفید ایرانی

گیتی کریم*^۱ و مجتبی بنیادیان^۲

۱- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

۲- استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

چکیده

هدف از طرح مطالعه مداخله‌ای همراه با شاهد ارزیابی اثر ضد میکروبی روغنهای فرار برخی گیاهان در پنیر می باشد و گیاهان مورد مطالعه، نعناع^۱، ترخون^۲، زیره^۳، پونه^۴ و آویشن^۵ بودند که روغنهای فرار آنها با استفاده از بخار آب استخراج گردید و دو غلظت از روغن فرار هر گیاه مورد استفاده قرار گرفت. (آویشن، ۰/۱ و ۰/۲ درصد و سایر گیاهان ۰/۳ و ۰/۴ درصد).

در این روش از غلظتهای مورد نظر روغنهای فرار گیاهان در پنیرهای پاستوریزه‌ای که از نظر باکتریهای کلیفرم منفی بودند استفاده شد و سپس تعداد $10^6/g$ باکتری *E. coli* به پنیرها تلقیح گردید، همزمان، به تعداد نمونه‌ها پنیرهایی نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که فاقد روغن فرار گیاهان بودند ولی به همان تعداد باکتری به آنها تلقیح شد. نمونه‌ها به همراه شاهد‌ها در دمای $12^\circ C$ به مدت یک هفته نگهداری شدند و در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت از نظر باکتری تلقیح شده مورد شمارش قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری با مقایسه گروههای مورد آزمون از طریق آنالیز واریانس یک طرفه انجام گرفت. نتایج این مطالعه نشانگر بالاترین اثر ضد میکروبی تلقیح شده در پنیر در روغنهای فرار گیاه آویشن بود به‌طوری که غلظت ۰/۱ و ۰/۲ درصد پس از گذشت ۱۶۸ ساعت موجب کاهش باکتری به میزان سه و چهار log نسبت به گروه شاهد شد. پس از آویشن روغنهای فرار گیاهان نعناع، زیره و پونه اثر تقریباً یکسانی بر باکتری تلقیح شده نشان دادند به نحوی که پس از گذشت ۱۶۸ ساعت در غلظتهای ۰/۳ و ۰/۴ درصد کاهش باکتری به میزان ۲ و $2/5 \log$ نسبت به گروه شاهد ایجاد شد. کمترین اثر بر باکتری تلقیح شده در پنیر را روغنهای فرار گیاه ترخون نسبت به سایر گیاهان از خود نشان داد و پس از گذشت ۱۶۸ ساعت کاهش باکتری به میزان ۱ و $1/5 \log$ به ترتیب در غلظتهای ۰/۳ و ۰/۴ درصد نسبت به گروه شاهد موجب شد. نتیجه‌گیری کلی نشان داد که از ترکیبات یاد شده به عنوان یک نگهدارنده و طعم دهنده طبیعی در پنیر و سایر مواد غذایی با توجه به اثر ضد میکروبی مناسب روغنهای فرار گیاهان بررسی شده در پنیر، می‌توان استفاده کرد.

کلید واژگان: روغنهای فرار گیاهان، نگهدارنده طبیعی، پنیر سفید

۱- مقدمه

در دو دهه اخیر به استفاده از مواد نگهدارنده و طعم دهنده طبیعی در مواد غذایی رویکرد وسیعی شده است به‌طوری که حتی در برخی از کشورها تمایل مصرف کنندگان به استفاده از غذاهای حاوی مواد نگهدارنده یا طعم دهنده ساختگی، کاهش یافته است

[۱، ۲]. این امر به دلیل شناخت اثرات زیان‌بار ترکیبات طعم دهنده و نگهدارنده شیمیایی است که به‌طور گسترده‌ای در انواع غذاهای فرآوری شده و آماده مصرف استفاده می‌شود. در بین ترکیبات طبیعی که می‌توانند در مواد غذایی نگهدارنده محسوب شوند به گیاهان و مشتقات آنها بیشتر از سایر ترکیبات طبیعی توجه شده و مطالعاتی بر گیاهان و اثرات ضد میکروبی و خاصیت طعم بخش آنها به مواد غذایی بر حسب نوع عادات غذایی و فرهنگهای مختلف در کشورهای گوناگون انجام گرفته و محصولات نیز از این نوع به بازار عرضه شده است. در دو دهه گذشته اثرات ضد میکروبی گیاهان و ترکیبات آنها مورد توجه

* مسؤول مکاتبات مقاله gkrim@chamran.ut.ac.ir

1. *Mentha piperita*
2. *Artemisia dracunculus*
3. *Carvi carum*
4. *Mentha pulegium*
5. *Thymus vulgaris*

بررسی به عنوان نگهدارنده طبیعی بوده است.

۲- مواد و روشها

۲-۱- روغنهای فرار گیاهان

روغنهای فرار گیاهان مورد مطالعه با همکاری پژوهشکده دارویی جهاد دانشگاهی به روش تقطیر با بخار آب^۸ و به وسیله دستگاه کلونجر^۹ تهیه شد [۱۱]. برای این منظور گیاهان مورد مطالعه در فصل بهار جمع‌آوری شدند و پس از خشک کردن آنها در سایه، روغنهای فرار استخراج گردید. این روغن‌ها در ظروف شیشه‌ای تیره سترون شده تا موقع مصرف در دمای ۴ °C نگهداری شدند.

۲-۲- پنیر

پنیر مورد استفاده در این مطالعه به وسیله کارخانه پنیر سازی شاهد شهرکرد با استفاده از شیر پاستوریزه تهیه می‌شد؛ برای به حداقل رساندن تأثیر نمک موجود در پنیر روی باکتری، از آب نمک ۸ درصد برای تولید این پنیرها استفاده گردید.

۲-۳- باکتری مورد مطالعه

در این مطالعه از باکتری *E. coli K ۱۲* (تهیه شده از گروه میکروب شناسی دانشگاه بریستول انگلستان) استفاده شد. برای انجام آزمون از تعداد 10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر استفاده شد، به این منظور باکتری در دو نوبت متوالی به فواصل ۲۰ و ۲۴ ساعت در محیط کشت آگوشت مغذی کشت و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد. از کشت ۲۰ ساعته رقت تهیه و به روش کشت سطحی روی پلیت، تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید و تعداد مورد نیاز (10^6 / ml) به دست آمد. همچنین به وسیله اسپکتروفتومتر، جذب نوری کشت ۲۰ ساعته باکتری که تعداد میکروارگانیسم در آن تعیین شده بود، در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد که از آن در مراحل بعدی آزمون برای کالیبره کردن باکتری استفاده گردید.

۳- روش کار

ابتدا پنیر با آب نمک ۸ درصد تولید شد و پنیرهایی که از نظر باکتریهای کلیفرم منفی بودند برای شرکت در مطالعه در نظر گرفته شدند. سپس غلظتهای مورد نظر روغنهای فرار گیاهان

بسیاری از محققین قرار گرفته است. اغلب مطالعات در محیط کشت باکتری یا قارچ انجام شده و در سیستمهای غذایی، مطالعه کمتری صورت گرفته است. در ایران با وجود استفاده زیاد از گیاهان سنتی به عنوان طعم دهنده، کمتر پیرامون خواص گیاهان بومی مطالعه شده است. در این میان، اثر ضد میکروبی سیر بیشتر از سایر گیاهان بررسی شده و علت اصلی خاصیت ضد میکروبی آن به ترکیبات سولفور موجود گیاه نسبت داده است [۳].

طی مطالعه کومار و همکاران مشخص شد سیر بیشترین اثر ضد باکتریایی را بر باکتری اشریشیاکلی دارد [۴]. همچنین در مطالعه دیگری اثر ضد قارچی بیشتر سیر تازه نسبت به سیر کهنه مشاهده گردید [۵].

دل کامپو و همکاران (۲۰۰۰) خاصیت ضد میکروبی گیاه مریم گلی را بررسی کردند [۶]، احمد و همکاران (۲۰۰۱) پس از بررسی تأثیر عصاره ۴۵ گیاه سنتی روی برخی از باکتریها و قارچهایی که نسبت به آنتی بیوتیک مقاوم بودند، اثر ضد باکتریایی ۴۰ نوع از آنها و اثر ضد قارچی ۲۴ نوع از آنها را مشاهده کردند. اثر کشندگی عصاره آویشن بر ویبریوپاراهمولیتیکوس^۱ نیز مشاهده شده است [۷]. همچنین روغن گیاهانی مانند گشنیز و ریحان از رشد باکتریهای مثل یرسینیا^۲، لیستریا^۳، استافیلوکوکوس اورئوس^۴ و اشریشیاکلی ممانعت می‌کند [۸]. عصاره الکلی بعضی از گیاهان تیره ترخون رشد باکتریهای مانند اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس^۵ را مهار می‌کند [۹]. عصاره گیاه ترخون از رشد کلستریدیوم پرفرانژنس^۶ در غذا ممانعت می‌کند [۱۰]. ماروتی و همکاران (۱۹۹۴) اثر ضد قارچی خوبی از عصاره روغنی گیاه پونه بر قارچ آسپرژیلوس نایگر^۷ مشاهده کردند [۲].

مطالعه حاضر با هدف بررسی نحوه تأثیر عصاره (روغنهای فرار) گیاهان ترخون، نعنای، پونه، زیره و آویشن بر باکتری اشریشیاکلی صورت گرفت. میکروارگانیسم مورد مطالعه موجب باکترددگی زود هنگام در پنیر سفید ایرانی می‌شود که مبین شرایط غیر بهداشتی در تولید پنیر است، ضمن اینکه اشریشیاکلی شاخص بهداشتی در بسیاری از غذاها از جمله فرآورده‌های شیر می‌باشد. اهداف دیگر این مطالعه ایجاد تنوع در طعم و مزه پنیرهای سفید ایرانی و همچنین امکان استفاده از گیاهان مورد

1. *Vibrio parahaemolyticus*

2. *Yersinia*

3. *Listeria*

4. *Staphylococcus aureus*

5. *Bacillus subtilis*

6. *Clostridium perferingens*

7. *Aspergillus niger*

8. Steam distillation
9. Kelevenger

پنیر نشان دادند؛ به طوری که روغن گیاهان زیره، نعناع و پونه، اثر متوسط و روغن گیاه ترخون اثر ضعیف تری نسبت به سایر گیاهان در کاهش تعداد باکتری تلقیح شده از خود نشان داد. بر اساس نتایج به دست آمده، روغن نعناع با غلظت ۰/۳ درصد پس از یک هفته دو log و با غلظت ۰/۴ درصد ۲/۵ log نسبت به گروه شاهد کاهش بیشتری در تعداد باکتری تلقیح شده در پنیر نشان داد ($P < 0/05$) (شکل ۴). این نتایج برای روغن گیاه زیره به ترتیب ۲ و ۲/۳ log و برای گیاه پونه ۱ و ۲ log محاسبه شد ($P < 0/05$) (شکل ۱ و ۵). همانگونه که ذکر شد روغن گیاه ترخون کمترین تأثیر را در کاهش تعداد باکتری *E. coli* در پنیر داشت به طوری که پس از یک هفته در غلظت ۰/۳ درصد یک log و در غلظت ۰/۴ درصد ۱/۵ log کاهش نسبت به گروه شاهد در تعداد باکتری تلقیح شده مشاهده گردید ($P < 0/05$) (شکل ۲).

(برای هر کدام دو غلظت) در ۱۰۰ g پنیر ایجاد شد (آویشن ۰/۱ و ۰/۲ درصد و سایر گیاهان ۰/۳ و ۰/۴ درصد). این غلظتها بر اساس حداقل غلظت مهار کننده (MIC) ^۱ هر یک از روغنهای فرار در نظر گرفته شد [۱۲]. در هر گروه و برای هر غلظت ۲۵ بسته ۱۰۰ گرمی پنیر در نظر گرفته شد. همزمان ۲۵ بسته ۱۰۰ گرمی پنیر که فاقد روغنهای فرار بودند به عنوان شاهد انتخاب شد. سپس به تیمارها و شاهدها، باکتری *E. coli* به میزان 10^6 باکتری در هر گرم تلقیح شد و بعد از دوخته شدن، بسته ها با دست کاملاً یکنواخت گردید. گروههای تیمار و شاهد به مدت یک هفته در دمای ۱۲ °C نگهداری شد و سپس در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت پس از تلقیح از نظر تعداد باکتری تلقیح شده، با تهیه رقت و کشت روی محیط VRBA به روش مخلوط و دو لایه شمارش شد.

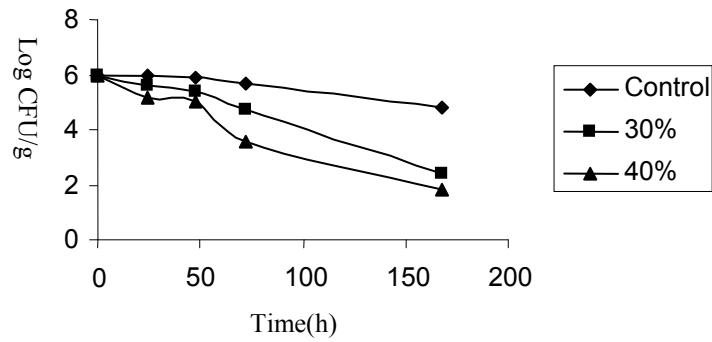
اطلاعات به دست آمده از شمارش باکتری در گروههای تیمار و شاهد به وسیله نرم افزار SPSS و با روش آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) تجزیه و تحلیل آماری شد.

۴- نتایج و بحث

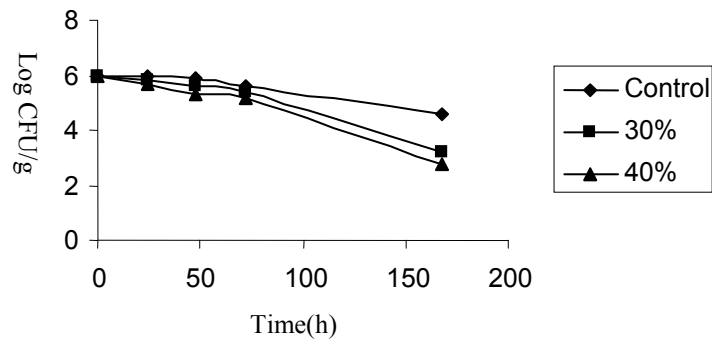
نتایج این مطالعه نشان می دهد که روغنهای فرار گیاهان مورد مطالعه، تعداد باکتری *E. coli* را در گروههای تیمار نسبت به گروه شاهد به طور معناداری کاهش داده است.

روغن فرار آویشن با وجود اینکه با غلظت کمتری استفاده شده بود اثر ضد میکروبی قوی تری از خود نشان داد [۱۲]. به طوری که پس از یک هفته در گروههای تیمار با غلظت ۰/۱ درصد سه log و با غلظت ۰/۲ درصد چهار log کاهش در تعداد باکتری تلقیح شده نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$) (شکل ۳). در مقایسه با سایر گیاهان نیز غلظتهای بکار رفته روغن فرار گیاه آویشن پس از یک هفته تأثیر بیشتری در کاهش تعداد باکتری تلقیح شده در پنیر نشان داد به طوری که غلظت ۰/۱ درصد روغن فرار این گیاه نسبت به غلظت ۰/۳ درصد روغنهای فرار زیره، نعناع، پونه و ترخون به ترتیب ۰/۷، ۰/۵، ۱ و ۱/۶ log کاهش بیشتری در تعداد باکتری دارد ($P < 0/05$) (شکل ۶). همچنین غلظت ۰/۲ درصد روغن فرار گیاه آویشن در مقایسه با غلظت ۰/۴ درصد روغنهای گیاهان نعناع، زیره، پونه و ترخون به ترتیب ۱، ۱/۲، ۱/۵ و ۲ log کاهش بیشتری در تعداد باکتری *E. coli* در پنیر نشان داد ($P < 0/05$) (شکل ۷). روغن فرار سایر گیاهان استفاده شده در این مطالعه نیز اثرات ضد میکروبی در

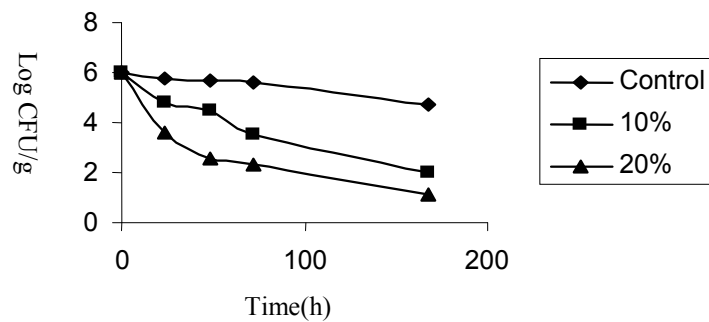
10. Minimum inhibitory concentration



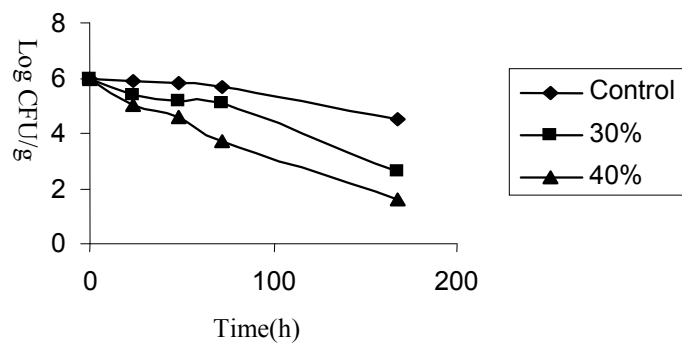
شکل ۱ تأثیر عصاره گیاه زیره روی باکتری *E. coli* در پنیر



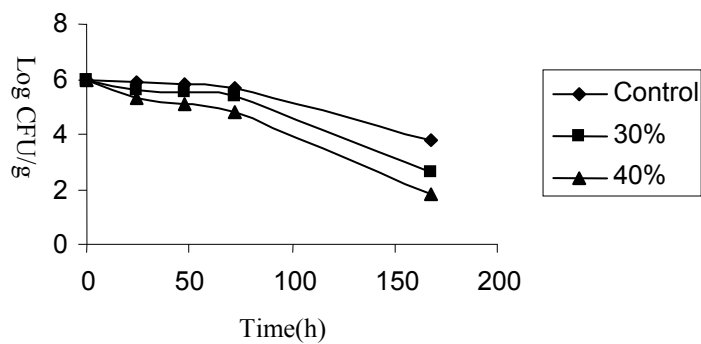
شکل ۲ تأثیر عصاره گیاه ترخون روی باکتری *E. coli* در پنیر



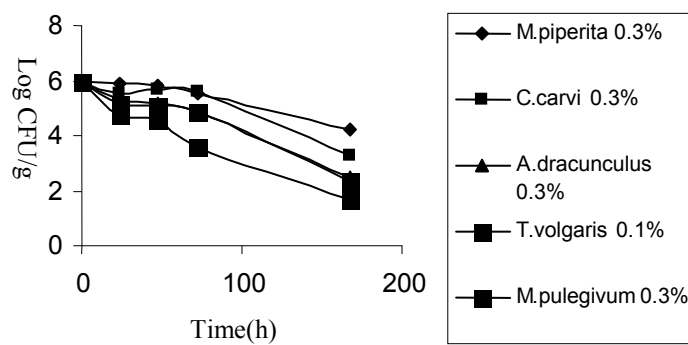
شکل ۳ تأثیر عصاره گیاه آویشن روی باکتری *E. coli* در پنیر



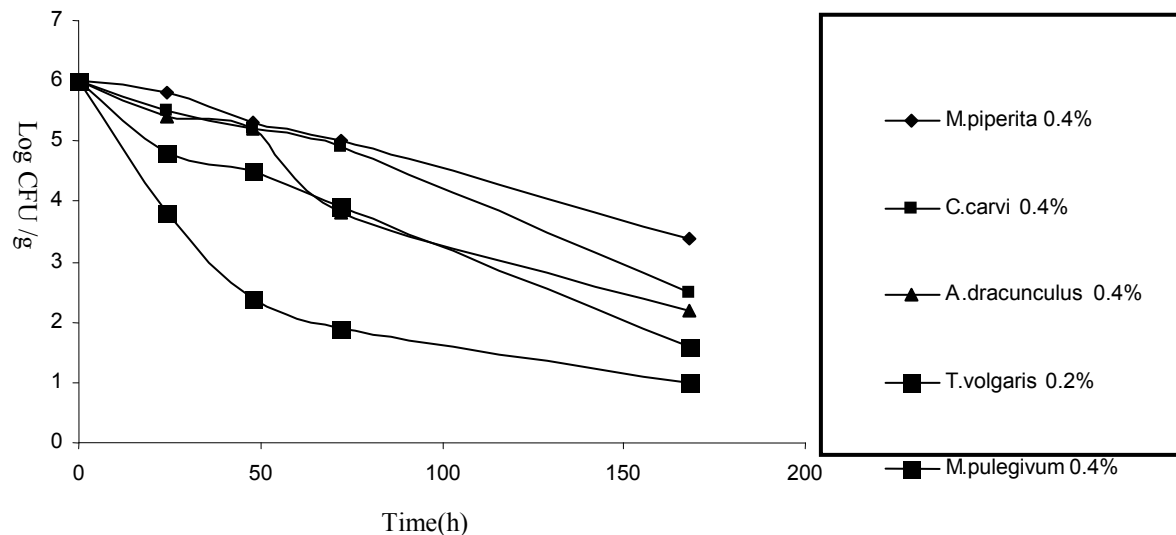
شکل ۴ تأثیر عصاره گیاه نعناع روی باکتری *E. coli* در پنیر



شکل ۵ تأثیر عصاره گیاه پونه روی باکتری *E. coli* در پنیر



شکل ۶ مقایسه تأثیر غلظت اول عصاره گیاهان روی باکتری *E. coli* در پنیر



شکل ۷ مقایسه تأثیر غلظت دوم عصاره گیاهان روی باکتری *E. coli* در پنیر

می‌رسد پونه به عنوان مهار کننده رشد میکروارگانیسمهای گرم منفی قابل استفاده باشد.

مطالعه بر تأثیر روغنهای فرار گیاهانی مثل آویشن و زیره بر باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی، اثر مهار کنندگی بیشتر این گیاهان را بر باکتریهای گرم مثبت نشان داده است [۱۷]. با توجه به گرم منفی بودن باکتری اشیریشیاکلی می‌توان انتظار داشت که در برابر عصاره گیاهان مقاومت بیشتری داشته باشد. با توجه به بررسی کمتر عصاره گیاهان و خواص نگاهدارندگی آنها در سیستمهای غذایی و ارتباط بیشتر مطالعات با تأثیر عصاره‌ها در محیطهای میکروبی شناسی، در این مطالعه از پنیر به عنوان یک سیستم غذایی استفاده شد. بنابر مشاهدات در این آزمایش امکان استفاده از غلظتهای عصاره‌ها در حدود MIC یا کمتر از آن در محیط آبه‌گوشت در پنیر وجود داشت. این امر را می‌توان به وجود نمک در پنیر و pH آن مربوط داشت. این مسئله در مطالعه انجام شده در مورد عصاره گیاه مریم گلی در محیط آبه‌گوشت، برنج پخته و گوشت پخته بر باسیلوس سربوس^۱، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلاتیفی موریوم^۲ به اثبات رسیده است یا به عبارت دیگر، بنابر مشاهدات، وجود نمک و آب در غذا حساسیت باکتریها را نسبت به عصاره گیاه افزایش می‌دهد [۶]؛ علاوه بر این مشاهده شد که عصاره گیاهان در محیط اسیدی تأثیر بیشتری بر روی باکتریها دارند [۱۶-۱۸]. pH پایین و میزان نمک بالا قادر است اثر ضد میکروبی عصاره گیاهان را تقویت

مطالعه روی خاصیت ضد میکروبی گیاهان و عصاره آنها در کشورهای مختلف، انجام شده که از گونه‌های مختلف گیاهی برای طعم بخشی و نگهداری بر اساس فلور گیاهان بومی مناطق مختلف و کام‌پذیری مردم استفاده شده است. در مطالعه روی عصاره زیره، مشاهده شد عصاره روغنی این گیاه بر رشد باکتری *E. coli* در غلظت ۰/۱ درصد اثر مهار کننده دارد [۱۳]. که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

در مطالعه‌ای که به وسیله Hammer و همکاران در سال ۱۹۹۹ روی عصاره روغنی گیاه آویشن صورت گرفت، ممانعت رشد اشیریشیاکلی در محیط آبه‌گوشت در غلظت ۰/۳ درصد این عصاره، مشاهده شد [۱۴]. در این مطالعه با توجه به اینکه از عصاره آویشن روی پنیر استفاده گردید، این تأثیر در غلظت کمتری دیده شد که ممکن است به دلیل وجود سایر عوامل بازدارنده در محیط غذایی باشد.

بررسی اثر ضد میکروبی گیاهان تیره ترخون نشان داد عصاره الکلی این گیاه در غلظت ۵۰۰ mg/ml از رشد اشیریشیاکلی ممانعت می‌کند [۱۵]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که حساسیت اشیریشیاکلی نسبت به عصاره روغنی گیاه ترخون به گونه‌ای بوده است که باکتری در غلظت ۰/۳ درصد عصاره این گیاه یک log و در غلظت ۰/۴ درصد ۱/۵ log کاهش داشته است. در مطالعه‌ای که در مورد چگونگی تأثیر عصاره گیاه پونه بر ویبریوپاراهمولیتیکوس صورت گرفت مهار رشد این باکتری با عصاره گیاه مشاهده شد [۱۶]. در مطالعه حاضر عصاره پونه در غلظت ۰/۴ درصد از رشد اشیریشیاکلی جلوگیری کرد. به نظر

1. *Bacillus cereus*
2. *Salmonella typhimurium*

راهکارهای مناسب برای تنوع تولیدات شیر و بالا بردن کیفیت آنها و در نتیجه ایجاد بازارهای جدید در منطقه باشد.

۵- سپاسگزاری

این مطالعه با پشتیبانی مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و کارخانه شاهد شهرکرد انجام گرفته است. وظیفه خود می‌داند از کمکهای حوزه محترم معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران سپاسگزاری کند. از همکاران محترم در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی برای مشاوره‌های ذیقیمتی که فرمودند بی‌نهایت متشکر است. همکاری صمیمانه همکاران ارجمند در کارخانه شهرکرد را ارج نهاده و از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز به خاطر امکان تهیه میکروارگانیسم مورد مطالعه سپاسگزاری می‌نماید.

کند [۶]. تأثیر عصاره گیاهان بر اشریشیاکلی را به افزایش ویژگی آب‌گریزی ترکیبات سطحی سلولهای باکتری نسبت می‌دهند زیرا به این ترتیب از اتصال باکتری به سلولهای میزبان جلوگیری می‌شود [۹].

با توجه به تأکید بسیاری از پژوهشگران بر استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی [۱، ۱۱، ۱۹]. این مطالعه، به عنوان کوششی در جهت به کارگیری گیاهان برای ایجاد طعم در پنیر و بهره‌گیری از اثر ضد میکروبی این مواد- که علاوه بر دو خاصیت پیش گفته امکان کاستن از میزان نمک در پنیر را فراهم می‌آورند- انجام شد. علاوه بر این کاهش میزان نمک در پنیرهای معطر و طعم‌دار می‌تواند گامی در جهت سلامت افراد در معرض خطر بیماریهای قلبی عروقی نیز باشد. تنوع در طعم پنیر سفید ایرانی صادرات این فرآورده را به کشورهای دیگر نیز افزایش دهد. به این منظور تولید پنیر سفید با استفاده از عصاره گیاهان مختلف بر اساس ذائقه و کام‌پذیری جامعه مصرف‌کننده می‌تواند یکی از

۶- منابع

- [1] Hirokodo, Hirata K, Uematsu Y. 1996. Survey on the quality of natural preservatives used in food processing. Annual Report of Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 47: 157-181.
- [2] Marotti, M. Piccaglia, R Giovanelli, E. 1994. Effect of planting time and mineral fertilization on peppermint essential oil composition and its biological activity. Flavour and Fragrance Journal. 9: 899-902.
- [3] Naganawa, R. Iwata, N. Ishikawa, K. 1996. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur- compound derived from garlic. Applied and Environmental Microbiology. 62: 4238-42.
- [4] Kumar, M. Berwal, J.Z.S. 1998. Sensitivity of food pathogens to garlic. Journal of Applied Microbiology. 84: 213-215.
- [5] Shelef, L.A. Jerrothi, E.K. 1984. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage - containing broth and foods. Journal of Food Science. 94: 737-740.
- [6] Del Campo, J. Amato, M.J. Nguyen, C. 2000. Antimicrobial effect of Rosemary extracts. Journal of Food Protection. 63: 1359-63.
- [7] Ahmad, I. Beg, A.Z. 2001. Antimicrobial and photochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multidrug resistant human pathogens. Journal of Entropharmacol. 74: 113-123.
- [8] Elgayar, M. Draughon, F.A. Golden, D.A. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. Journal of Food Protection. 64: 1019-204.
- [9] Turi, M. Koljalg, S. Milelsaar, M. 1997. Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of E. coli strains of different origin. APMIS 105: 956-962.
- [10] Dong, Jin. Kwon, Jong. Hyun, Park. 1997. Optimal extracting condition of growth inhibitory component of Artemisia princeps against C. perfringens. Agricultural Chemistry and Biotechnology 40: 267-70.
- [11] Walton, M.G. Brown, D.E. 1999. Chemical from plants. Imperial college press 106-108. London
- [۱۲] بنیادیان، م و کریم، گ؛ مطالعه تأثیر روغنهای فرار برخی گیاهان بر باکتریهای E. coli و S. aureus در محیط کشت مایع، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)؛ دوره ۵۷، شماره ۴.
- [13] Farag, R.S. Daw, Z.Y. Hewedi, F.M. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection. 52: 65-667.

- [14] Hammer, K.A. Carson, C.f. Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86: 985–90.
- [15] Smither, G.W. Ballard, FJ. Copland, AD. 1996. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 79: 454–59.
- [16] Beuchat, L.R. 1976. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spice and organic acids. *Journal of Food Science*. 41: 899–902.
- [17] Farag, R.S. Taha, SH. 1990. Use of some essential oils as natural perservatives for butter. *Journal of American oil chemists Society*. 97: 188–191.
- [18] Patrick, F. 2000. *Fundamentals of cheese science*. Wolf Publication.
- [19] Herve, M. Elstathiou, T. Quiblier, JP. 1992. Natural perservative for semi soft processed cheese. *Process Magajine* 1069: 24–29.