بررسی خصوصیات فیتوشیمیایی و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس زنیان (*Carum copticum*) علیه باکتری های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی O157:H7*

زهرا یناهی[1]، محمد محسن زاده[2]، رویا رضائیان دلویی[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد،گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ایران
2- دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
3- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

خلاصه

امروزه استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی از جمله اسانس های گیاهی، جایگزین مناسبی برای نگهدارنده های شیمیایی پرخطر هستند. از این نگهدارنده های طبیعی می توان به منظور کنترل رشد میکروارگانیسم های انتقال یافته از مواد غذایی از جمله *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی O157:H7* استفاده کرد. زنیان (*Carum copticum*) یک گیاه علفی از خانواده چتریان می باشد. در این مطالعه حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس زنیان (*Carum copticum*) علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی O157:H7* در محیط کشت آزمایشگاهی بررسی گردید. بدین منظور اسانس زنیان تهیه گردید و با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی آنالیز گردید. نتایج حاصل از خصوصیات فیتوشیمیایی اسانس زنیان نشان داد که بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس تیمول (57/18%)، پاراسایمن (22/5%) و گاماترپاینن (13/07%) می باشند. نتایج حاصل از بررسی خواص ضد میکروبی اسانس زنیان نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی برای باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب 1/25mg/ml و 2/5 mg/ml و برای باکتری *اشریشیا کلی O157:H7* به ترتیب 2/5mg/ml و 5mg/ml می باشد. با توجه به اینکه اسانس زنیان دارای خاصیت ضدمیکروبی خوبی علیه دوباکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی O157:H* می باشد ، اسانس زنیان می تواند در پوشش ها و فیلم های خوراکی به منظور افزایش زمان نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی، خاصیت ضد میکروبی، گیاه زنیان

Corresponding author:
* Email: mohsenzadeh@um.ac.ir

1. مقدمه

بیماري هاي ناشي از مواد غذايي در اثر پروسه هاي غير بهداشتي تهيه مواد غذايي ايجاد مي گردد و شامل عفونت ها و مسموميت ها مي شود. . باكتري ها ، ويروس ها، قارچ ها ، انگل ها ، فلزات سنگين و مواد شيميايي باعث مسموميت هاي غذايي مي شوند . باكتري ها عمومي ترين عامل در ارتباط با مسموميت هاي غذايي هستند. در چند دهه گذشته پاتوژن های غذایی از طریق مصرف گوشت قرمز، مرغ، محصولات گوشتی ازقبیل هات داگ، سوسیس،میوه و سبزیجات و شیر و محصولات لبنی و همچنین غذاهای دریایی به انسان منتقل شده اند[1]. میکروب هايي مانند *سالمونلا*، *كامپيلوباكتر*، *اشريشيا كلي* ، *ليستريا* باعث ايجاد عفونت هاي غذايي مي گردند. در صورتي كه ميكروب هاي *استافيلوكوكوس اورئوس* ،*كلستريديوم بوتولينوم* ابتدا در غذا رشد كرده، زياد مي شوند و پس از توليد سم، مسموميت هاي غذايي را به وجود مي آورند.

باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* از باکتری های عفونت زای غذایی است و موجب عفونت لیستریوزیس می‌گردد. این باکتری گرم مثبت، میله ای شکل و بی‌هوازی اختیاری است. این باکتری می‌تواند درون سلول‌های میزبان رشد کرده و تولید مثل کند و یکی از بدترین عوامل بیماریزای ناشی از عفونت مواد غذایی است[2]. *لیستریا ها* بطور کلی انتشار گشترده در طبیعت دارند و در خاک، آب، مدفوع حیوانات، فاضلاب و سیلو یافت می شوند. بیماریزایی *لیستریا* به دوصورت غیر تهاجمی باعلایمی مثل اسهال و استفراغ و غیر تهاجمی شدید بصورت سقط جنین، سپتی سمی و ... بروز می نماید. . بروز سالانه این بیماری 2 تا 10 مورد در هریک میلیون نفر و میزان مرگ و میر تا حدود 30 درصد توسط سازمان بهداشت جهانی گزارش گردیده است. که شدت و بروز علایم و مرگ به سیستم ایمنی فرد، نوع غذای مصرفی و توان بیماری زایی سویه *لیستریا مونوسیتوژنز* بستگی دارد[3].

اشریشیا کلی O157:H7 نیز از مهمترین پاتوژن های غذایی می باشد که از مواد غذایی نظیر گوشت و محصولات گوشتی و شیر و لبنیات جداسازی شده است. این باکتری بیماری های مهمی از جمله کولیت خونریزی دهنده و سندرم همولیتیک اورمیک را در انسان ایجاد می کند. این باکتری توانایی رشد و زنده ماندن در شرایط اسیدی را دارد به هین دلیل در صنعت غذا توجه زیادی به این باکتری گردیده است[4].

در حال حاضر اپیدمی های جدید ناشی از باکتری های بیماریزای منتقله از غذا نگرانی های جدی وجود دارد. به همین دلیل استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی و نگهدارنده های شیمایی و طبیعی برای جلوگیری از رشد باکتری های عفونت زا و مسمومیت زای غذایی روبه افزایش است و توجه بیشتری به امنیت غذایی در مصرف کنندگان می شود[5]. از طرفی در زمینه مقابله با باکتری های بیماریزا باتوجه به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی، هزینه بالای تولید آنتی بیوتیک ها ی سنتزی، عوارض جانبی این مواد شیمایی، تلاش برای استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی به ویژه گیاهان دارویی بیشتر شده است. ادویه جات و گیاهان عموما بعنوان طعم دهنده و معطر کننده در صنعت غذا استفاده می شوند اما اکثر این ترکیبات گیاهی علاوه بر طعم و

عطر دارای خواص ضدمیکروبی، ویروسی، انگلی و قارچی نیز هستند[6]. اسانس های گیاهی و ترکیبات موثره آن ها می توانند به عنوان عوامل ضدمیکروبی در برابر انواع گسترده ای از میکروارگانیسم ها به کار گرفته شوند. از میان ترکیبات مختلف اسانس مواد فنولی مسئول اصلی فعالیت های ضدمیکروبی اسانس های گیاهی می باشند[7]. عمدتاً این ترکیبات فنولی با نفوذ در غشای سیتوپلاسمی باعث اختلال در جریان الکترون ها، انتقال فعال و رسوب ترکیبات درون سلول می باشد[8]. اما در هر حال بدلیل وجود گروه های شیمیایی مختلفی که در اسانس ها وجود دارد اثر ضدمیکروبی اسانس ها فقط به یک مکانیسم خاص محدود نمی گردد[9].

گیاه زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* از خانواده چتریان می باشد. بصورت خودرو در نواحی شرق هند، ایران و مصر می روید و به نام *Carum captcium* هم معروف است[10]. میوه این گیاه کوچک، بیضی، قهوه ای مایل به زرد و بویی شبیه بوی تیمول دارد. این گیاه بیشتر در زمین های سبک رسی، سیلیسی و آفتاب گیر و چراگاه ها می روید. در طب سنتی از میوه این گیاه بعنوان ضدنفخ، ضدتهوع، محرک، قابض، دافع انگل و ضدقارچ استفاده می کنند. از دانه این گیاه در رفع سکسکه، دفع انگل روده و تسکین درد نیز استفاده می شود[11]. میوه (بذر) این گیاه دارای اسانس است. بذر این گیاه دارای بیشترین میزان اسانس بوده و با توجه به خصوصیات ژنتیکی و محیطی مقدار آن بین 2 تا 5 درصد متغیر است. اسانس این گیاه به نام آجوان نیز معروف است. تیمول، ترپینن، فلاندرن، گروه پینن، سیمن و میرسن از عمده ترکیبات این اسانس هستند. تحقیقاتی که روی این اسانس انجام گرفته نشان داده است که اسانس زنیان دارای خاصیت ضدمیکروبی خوبی علیه پاتوژن های غذایی می باشد و می توان از آن بعنوان یک نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا استفاده کرد.

با توجه به حضور باکتری های بیماریزایی از جمله *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی O157:H7* در مواد غذایی و از طرفی مقاومت های آنتی بیوتیکی و خطرزا بودن مواد نگهدارنده شیمیایی مصرفی در صنعت غذا، هدف از این تحقیق بررسی خاصیت ضدمیکروبی اسانس زنیان (*Carum copticum*) علیه باکتری های *لیستریامونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی O157:H7* در محیط آزمایشگاهی می باشد.

2. پیشینه پژوهش

امروزه به دلیل مضراتی که افزودنی های خوراکی برای بدن انسان دارند از جمله خطرات سرطانزایی، مشکلات قلبی عروقی و مشکلات معده توجه به ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی و حیوانی که باعث کنترل میکروبی، شیمیایی و افزایش ماندگاری مواد غذایی می شوند روبه افزایش است. اسانس ها و ادویه ها ازگذشته های دور مورد توجه مردم مصر و کشور های آسیایی از جمله چین و هند بوده و در طی سالیان اخیر علاوه بر استفاده از اسانس ها بعنوان طعم دهنده و معطر کننده جهت کاربرد های دارویی و نگهدارنده نیز مورد استفاده قرار می گیرند و در طب سنتی کاربرد بسیاری دارند[12]. در رابطه با اسانس زنیان تحقیقات

زیادی در مدل های آزمایشگاهی صورت گرفته است و تعداد محدودی در مدل های غذایی صورت پذیرفته است.

حقیر السادات و همکاران (2012)، بر روی خواص موثره و آنتی اکسیدانی اسانس زنیان مطالعه انجام دادند. نتایج این تحقیق در مجموع نشان داد که اسانس گیاه دارویی زنیان بومی استان یزد دارای مواد ارزشمند دارویی و صنعتی می باشد که مهمترین و عمده ترین آن ها ماده ارزشمند تیمول با درصد بسیار بالایی نسبت به مطالعات پیشین بر روی زنیان مناطق دیگر ایران و جهان می باشد. بنابراین می توان از این گیاه بومی استان یزد به عنوان منبعی غنی برای تولید تیمول و مواد ارزشمند دیگر اسانس آن استفاده نمود[13].

کاووسی و همکاران (2013)، فعالیت آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی اسانس های زنیان و فرولا را بررسی کردند. اسانس زنیان، باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را بطور قابل توجهی کاهش داد در حالی که اسانس فرولا با غلظت برابر تنها در کاهش باکتری های گرم مثبت اثر محسوسی داشت و درمجموع می توان نتیجه گرفت که این دو اسانس را می توان بعنوان آنتی اکسیدان در نگهداری غذاهای پرچرب و به عنوان یک نگهدارنده مواد غذایی در برابر پاتوژن های غذایی مورد استفاده قرار داد[14].

پاندی و همکاران اثر ضدباکتریایی اسانس زنیان را بر باکتری های *استرپتوکوکوس همولیتیکوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا*، *اشریشیا کلی*، *پروتئوس وولگاریس* و *کورینه باکتریوم دیفتریا* بررسی کردند که نتایج بیانگر این بود که این اسانس دارای خاصیت ضدمیکروبی خوبی علیه باکتری های ذکر شده می باشد[15].

3. روش پژوهش

اسانس زنیان از شرکت جوهره طعم شرق مشهد تهیه گردید. به منظور شناسایی خصوصیات فیتوشیمیایی وترکیبات تشکیل دهنده اسانس از دستگاه گاز کروکاتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) استفاده گردید.

باکتری های *اشریشیاکولی O157:H7* (NCTC 12900) و *لیستریا مونوسیتوژنز* (ATCC 7644) از آزمایشگاه میکروبی گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. در ابتدا باکتری های مورد نظر روی محیط کشت آگار مغذی کشت داده شدند و در دمای 37 درجه سلسیوس بمدت 24 ساعت گرمخانه گذاری گردیدند. سپس از پرگنه های تازه رشد کرده سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند (CFU/ml $1/5\times10^8$)، تهیه گردید.

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) از روش میکروبراث دایلوشن استفاده شد. ابتدا غلظتی معادل استاندارد نیم مک فارلند (CFU/ml $1/5\times10^8$)، از باکتری تهیه و سپس تا غلظت CFU/ml 10^6 رقیق گردید. از میکروپلیت های 96 خانه ای الایزا استفاده گردید. با استفاده از دی متیل سولفوکساید (DMSO)، اسانس زنیان در غلظت های mg/ml 40- 0/16 تهیه شد. داخل هر چاهک میکروپلیت 160 میکرولیتر

از BHI براث،20 میکرولیتر از اسانس و 20 میکرولیتر از باکتری (جمعاً 200 میکرولیتر) اضافه گردید. کلیه آزمایشات در 3 تکرار انجام شد. برای هر تکرار یک چاهک به عنوان کنترل منفی(بدون افزودن باکتری) و یکی دیگر به عنوان کنترل مثبت (بدون افزودن اسانس) در نظر گرفته شد. سپس پلیت بمدت 30 ثانیه به آرامی مخلوط گردید و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به روش چشمی و مشاهده کدورت و با کمک معرف ترازولیوم کلراید (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) تعیین گردید. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) از چاهک هایی که در آنها کدورت قابل مشاهده دیده نشد بر روی محیط کشت BHI آگار کشت داده شد. پلیت ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید. کمترین غلظتی که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد بعنوان حداقل غلظت کشندگی(MBC) در نظر گرفته شد[16].

4.تجزیه و تحلیل داده ها

ترکیبات اسانس زنیان توسط دستگاه گاز کروکاتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) آنالیز گردید . اجزای اصلی اسانس زنیان تیمول، پاراسایمن و گاماترپاینن می باشد.
ترکیبات تشکیل دهنده اسانس در جدول شماره 1 آمده است.

جدول شماره 1.اجزای اسانس زنیان

ردیف	نام ترکیب	درصد	شاخص بازداری
1	α-pinene	0/29	11/35
2	β-pinene	0/43	13/45
3	β-Myrcene	0/34	14/28
4	α-phellandrene	0/065	14/89
5	α-Terpinen	0/311	15/54
6	p-Cymene	22/55	16/21
7	α-Terpinolene	0/095	19/18
8	β-phellandrene	0/541	16/29
9	γ-Terpinen	13/07	17/93
10	L-Carvone	0/908	27/29
11	trans- anethole	1/7	28/68
12	Thymol	57/18	29/73
13	Carvacrol	0/524	29/84
14	Apiol	0/566	42/73

نتایج حاصل از بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس زنیان جهت تعیین MIC و MBC روی باکتری های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی O157:H7* در جدول شماره 2 آمده است.

جدول شماره 2. میزانMIC و MBC اسانس چویل برروی باکتری های مورد بررسی

میکروارگانیسم	MIC(mg/ml)	MBC(mg/ml)
اشریشیاکولیO157:H7	2/5	5
لیستریا مونوسیتوژنز	1/25	2/5

5. بحث

آگاهی و شناخت از مکانیسم عملکردی ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی از جمله اسانس ها می تواند در تشخیص میکروارگانیسم های حساس و افزایش کارایی این ترکیبات در سیستم های غذایی موثر باشد. بیشترین خاصیت ضد میکروبی گیاهان بدلیل حضور ترکیبات فنولی فراوان در آنها می باشد.. به همین دلیل اسانس گیاهان مختلف علیه یک باکتری خاص پاسخ های ضدباکتریایی متفاوتی را از خود نشان می دهند. نتایج حاصل از کروماتوگرافی اسانس زنیان دراین مطالعه نشان می دهد که بیشترین ترکیبات اسانس این گیاه تیمول (18/57%)، پاراسایمن (5/22%) و گاماترپاینن (07/13%) می باشند و مطالعه حاضر نشان داد که اسانس این گیاه خاصیت ضدمیکروبی خوبی علیه باکتری گرم مثبت *لیستریا مونوسیتوژنز* و همچنین باکتری *اشریشیاکلی O157*:H7 نشان می دهد. نتایج حاصل از آنالیز و خواص ضدمیکروبی در این تحقیق با نتایج دیگر تحقیقات شباهت زیادی دارد. البته اجزای اسانس گیاهان و میزان ماده موثره آنها تحت شرایط مختلف از قبیل منطقه جغرافیایی، محل رشد، سن گیاه، قسمت مورد استفاده گیاه و نحوه اسانس گیری و... تاحدودی تغییر می کند. در مطالعه ای که خصوصیات فیتوشیمایی و خاصیت ضدباکتریایی اسانس زنیان را بررسی کرده بودند، بیشترین ترکیبات اسانس تیمول (48/4 %)، پاراسایمن (21%/8) و گاما ترپاینن (21/3 %) بود و همچنین نتایج نشان داد که این گیاه خاصیت ضدمیکروبی خوبی را نشان داده است که با نتایج حاضر شباهت زیادی از نظر نوع ترکیبات دارد ولی میزان آنها کمی متفاوت می باشد و هچنین اسانس این گیاه دارای خاصیت ضدمیکروبی خوبی می باشد[11]. در مطالعه ای که اشرافی و همکاران (1392) بر روی ترکیبات شیمایی اسانس گیاه زنیان انجام دادند، نتایج نشان داد که تیمول (45%) پاراسایمن (25%) و گاماترپینن (18%) بیشترین ترکیبات این اسانس را تشکیل میدهند[17]. اغلب مطالعات انجام‌شده، تیمول را به‌عنوان جزء غالب اسانس زنیان معرفی نموده اند درحالی‌که برخی گزارش‌ها کارواکرول را به‌عنوان ترکیب شیمیایی اصلی آن بیان کرده اند[18]. گودرزی و همکاران (2011) فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات شیمیایی اسانس زنیان را با استفاده از روش رقیق‌سازی در براث و انتشار در آگار بررسی کردند که نتایج نشان داد اجزای غالب اسانس زنیان به ترتیب تیمول، گاما

ترپاینن و پارا سایمن می باشند و همچنین خواص ضدمیکروبی این گیاه نیز اثبات شد[19].

6. نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر این است که اسانس زنیان دارای خاصیت ضد میکروبی خوبی علیه باکتری گرم مثبت *لیستریاموسیتوژنز* و همچنین باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی O157:H7* می باشد لذا با توجه به اثرات مضر نگهدارنده های شیمیایی و مقاومت های آنتی بیوتیکی می توان از این اسانس ها در زمینه های داروشناسی، میکروبیولوژی، فارماکولوژی و نگهداری مواد غذایی استفاده کرد.

7. مراجع

1. Biswas, A.K., Kondaiah, N., Bheilegaonkar, K.N., Anjaneyulu, A.S.R., Mendiratta, S.K., Jana, C., Singh, H. and Kumar, R.R., (2008). Microbial profiles of frozen trimmings and silver sides prepared at Indian buffalo meat packing plants. *Meat science*, *80*(2), pp.418-422.
2. Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P. and Vijila, H.M., (2007). Listeria-review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, *40*(1), pp.4.
3. Rocourt, J., BenEmbarek, P., Toyofuku, H. and Schlundt, J., 2003. Quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *35*(3), pp.263-267.
4. Gómez-Aldapa, C.A., Díaz-Cruz, C.A., Villarruel-López, A., del Refugio Torres-Vitela, M., Rangel-Vargas, E. and Castro-Rosas, J., (2012). Acid and alcohol tolerance of Escherichia coli O157: H7 in pulque, a typical Mexican beverage. *International journal of food microbiology*, *154*(1-2), pp.79-84.
5. Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O., (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, *21*(9), pp.1199-1218.
6. Nasar-Abbas, S.M. and Halkman, A.K., (2004). Antimicrobial effect of water extract of sumac (Rhus coriaria L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *International journal of food microbiology*, *97*(1), pp.63-69.
7. Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M.L., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F., (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, *29*(2), pp.130-135.
8. Davidson, P.M., (1997).Chemical preservatives and natural antimicrobial compound. In: Doyle, M.P., Beuchat,L.R., Montiville, T.J. (Eds).Food microbiology: fundamentals and frontiers.ASM, Washington , PP.520-556.
9. Carson, C.F., Mee, B.J. and Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *46*(6), pp.1914-1920.
10. Zargari, A., 1995. *Medicinal plants* (Vol. 1050400844). Tehrari University Publications. ISBN.
11. Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M. and Bassami, M.R., (2010). Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food chemistry*, *120*(3), pp.765-770.
12. Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A., 2005. Modern food microbiology 7 th.
13. Haghiroalsadat, B.F., Vahidi, A.R., Azimzadeh, M., Kalantar, S.M., Bernard, F. and HOKM, E.F., (2012). Chemical assesment of active ingredients and antioxidant effects of Trachyspermum copticum seeds harvested in yazd province, pp 197-206.

14. Kavoosi, G., Tafsiry, A., Ebdam, A.A. and Rowshan, V., (2013). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from Carum copticum seed and Ferula assafoetida latex. *Journal of food science*, *78*(2).
15. Singh, G., Kapoor, I.P.S., Pandey, S.K., Singh, U.K. and Singh, R.K.,(2002). Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytotherapy research*, *16*(7), pp.680-682.
16. Mack, D., Rohde, H., Dobinsky, S., Riedewald, J., Nedelmann, M., Knobloch, J.K.M., Elsner, H.A. and Feucht, H.H., (2000). Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infection and immunity*, *68*(7), pp.3799-3807.
17. اشرافی نمای,ا, زهرایی صالحی,ت, خسروی,ع,شریفزاده , ع , بالال,ا , (1392) ." مطالعه ترکیب شیمیایی اسانس گیاه زنیان (Trachyspermum ammi)و اثر مهاری آن بر جدایه های دهانی کاندیدا آلبیکنس مقاوم به آزول در بیماران مبتلا به ایدز."*فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی*,*2 (46) 149-137* .
18. Behravan, J.A., Ramezani, M., Hassanzadeh, M.K. and Ebadi, S., (2007). Evaluation of antibacterial activity of the essential oils of Zataria multiflora, Carum copticum and Thymus vulgaris by a thin layer chromatography-bioautography method. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *10*(3), pp.259-264.
19. Goudarzi, G.R., Saharkhiz, M.J., Sattari, M. and Zomorodian, K., (2010). Antibacterial activity and chemical composition of Ajowan (Carum copticum Benth. & Hook) essential oil. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *13*, pp.203-208.