بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره آبی گزنه و مرزنگوش بر *Escherichia coli*، *Salmonella typhi* و *Pseudomonas aeruginosa*

الهه شریعت[1*]، هدایت حسینی[2]، رضوان پوراحمد[3]

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین، ورامین، ایران
[2] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، تهران، ایران
[3] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: 1391/8/23 تاریخ پذیرش: 1391/11/11

چکیده

فعالیت ضدباکتریایی (حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی) عصاره آبی گزنه و مرزنگوش در مقابل 3 باکتری بیماری‌زا و عامل فساد مواد غذایی *Escherichia coli, Salmonella typhi* و *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از روش رقت لوله‌ای (Macro Dilution Method) ارزیابی شد. مقدار حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی مرزنگوش بر *Salmonella typhi* mg/ml 1/25 و در مورد *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* برابر با mg/ml 5 مشاهده شد. مقادیر مربوط به عصاره آبی گزنه برای *Salmonella typhi*mg/ml 1/25، *Pseudomonas aeruginosa* mg/ml 5 و *Escherichia coli* mg/ml 2/5 میلی گرم بر میلی لیتر بود. مقادیر حداقل غلظت کشندگی برای عصاره آبی مرزنگوش برای *Salmonella typhi*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* به ترتیب 1/25، 10 و 10 میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد. حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی گزنه بر باکتری ها به ترتیب ذکر شده برابر 2/5، 10 و 20 میلی گرم بر میلی لیتر بود.

واژه‌های کلیدی: گزنه، مرزنگوش، حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC)، حداقل غلظت کشندگی (MBC)، *Escherichia coli*، *Salmonella typhi* و *Pseudomonas aeruginosa*.

* مسوول مکاتبه: elahesshariat@yahoo.com

1- مقدمه

آلودگی میکروبی از عواملی است که باعث کاهش کیفیت و مدت زمان نگه‌داری مواد غذایی می‌شود. با وجود استفاده از انواع مختلف روش های نگه‌داری هنوز مسمومیت غذایی یکی از نگرانی های اصلی برای مصرف کنندگان و تولید کنندگان صنعتی است(13). بنابراین جلوگیری از فساد مواد غذایی از اهمیت بالای برخوردار است. یکی از راه‌های نگه داری مواد غذایی افزودن مواد نگه دارنده به آنها است. سال‌هاست در بسیاری از کشورها از نگه دارنده های مصنوعی در مواد غذایی استفاده می‌شود(16). با افزایش آگاهی مصرف کنند گان از اثرات منفی نگه‌دارنده های مصنوعی بر سلامتی (تبدیل شدن به مواد سمی و سرطان زا در بدن) آنها نگران امنیت غذاهای حاوی این ترکیبات هستند و میزان پذیرش چنین محصولاتی کاهش یافته و تقاضا برای مواد طبیعی به عنوان نگه‌دارنده جدید در غذا رو به افزایش است(12).

گیاهان دارویی از دوران باستان نه تنها به عنوان دارو و عوامل طعم دهنده بلکه به عنوان نگه‌دارنده به مواد غذایی اضافه می شدند. این مواد به دلیل استفاده تاریخی و طولانی مدت بدون گزارش اثرات مضر و همچنین به دلیل مطالعات اختصاصی سم شناسی مطمئن و سالم شناخته شده اند(12و16). عصاره‌های گیاهی به‌طور وسیعی در صنایع غذایی، داروسازی و صنایع آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شوند. ادویه‌ها و گیاهان دارویی دو نقش عمده در مواد غذایی ایفا می کنند: یکی ایجاد طعم و مزه و نقش دیگری در نگه داری مواد غذایی با به تاخیر انداختن فساد با توجه به دارا بودن ویژگی‌های ضد میکروبی و ضد اکسیداسیونی(12). باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق از باکتری‌هایی هستند که عمدتاً باعث فساد مواد غذایی می‌شوند و مسمومیت غذایی ایجاد می کنند.

تیره گزنه شامل گیاهانی علفی، چندساله، به ارتفاع 10-8 سانتی‌متر است. بیشتر اعضای هوایی آن پوشیده از پرز می‌باشد و محل رویش آن شمال، شمال غرب و مرکز ایران است. از واریته-های مختلف گزنه، *Urtica dioica* به‌عنوان گیاه دارویی از زمان‌های بسیار دور مورد توجه قرار داشته‌است. گیاه گزنه در طب سنتی ایران به‌عنوان داروی کمکی در درمان دیابت معرفی شده است. همچنین گزنه به عنوان ضدالتهاب، کاهنده قند خون و فشار خون، مدر، ضد درد، بی‌حس کننده موضعی، رفع التهاب پروستات و رفع اخلاط خونی به‌کار می‌رود. به‌تازگی از این گیاه در درمان بیماری‌های عفونی، کاهش علایم آرتریت و کاهش التهاب مفاصل استفاده شده است. ترکیبات گزنه شامل فلاوونوئیدها، ترکیبات آب‌دوست مانند لکتین و پلی‌ساکاریدها، اسید فرمیک، اسید استیک و اسید بوتیریک است (1).

گیاه مرزنگوش *(Origanum vulgare)* از خانواده *Lamiaceae* گیاهی علفی و چند ساله و بومی ایران است و در نواحی شمال و شمال غرب می‌روید و به نام‌های مرزنگوش وحشی و پونه کوهی نیز شناخته می‌شود. این گیاه حاوی تیمول، کارواکرول،رزمارینیک اسید، بتابیزابول ،کاریوفیلن ، فلاوونوئیدها (لوتیولین، دیوسمین) تانن و ویتامین است. این گیاه در درمان اختلالات گوارشی و نفخ، به‌عنوان ضد آسم، ضد اسپاسم، آرام بخش در طب سنتی استفاده می‌شود(1).

2- مواد و روش‌ها

2-1- تهیه گیاهان

گیاهان مورد بررسی از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شد و در آزمایشگاه فارماگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تعیین هویت گردیدند. پس از تایید گونه های گیاهی برگ‌ها به دور از نور مستقیم خورشید و در دمای اتاق خشک شدند. برگ‌های خشک شده توسط آسیاب برقی به پودری با ذرات کاملاً ریز تبدیل شدند.

2-2 تهیه عصاره آبی

برای تهیه عصاره آبی 1 گرم از پودر خشک گیاهان توزین و به 200 میلی‌لیتر آب در حال جوش اضافه شد. پس از اینکه حجم آب به 100 میلی لیتر رسید، نمونه ها برای مدت 24 ساعت در دمای آزمایشگاه و به‌دور از نور نگه‌داری شدند. عصاره آبی پس از سانتریفوژ کردن محلول حاصل درg 10000 به مدت 14 دقیقه به دست آمد. سپس عصاره حاصل در آون 40 درجه سانتی گراد خشک شد و تا زمان مصرف در دمای 18- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. برای تهیه غلظت مورد نظر از عصاره از آب مقطر استریل استفاده شد(5).

2-3 تهیه استاندارد 0/5 مک فارلند

استانداردهای مک فارلند با افزودن حجم خاصی از محلول اسید سولفوریک 1% ،کلرور باریم 1/175% برای بدست آوردن یک محلول سولفات باریم با دانسیته نوری خاص تهیه می‌شود.

برای تهیه محلول 0/5 مک فارلند، 99/5 میلی لیتر اسیدسولفوریک 1% و 0/5 میلی لیتر کلرور باریم1/175% به کار برده شد. محلول حاصل در طول موج 625 nm جذب معادل 0/13-0/08 داشت. محلول نیم مک فارلند حاصل کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی معادل 10^8 ×1/5 ایجاد می کرد.

2-4- تهیه سوسپانسیون باکتریایی استاندارد

سوش‌های (ATCC 25922) *Escherichia coli*، (ATCC 27853) *Pseudomonas aeruginosa*، (PTCC1609) *Salmonella typhi*، به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران تهیه شد. برای فعال کردن سوش‌ها، ابتدا طبق دستورالعمل و تحت شرایط استریل سر ویال‌ها شکسته و محتوی داخل محیط مایع مغذی Soybean casein digest تخلیه شد. سپس در لوله‌ها با پنبه پوشانده و به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند تا باکتری‌ها رشد کرده و کدورت ایجاد کنند. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر با کمک آنس استریل از محیط مایع برداشت کرده و روی محیط جامد مغذی نوترینت آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به صورت وارونه به مدت 24 ساعت دیگر در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا کلنی‌های لازم ایجاد شوند. از این کلنی‌ها برای تهیه سوسپانسیون استاندارد استفاده شد.

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد از کلنی های رشد یافته 24 ساعته بر روی محیط نوترینت آگار استفاده گردید. سوسپانسیون حاصل برای مطابقت با نیم مک فارلند توسط اسپکتروفتومتر در طول موج 625nm سنجیده شد(3).

2-5- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

8 لوله 13×100 که با درپوش کتانی بسته شده بودند در دمای 120 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه استریل شدند. برای هر عصاره رقت سازی 1:2 انجام شد. 2 لوله به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. کنترل مثبت فقط حاوی محیط کشت مولر هینتون براث و بدون عصاره بود. کنترل منفی حاوی 1 ml عصاره خالص بود. حجم نهایی هر لوله 2 میلی لیتر بود. 5 دقیقه پس از تهیه مایع تلقیح اولیه 1 میلی‌لیتر از آن به لوله‌های حاوی عصاره در غلظت‌های مختلف و کنترل مثبت اضافه شد.0/5 میلی لیتر از کنترل مثبت به 0/5 میلی لیتر از مولر هینتون اضافه شد (ترقیق 1:2). سریعاً 10 میکرولیتر از این تیوپ بر روی محیط مولر هینتون پخش شد. در دمای 2±35 درجه سانتی‌گراد برای مدت 20-18 ساعت گرمخانه گذاری شد. سایر لوله‌ها در دمای 35 درجه سانتی گراد به مدت 20-18 ساعت گرمخانه گذاری شدند. بعد از انکوباسیون، لوله‌ها برای ارزیابی میزان کدورت مورد بررسی قرار گرفتند.کمترین غلظت از عصاره که مانع رشد میکروارگانیسم‌ها شده بود و کدورت قابل مشاهده نداشت به عنوان MIC انتخاب شد(10).

2-6-تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

بعد از تعیین MIC، 0/1 میلی لیتر از محلول لوله‌هایی که در آنها کدورت مشاهده نشده بود به پلیت حاوی مولر هینتون آگار منتقل شد. گرمخانه گذاری در 35 درجه سانتی گراد به مدت 20-18 ساعت انجام شد. کمترین غلظت از عصاره که اجازه رشد به کمتر از 0/1% از تلقیح اولیه (5×10^5cfu/ml) را داده بود به عنوان MBC گزارش شد(10).

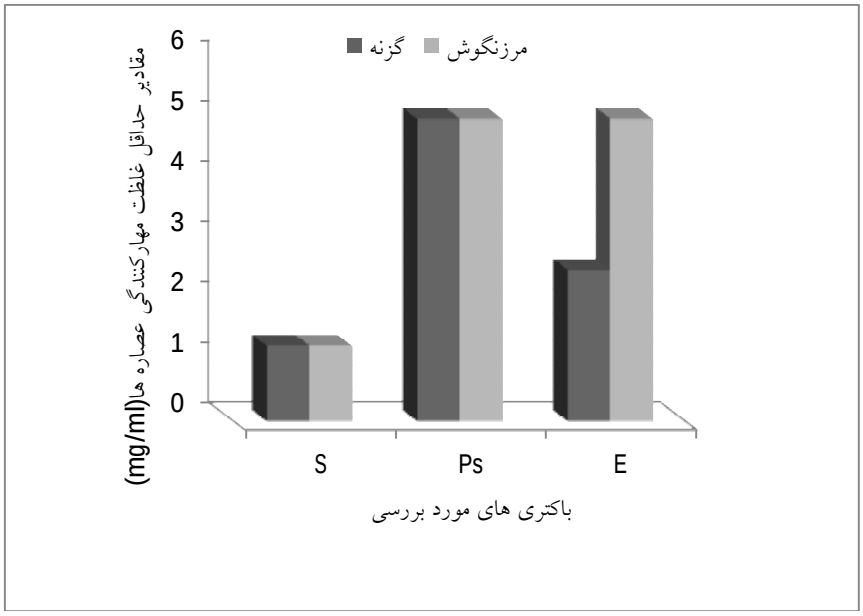
3- نتایج و بحث

در جدول1 نتایج MIC عصاره آبی گزنه و مرزنگوش برای 3 باکتری مورد بررسی در تحقیق حاضر مشاهده می‌شود. در مورد عصاره آبی گزنه مقدار MIC برای باکتری *Salmonella typhi* کمترین مقدار و برابر 1/25 mg/ml و برای *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین مقدار و برابر 5 mg/ml بود. غلظتی از عصاره آبی گزنه که بر *Escherichia coli* خاصیت مهارکنندگی داشت برابر 2/5 میلی گرم بر میلی‌لیتر بوده است. در لوله کنترل منفی که حاوی عصاره بود کدورتی مشاهده نشد. در کنترل مثبت باکتری‌ها رشد کردند و در پلیت رشدی معادل cfu/g 250 مشاهده شد.

در عصاره آبی مرزنگوش مقدار MIC برای باکتری *Salmonella typhi* کمترین مقدار و برابر 1/25 mg/ml و برای *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* برابر با هم و برابر 5 mg/ml بود. در لوله کنترل منفی که حاوی عصاره بود کدورتی مشاهده نشد. در کنترل مثبت باکتری‌ها رشد کردند و در پلیت رشدی معادل cfu/g 250 مشاهده شد.

جدول 1- مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی گزنه و مرزنگوش بر سه باکتری پاتوژن

ردیف	نام باکتری	MIC(mg/ml) مرزنگوش	MIC(mg/ml) گزنه
1	*Salmonella typhi*	1/25	1/25
2	*Pseudomonas aeruginosa*	5	5
3	*Escherichia coli*	5	2/5



شکل1- نمودار مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی گزنه و مرزنگوش

جدول 2- مقدار حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی گزنه و مرزنگوش بر سه باکتری پاتوژن

ردیف	نام باکتری	MBC(mg/ml) مرزنگوش	MBC(mg/ml) گزنه
1	*Salmonella typhi*	1/25	2/5
2	*Pseudomonas aeruginosa*	10	10
3	*Escherichia coli*	10	20

در شکل1حداقل غلظت مهارکنندگی دو عصاره نمایش داده شده است.

مقادیر حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی گزنه و مرزنگوش در جدول2 مشاهده می‌شود. کمترین غلظت کشندگی بر باکتری *Pseudomonas aeruginosa* در غلظت 1/25 از عصاره آبی مرزنگوش مشاهده شد. غلظت موثر بر این باکتری از عصاره آبی گزنه برابر 2/5 میلی گرم بر میلی‌لیتر بوده است. هر دو عصاره در غلظت 10 میلی گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری *Pseudomonas aeruginosa* اثر باکتری کشی داشتند. همچنین مرزنگوش در همین غلظت بر *Escherichia coli* موثر بود ولی عصاره آبی گزنه در غلظت 10 میلی گرم بر میلی‌لیتر بر *Escherichia coli* اثر کشندگی نداشت. به همین دلیل غلظت 20mg/ml مورد آزمایش قرار گرفت. گزنه در این غلظت بر باکتری *Escherichia coli* اثر باکتری کشی داشت. در شکل2 حداقل غلظت کشندگی دو عصاره نمایش داده شده است.

در این پژوهش عصاره آبی مرزنگوش و گزنه بر باکتری‌های *Escherichia coli* (ATCC 25922)، *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)، *Salmonella typhi* (PTCC 1609) اثر مهارکنندگی نشان دادند. عصاره آبی مرزنگوش و گزنه بر هر 3 باکتری گرم منفی در محیط آزمایشگاهی اثر باکتری‌کشی داشتند. عصاره مرزنگوش در غلظت پائین‌تری نسبت به عصاره گزنه خاصیت باکتری کشی داشت. علت این امر می‌تواند در ترکیب متفاوت فنولی این دو عصاره باشد.

خاصیت ضدباکتریایی مرزنگوش در کارهای بسیاری گزارش شده است. اسانس آن اثر باکتری‌کشی بر علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها مانند *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *streptococcus faecalis* و *staphylococcus aureus* دارد که از نظر عملکرد بر *Escherichia coli* با تحقیق حاضر مطابقت دارد(9).

Sahin و همکارانش(2004) نتیجه گرفتند که اسانس مرزنگوش بر روی 10 باکتری از جمله باسیل‌ها، سالمونلا و استافیلوکوکوس و 15 قارچ خاصیت ضدمیکروبی دارد که نتایج این تحقیق با نتایج مذکور در مورد باکتری‌ها مطابقت دارد(12). بر اساس مطالعات Gulcin در سال 2004 عصاره آبی گزنه بر *Pseudomonas aeruginosa* اثر ضدباکتریایی نداشت ولی مانع رشد *Escherichia coli* در محیط آزمایشگاهی شد(6) که در مورد *Pseudomonas aeruginosa* با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت ندارد که می‌توان آن را به تفاوت در روش استخراج و سوش‌های مورد بررسی نسبت داد.

نتایج تحقیق Proesto (2006) نشان‌داد عصاره متانولی گزنه بر باکتری‌های *Bacillus cereus*، *staphylococcus aureus* و *listeria monocytogenes* اثر ضد میکروبی قوی دارد(11). Kavalali در سال 2003 تاثیر عصاره اتانولی گزنه را بر روی باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Salmonella*، *staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* بررسی نمودند. نتایج نشان داد عصاره اتانولی گزنه بر همه باکتری‌ها موثر است(8) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. مطالعات Chun در سال 2005 بر روی عصاره آبی و اتانولی گزنه نشان دهنده موثر بودن هر دو نوع عصاره بر باکتری مورد نظر بود اما تاثیر ضدباکتریایی عصاره60% اتانولی گزنه نسبت به عصاره ی آبی آن بر *Helicobacter pylori* *بیشتر گزارش شد*(5).

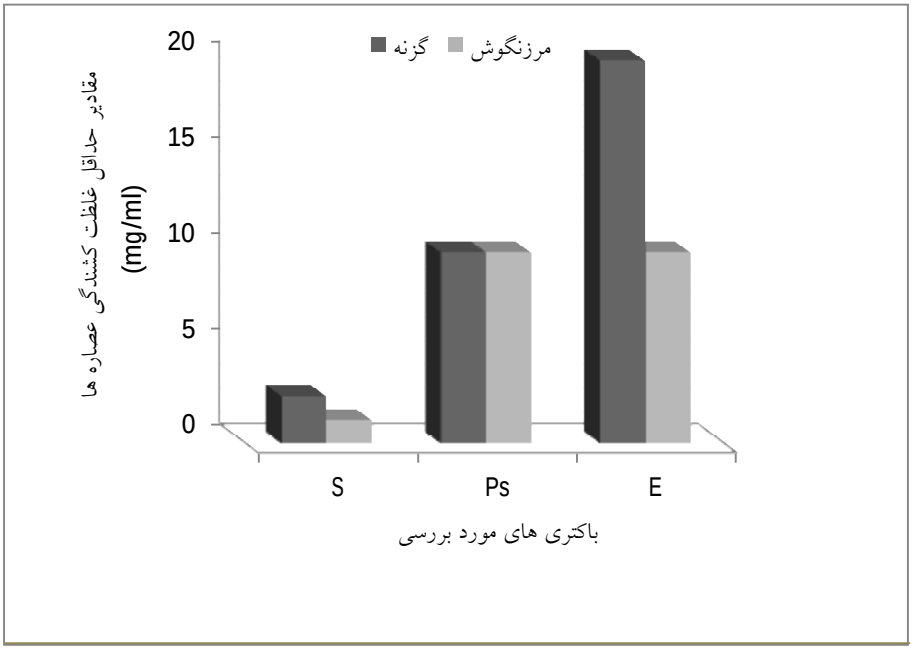
تفاوت در تاثیر عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌ها به عوامل مختلفی وابسته است که از آن میان می‌توان به منطقه جغرافیایی رویش، رقم و سن گیاه ، روش خشک کردن گیاه ، روش استخراج ترکیبات موثره، نوع حلال ، غلظت عصاره و نوع محیط کشت اشاره نمود(5).

گیاهان معطر مانند گیاهان دارویی و ادویه‌ها غنی از ترکیبات فنلی هستند و به طور گسترده‌ای برای افزایش ماندگاری مواد غذایی و در طب سنتی برای درمان بسیاری از بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرند. برخی از ترکیبات فنلی گیاهان تاثیرات آنتی باکتریایی و ضد کپکی نشان داده اند(4).

به طور کلی ترکیبات گیاهی خاصیت ضدمیکروبی خود را از طریق سازوکارهایی چون تجزیه دیواره سلولی(7) ، افزایش اسیدیته سیتوزولی، آسیب به غشای سلولی، آسیب به غشای پروتئین‌ها(15) ، نشت محتویات سلول به خارج ، اختلال در نقل و انتقال پروتون و اختلال در فعالیت آنزیم‌های حیاتی نظیر ATPase و جلوگیری از متابولیسم باکتری(9) اعمال می کنند.

تحقیقات درباره عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان معطر با فعالیت‌های ضدمیکروبی برای کنترل پاتوژن‌ها و یا سم حاصل از میکروارگانیسم‌ها در غذا صورت گرفته‌است(2).

ترکیبات فنلی موجود در مرزنگوش به شرح زیر است:



شکل 2- نمودار مقادیر حداقل غلظت کشندگی عصاره ابی گزنه و مرزنگوش

اسید پروتوکاتچین ، اسید کافئیک ، اسید رزمارینک ، فنیل گلیکوزید، 2 کافئول اکسی -3- اسید پروبیونیک ، تیمول، کارواکرول،کاریوفیلن،Dجرماکرین و ترپینن -4- ال(3).

تیمول و کارواکرول از ترکیبات اصلی مرزنگوش هستند که جز ترکیبات فنلی بوده و اثرات ضدباکتری، ضدقارچی و آنتی اکسیدانی دارند . در مطالعاتی کاریوفیلن و D-جرماکرین به عنوان ترکیبات اصلی مرزنگوش گزارش شدند که فعالیت ضدباکتری و ضدقارچی قابل قبولی دارند (12و 14).

3-1 ترکیبات شیمیایی گزنه

گزنه حاوی تانن، موسیلاژ، پلی‌ساکاریدها، لکتین، نولی فنل، اسید فرمیک، فیتوسرین، لستین، لکتین، مقدار زیادی ویتامین C و نوعی گلیکوزید است(1). برخی ترکیبات فنلی موجود در گزنه که شامل اسید کافئیک، اسید فرولیک، اسید سیناپیک، فیستین و میریسیتین می‌باشد، بر روی باکتری‌هایی مثلا*Escherichia coli* ، *Proteus vulgaris*، *Klebsiella* و *Pseudomonas* اثر دارد و عصاره این گیاه بر روی *Salmonella* و *Proteus* که در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند، خاصیت آنتی‌بیوتیکی دارد. همچنین باعث وقفه در رشد چندین مخمر، کپک، قارچ و باکتری شده است. اثرات ضد قارچی بعضی ترکیبات موجود در گزنه تایید گردیده است (1). تفاوت در غلظت‌های مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های آبی گزنه و مرزنگوش را می‌توان به تفاوت در میزان و نوع ترکیبات فنولی و اسیدهای آلی این دو گیاه نسبت داد.

4- نتیجه‌گیری

در این پژوهش اثر ضدباکتریایی عصاره آبی گزنه و مرزنگوش بر باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به هم-خوانی نتایج MIC و MBC مبنی بر اثر عصاره آبی گزنه و مرزنگوش بر باکتری‌های بیماری‌زا و با توجه به مقبولیت مصرف این گیاهان در جامعه فعلی می توان از این عصاره‌ها به عنوان ترکیبات ضدباکتریایی و نگه‌دارنده به منظور افزایش ماندگاری و کیفیت مواد غذایی استفاده نمود. مزیت استفاده از عصاره‌های گیاهی در مواد غذایی غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌ها در غذا بدون نیاز به حرارت و بدون تخریب بافت غذا است.

5- منابع

1. زرگری،ع. 1365. گیاهان دارویی. جلد دوم و چهارم. انتشارات دانشگاه تهران، تهران ،.جلد 2 ، 17-209 ، جلد4، 8-554.

2.Alzoreky, N.S. and Nakahara, k .2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonli consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80, pp 223-230.

3. Barros, J., Conceicao, M. and Neto, N. 2009 . Interference of Origanum vulgare L. Essensial oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT-Food Science and Technology*, 42, pp 1139-1143.

4. Burt, Sara .2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in food- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, pp223-253.

5.Chun, S., Vatten, D. A. Lin, Y. Shetty,K.2005. Phenolic antioxidants from clonal *oregano (Origanum vulgar)* with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40, pp 809-816.

6. Gülcin,İ., Küfrevioglu,O., Oktay,M. and Büyükokuroglu, M.2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of *nettle (Urtica dioica L.).Journal of Ethnopharmacology*, 90,.pp 205-215.

7. Hammer, K. A., Carson, C. F. and Rilley,T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, pp 985-990.

8. Kavalali,M.2003. *Urtica*: therapeutic and nutritional aspect of *stinging nettles*.tylor and Francis.

9. Lambert, R.J.W., Skandamis,P.N., Coote, P.J. and Nychas,G.-J.E.2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode ofaction of *oregano* essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*: 91, pp453-46.

10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).2004. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically; Document M7-A6. Wayne ,PA: *NCCLS Publication.*

11. Proestos,C. Boziaris, I.S. Nychas, J.E. and Komaitis, M.2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95, pp664–671.

12. Sahin, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M.,Agar, G. and Ozer, H.2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15,.pp 549-557.

13. Shan, B ., Cai, Y ., Brooks, J . and Croke , H.2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117, pp112-119.

14. Simic,A., Sokovic,M.D,. Marin, P.D,.2004. The Chemical Composition of some Lauraceae Essential Oils and Their Antifungal Activities. *Phytotherapy research*, 1, pp 713-714.

15. Ultee,A. and Smid,E.J. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*.64, pp373-378.

16. Zhang, H ., Kong, B ., Xiong, Y . and Sun, X. 2009. Antimicrobial activity of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4ºC. *Meat science*, 81, pp 686-69.