تأثیر اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) بر باکتری *E.coli* در پنیر سفید ایرانی

شیما شهرابی، علی فضل آرا *، احمد زند مقدم

گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

* **نویسنده مسئول:** *Fazlara2000@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۲۶

چکیده

اشریشیاکلی یکی از مهمترین اعضای گروه کلی‌فرم ها بوده که از لحاظ بیماری‌زایی و ایجاد مسمومیت اهمیت زیادی دارند. هدف از این بررسی استفاده از اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) به عنوان یک آنتی‌بیوتیک و نگه دارنده طبیعی در یک مدل غذایی (پنیر UF) پس از طی ۶۰ روز نگهداری، می‌باشد. اثر اسانس در غلظت های صفر، ۰/۰۲ ٪ و ۰/۰۴ ٪ بر روی باکتری *اشریشیاکلی* با میزان تلقیح 10^4 باکتری در هر سی‌سی ریتنتیت مصرفی برای تهیه پنیر همراه با یک نمونه بدون افزودن اسانس به عنوان شاهد مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۶ و آزمون های آماری One_Way ANOVA و Repeated Measures Define مورد بررسی قرار گرفتند. غلظت باکتری در پنیرهای حاوی ۰/۰۲ ٪ و ۰/۰۴ ٪ اسانس مذکور از روز ۱۵ نگه داری با سایر روزها اختلاف معنی داری با حالت شاهد (پنیر فاقد اسانس) مشاهده شد($p<0/05$). میزان کاهش در تیمارهای فوق تا پایان دوره نگه داری به ترتیب ۲/۷۸ و ۲/۵۹ لگاریتم بیشتر از حالت شاهد بود در حالیکه پنیر فاقد اسانس (شاهد) تا پایان زمان ۶۰ روز همچنان حاوی باکتری بیشتری بود. نتایج اندازه گیری میزان pH در طی مدت ۶۰ روز اختلاف معنی‌داری بین تمام گروه های تیمار نشان داد ($p<0/05$). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که عصاره مرزه خوزستانی دارای خواص ضد باکتریایی در پنیر سفید ایرانی می‌باشد.

واژگان کلیدی: اسانس مرزه خوزستانی، *اشریشیاکلی*، اولترافیلتراسیون، پنیر، ضد باکتریای

مقدمه

در سال های اخیر تولید کنندگان مواد غذایی توجه زیادی به استفاده از نگه دارنده های طبیعی با منشأ گیاهی و میکروبی به جای نگه دارنده های شیمیایی در محصولات خود نموده اند. این امر از یک سو به علت تمایل زیاد مصرف کنندگان به استفاده از مواد غذایی فرآوری شده بدون نگه دارنده یا حتی المقدور با نگه دارنده های طبیعی و از طرف دیگر توجه هر چه بیشتر متولیان بهداشتی به این موضوع می باشد (Delaquis *et al.*, 2002; Tassou & Nychas, 1995; Tassou *et al.*, 2000). اسانس های گیاهی از منابع بالقوه ی واجد ترکیبات ضد باکتریایی می‌باشند و برای این منظور بسیار مفید و مؤثر هستند. اسانس ها (روغن های فرار یا روغن های اتری) مایعات معطری هستند که از اجزای مختلف گیاهی به دست می‌آیند (مشاک و همکاران، ۱۳۸۷). گیاه دارویی مرزه خوزستانی[1] اولین بار در سال ۱۹۹۴ به عنوان گونه ای جدید در فلور ایران (رویشگاه اصلی این گیاه دارویی ارزشمند، زاگرس میانی و مناطق جنوب لرستان، شرق ایلام و شمال خوزستان است) گزارش شد Jamzad, (1994). مرزه خوزستانی گیاهی پایا، در قاعده نیمه چوبی کرکینه پوش به ارتفاع ۳۵-۲۰ سانتی متر است. ساقه آن متعدد و منشعب با شاخه های افراشته، کمی کرکینه پوش، پوشیده از برگ های متراکم، با میانگره های کوتاه می‌باشد. این گیاه در عموماً در صخره های سنگ آهکی می‌روید (قهرمان، ۱۳۸۷). از این گیاه به عنوان ادویه و طعم دهنده مواد غذایی، در صنایع کنسرو و نوشابه و فرآوری تکه های گوشت و انواع سوسیس استفاده می‌شود Dorman & (Hiltunen, 2004; Omidbaigi, 1999). اثرات درمانی این گیاه متفاوت است از جمله: دارای خواص باد شکن و خلط آور است، برای بسیاری از اختلالات مجاری گوارشی شامل تهوع، اسهال، سوء هاضمه و بی‌اشتهایی مفید است، برای درد های عضلانی، گرفتگی عضلات نیز استفاده می-

[1] . *Satureja khuzestanica*

شود (Akhondzade, 2000). *اشریشیاکلی*[1] یکی از مهمترین اعضای گروه کلی‌فرم ها بوده که از لحاظ بیماری-زایی و ایجاد مسمومیت اهمیت زیادی دارند و عموماً به عنوان بخشی از فلور میکروبی روده انسان و بسیاری از حیوانات محسوب می‌شوند ولی در این مکان همیشه بدون ضرر نیستند. در واقع می‌توان گفت یکی از عوامل مهم آلودگی مواد غذایی به این میکروب، کارگران مراکز تهیه و آماده سازی غذاها هستند زیرا با رعایت نکردن بهداشت دست، باکتری *اشریشیاکلی* را به مواد غذایی منتقل کرده و سبب بیماری مصرف کننده می‌شوند (مرتضوی، ۱۳۸۸). مرزه خوزستانی یکی از همین گیاهان می‌باشد که به خاطر خواص ضد میکروبی آن مورد توجه بسیاری از پژوهشگران است. تحقیقات متعددی به بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس های گیاهی مختلف در محیط های کشت و در مواردی در مدل های غذایی پرداخته اند. داردرفشی و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعه خود تأثیر اسانس گیاه چویر[2] بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در طی تولید و نگه داری پنیر سفید ایرانی را اعلام نمودند که فعالیت ضد باکتریایی گیاه مذکور در غلظت های (۰/۰۰۷۵٪، ۰/۰۱۵٪، ۰/۰۳٪) اسانس مورد بررسی قرار گرفت. که غلظت های ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد اسانس توانستند رشد باکتری را متوقف کنند که این تأثیر در غلظت ۰/۰۳٪ سریعتر بود. در مطالعه حاضر اسانس چویر در غلظت ۰/۰۳ و ۰/۰۱۵ درصد نه تنها تعداد باکتری را کاهش داد بلکه پس از گذشت مدتی از زمان نگه داری رشد *استافیلوکوک* متوقف شد و میزان آن به صفر رسید. به طور خلاصه می‌توان چنین اظهار داشت در بالاترین غلظت اسانس هرچه مدت زمان نگه داری در ۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر شود میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد. نتایج اندازه گیری میزان pH پس از روز ۶۰ نشان داد که با افزایش غلظت اسانس pH نیز کاهش می‌یابد و این روند در نمونه های حاوی باکتری و فاقد باکتری مشاهده گردید. همچنین تفاوت چندانی بین pH نهایی نمونه های حاوی باکتری و فاقد باکتری وجود ندارد (داردرفشی و همکاران، ۱۳۹۲). بنابراین لازم به ذکر است که انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه بخصوص استفاده از این اسانس توأم با سایر فاکتورهای درون اثر و برون اثر محیطی روی میکروب های پاتوژن و عامل فساد در مدل های غذایی و همچنین بررسی اثر اسانس مرزه خوزستانی بر دیگر باکتری‌های غذازاد مهم در بهداشت عمومی ضروری می-باشد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر اسانس مرزه خوزستانی (در غلظت های صفر، ۰/۰۴ ٪ و ۰/۰۲ ٪) بر دوام و ماندگاری باکتری *E.coli* در پنیر سفید ایرانی (UF) به عنوان نگه دارنده طبیعی و بدون عوارض شیمیایی و همچنین روند تغییرات pH پس از طی ۶۰ روز نگه داری می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه میزان تلقیح باکتریایی

باکتری *اشریشیاکلی* (PTCC ۱۳۹۹) از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز تهیه شد. این باکتری در محیط TSB[3] (QUELAB کانادا) در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۰-۱۸ ساعت (overnight culture) حداقل دو مرتبه به طور متوالی کشت داده شد. سپس از کشت دوم به نسبت ۱ به ۵ با گلیسیرین سترون مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب های ایندروف در ۲۰- درجه سلسیوس نگه داری و برای انجام پژوهش به کار گرفته شد (Moosavy *et al.*, 2009). نظر به اینکه می-بایست 10^4 باکتری به هر میلی‌لیتر از ریتنتیت[4] مصرفی برای تولید پنیر اضافه می‌شد، لذا به منظور آماده سازی میزان تلقیح باکتریایی، ابتدا یک پرگنه از باکتری اولیه برداشته شد و در محیط TSB کشت داده شد. این محیط به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در گرم خانه قرار گرفت و پس از آن یک لوپ از این محیط به یک لوله دیگر حاوی محیط TSB انتقال داده شد. این لوله هم به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در گرم خانه قرار گرفت تا یک محیط حاوی باکتری تازه به دست

[1] . *Escherichia coli*
[2] . *Ferulago angulata* essential oil
[3] . Tryptic Soy Broth
[4] . Retentate

آمد. سپس برای به دست آوردن تعداد 10^4 باکتری سری رقت تهیه شد. برای تهیه رقت از لوله آزمایش حاوی ۹ سی-سی محلول رینگر که قبلاً سترون شده بود استفاده شد. ۱ سی‌سی از محیط آبگوشت TSB حاوی باکتری *اشریشیاکلی* که قبلاً تهیه شده بود به اولین لوله محلول رینگر اضافه شد. پس از مخلوط کردن با دستگاه شیکر، ۱ سی سی از مخلوط حاصل را به لوله بعدی منتقل کرده و به همین ترتیب تا رسیدن به رقت 10^{-7} ادامه داده شد. سپس از هر کدام از این رقت ها به میزان ۰/۱ سی‌سی روی محیط کشت ای-ام- بی آگار[1] (QUELAB کانادا) به صورت سطحی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از این مدت پرگنه‌های موجود در هر پلیت شمارش شد. آخرین رقتی که باکتری در آن رشد کرده بود 10^{-6} بود که حاوی ۴ پرگنه بود. یعنی در هر سی-سی از این رقت 4×10^7 عدد باکتری وجود داشت.

انجام این مراحل برای دستیابی به ماکزیمم تعداد جمعیت باکتریایی تولید شده در کشت تازه TSB، سه بار تکرار شد و ماکزیمم جمعیت باکتریایی معادل 4×10^7 در هر سی سی از محیط TSB به تأیید رسید و لذا با افزودن ۰/۵ سی سی از این محیط TSB به ظروف حاوی یک لیتر ریتنتیت مورد استفاده برای تولید پنیر، در هر سی‌سی از ریتنتیت مصرفی معادل 10^4 باکتری *اشریشیاکلی* تلقیح گردید که بر اساس کشت در پلیت نیز به تأیید رسیدند.

مراحل تولید پنیر

شیر مورد استفاده برای انجام پروژه از شیر مصرفی برای تولید پنیر درکارخانه شیر پاستوریزه پگاه خوزستان (شوش دانیال) تأمین شد. مشخصات شیر و ریتنتیت به کار رفته در تولید پنیر UF در جدول ۱ نشان داده شده است. پس از رساندن دمای شیر به $50\ ^{o}C$ و تنظیم چربی آن تا ۳/۵ ٪ به وسیله خامه گیر (دستگاه سپراتور)، شیر از دو دستگاه باکتوفوگاسیون عبور داده شد تا بار میکروبی آن تا کمتر از ۹۶ ٪ کاهش یابد.

سپس در دمای $77-76\ ^{o}C$ به مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه شد و پس از سرد کردن در مبدل حرارتی با دمای $6-4\ ^{o}C$ در تانک‌های شیر پاستوریزه ذخیره گردید. در نهایت بوسیله ی مبدل حرارتی با پرمیت دمای آن به $50\ ^{o}C$ رسانده شد و برای تغلیظ وارد سیستم فرا پالایش شد که پس از گذشتن شیر از آن ماده ی خشک شیر به ۱۱/۵ ٪ رسانده شد.

در ادامه در دمای $50\ ^{o}C$ هموژن شد و در دمای $78\ ^{o}C$ به مدت ۳-۲ دقیقه پاستوریزه و به تانک فاز ماندگار انتقال داده شد. سپس کشت های آغازگر شامل گونه های *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* از شرکت CHR – HANSEN دانمارک اضافه شد و به هر ۵ کیلوگرم از ریتنتیت آماده ۰/۰۲ ٪ اسانس مرزه خوزستانی و ۰/۵ سی‌سی از محیط TSB حاوی باکتری *اشریشیاکلی* (تیمار۱)، ۰/۰۴ ٪ اسانس مرزه خوزستانی و ۰/۵ سی‌سی از محیط TSB حاوی باکتری *اشریشیاکلی* (تیمار۲)، ۰ ٪ (فاقد اسانس مرزه خوزستانی) و ۰/۵ سی‌سی از محیط TSB حاوی باکتری *اشریشیاکلی* (تیمار۳)، ۵ ٪ اسانس مرزه خوزستانی (تیمار۴) و کنترل (تیمار۵) به منظور تولید پنج تیمار آزمایشی اضافه شد. سپس ریتنتیت ها به کاپ های ۱۰۰ گرمی اضافه شده و سپس رنت به مقدار ۳۰mg/kg (مایه پنیر قارچی تهیه شده از شرکت CHR – HANSEN دانمارک) به کاپ‌های آزمایشی اضافه گردید و سپس لیوان‌ها وارد تونل انعقاد ۲۰ متری با دمای $32-30\ ^{o}C$ شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در آن باقی ماندند تا pH آنها به ۶/۲-۶/۱ برسد.

در هنگام خروج روی سطح پنیر کاغذ پارچمنت[2] گذاشته شد و به مقدار ۳-۲ ٪ نمک طعام روی آنها ریخته شد، در نهایت درب بندی گردیدند. کاپ‌ها وارد گرمخانه $27-25\ ^{o}C$ شدند و پس از ۲۴ ساعت که pH آنها به ۴/۸ رسید، پنیرها به سردخانه $12 \pm 2\ ^{o}C$منتقل شدند تا آزمایشات مربوطه در روزهای نمونه برداری بر روی آنها صورت گیرد.

[1] . Eosin Methylene Blue (EMB)

[2] . Parchment

جدول ۱- ترکیبات شیرخام در تولید پنیر سفید ایرانی و ریتنتیت مصرفی

نمونه	درصد چربی	درصد ماده خشک	درصد پروتئین	pH
شیر خام	۳/۵	۱۱/۵	۳/۱	۶/۷
ریتنتیت	۱۶/۵	۳۴	۱۱/۷	۶/۶۸

انجام کشت در زمان های تعیین شده

به منظور شمارش *اشریشیاکلی* و اندازه گیری pH، آزمایش-های میکروبی و شیمیایی در مراحل زیر انجام پذیرفت:
ساعت صفر (بلافاصله پس از تلقیح باکتری *اشریشیاکلی*)، بعد از افزودن استارتر، مایه پنیر و ایجاد لخته (ساعت یک)، دوره رسیدن پنیر با pH ۴/۸ (روز یک)، روز ۷ (ساعت ۱۶۸)، روز ۱۵ (ساعت ۳۶۰)، روز ۳۰ (ساعت ۷۲۰)، روز ۴۵ (ساعت ۱۰۸۰)، روز ۶۰ (ساعت ۱۴۴۰).
برای کشت، در هر بار نمونه برداری ۱ گرم از قسمت های مختلف پنیر تهیه و توزین شده و به وسیله هاون و بوته چینی سترون خرد شده و با ۹ سی‌سی محلول رینگر مخلوط می‌گردید و ۰/۱ سی‌سی از محلول به دست آمده به وسیله پیپت سترون به محیط ای- ام- بی آگار انتقال داده و به روش کشت سطحی، کشت داده می‌شد. محیط‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار می‌گرفت و پس از آن پرگنه‌ها شمارش می-شدند و با توجه به رقت مورد استفاده قرار گرفته، تعداد باکتری موجود در واحد گرم (g) محاسبه می‌شد.

روش شمارش میکروبی
برای شمارش پرگنه‌های *اشریشیاکلی*، پلیت های حاوی باکتری مورد بررسی قرار گرفتند و پرگنه های کروی شکل، ریز، با رنگ جلای سبز فلزی شمارش شدند و نسبت به محاسبه تعداد باکتری *اشریشیاکلی* در هر گرم از پنیر اقدام گردید.

نظر به اینکه مراحل آماده سازی پنیر و کشت های مربوطه با ۳ بار تکرار انجام پذیرفت، لذا در هر مرحله از زمان‌های کشت، میانگین تعداد پرگنه های شمارش شده در ۳ تکرار به عنوان تعداد *اشریشیاکلی* در هر گرم از نمونه گزارش گردید و نهایتاً نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SPSSویراست ۱۶ و آزمون‌های آماری ANOVA One_Way، Repeated Measures Define، Scheffe و Duncan مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و برای رسم نمودارها از Excel 2013 استفاده شد.
اندازه گیری pH
اندازه گیری pH توسط دستگاه pH متر دیجیتال (ساخت کارخانه متروهم[1] سوئیس) صورت گرفت.

نتایج

در این بررسی اثر غلظت های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ اسانس مرزه خوزستانی بر باکتری *اشریشیاکلی* در پنیر با استفاده از محیط ای- ام- بی آگار مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله از مطالعه ی حاضر با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. با بهره گیری از آزمون ANOVA One_Way از روز ۱۵ (زمان پنجم نمونه برداری) به بعد اختلاف معنی‌داری از نظر تراکم باکتریایی *اشریشیاکلی* (log cfu/g) در پنیرهای حاوی مقادیر مختلف اسانس مرزه خوزستانی (با غلظت ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد) با حالت شاهد (پنیر فاقد اسانس) و همچنین بین پنیرهای حاوی غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد اسانس مذکور مشاهده شد که با استفاده

[1] . Metrohm Herisua

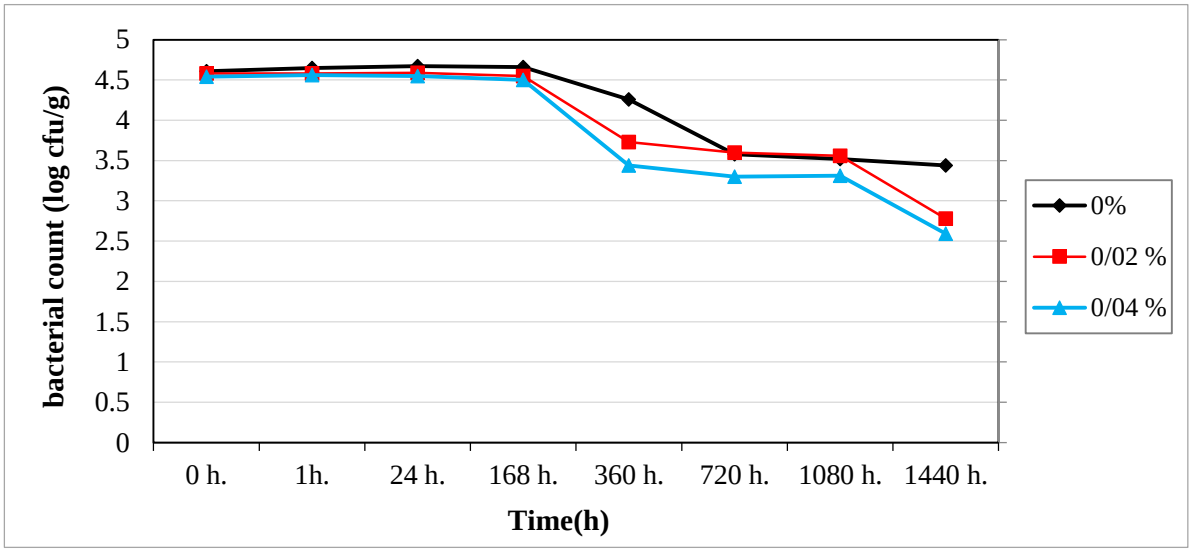
از آزمون تکمیلی Scheffe نیز به تأیید رسیدند (p<۰/۰۵). به همین ترتیب با بهره گیری از آزمون One_Way ANOVA از روز یک (زمان سوم نمونه برداری) به بعد اختلاف معنی‌داری از نظر میزان pH در پنیرهای حاوی مقادیر مختلف اسانس مرزه خوزستانی (با غلظت ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد) با حالت شاهد (پنیر فاقد اسانس) و همچنین بین پنیرهای حاوی غلظت های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد اسانس مذکور مشاهده شد که با استفاده از آزمون تکمیلی Scheffe نیز به تأیید رسیدند. (p<۰/۰۵) همچنین با مقایسه ی تراکم باکتریایی *اشریشیاکلی* در زمان‌های مختلف نمونه برداری و انجام کشت در هر سه نوع پنیر (دارای اسانس با غلظت های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ و نیز فاقد اسانس) با استفاده از آزمون Repeated Measures Define اختلاف معنی‌داری ملاحظه گردید که با استفاده از آزمون‌های تکمیلی Duncan و Scheffe نیز به تأیید رسیدند (p<۰/۰۵).نتایج اثر غلظت‌های مختلف اسانس مرزه خوزستانی بر روی باکتری *اشریشیاکلی* در جدول ۲ و نمودار ۱ آورده شده است. در پنیر حاوی غلظت ۰/۰۲ ٪ عصاره مرزه خوزستانی و تعداد اولیه باکتری $۳/۸ \times ۱۰^{۴}$ در هر گرم پنیر، پس از ۱۵ روز تعداد باکتری با ۱ Log کاهش به حدود $۵/۴ \times ۱۰^{۳}$ باکتری در هر گرم رسید و در پایان زمان ۶۰ روز تعداد باکتری با ۱ Log کاهش به حدود ۶×۱۰^{۲} باکتری در هر گرم رسید. در نمونه حاوی غلظت ۰/۰۴ ٪ عصاره و تعداد اولیه $۳/۵ \times ۱۰^{۴}$ باکتری، پس از گذشت ۱۵ روز تعداد باکتری *اشریشیاکلی* در هر گرم پنیر با ۱ Log کاهش به حدود $۲/۷ \times ۱۰^{۳}$ عدد در هر گرم پنیر رسید و در پایان زمان ۶۰ روز تعداد باکتری با ۱ Log کاهش به حدود $۳/۹ \times ۱۰^{۲}$ باکتری در هر گرم رسید. اما در نمونه شاهد فاقد عصاره با تعداد اولیه $۴/۱ \times ۱۰^{۴}$ باکتری در هر گرم از پنیر، پس از ۳۰ روز تعداد باکتری با ۱ Log کاهش به حدود $۳/۸ \times ۱۰^{۳}$ باکتری در هر گرم رسید و در پایان زمان ۶۰ تعداد باکتری با ۱ Log کاهش به حدود $۲/۸ \times ۱۰^{۳}$ باکتری در هر گرم پنیر رسید. با مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره مرزه خوزستانی در غلظت‌های ۰/۰۲ ٪ و ۰/۰۴ ٪ می‌توان چنین گفت که تا پایان روز هفت تفاوتی بین این دو گروه و نیز گروه شاهد فاقد عصاره مشاهده نمی‌شود اما از این روز به بعد یعنی در روز پانزدهم بین نمونه های حاوی ۰/۰۲ ٪ و ۰/۰۴ ٪ عصاره مرزه خوزستانی و نمونه شاهد، تفاوت‌ها از لحاظ ظاهری به شکل تغییر در لگاریتم باکتری مشاهده می‌شود چنانچه در گروه شاهد فاقد عصاره لگاریتم باکتری همچنان در ۴ می‌باشد. اما از روز ۳۰ به بعد بین هر سه گروه تفاوت وجود دارد. هر دو غلظت عصاره توانستند رشد باکتری را کاهش دهند. با بررسی نمودار ۱ می‌توان چنین نتیجه گرفت که عصاره مرزه خوزستانی دارای خواص ضد باکتریایی علیه *اشریشیاکلی* است.

نتایج اندازه گیری میزان pH در طی ۶۰ روز نشان داد که میزان pH با گذشت زمان در هر ۳ تیمار روند نزولی دارد. همچنین مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری بین pH نهایی نمونه‌های حاوی اسانس وجود ندارد. به عبارت دیگر به همین ترتیب بطور کلی در طی دوره با مقایسه ی pH در زمان‌های مختلف نمونه برداری و انجام کشت در هر سه نوع پنیر (دارای اسانس با غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ و نیز فاقد اسانس) با استفاده از آزمون Repeated Measures Define اختلاف معنی‌داری ملاحظه گردید که با استفاده از آزمون تکمیلی LSD نیز به تأیید رسیدند (p<۰/۰۵). هرچند که بر اساس آزمون‌های تکمیلی Duncan و Scheffe صرفاً دو نوع پنیر دارای اسانس با غلظت - های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ با پنیر فاقد اسانس دارای اختلاف معنی‌دار بوده (p<۰/۰۵) و بین پنیرهای دارای اسانس با غلظت های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ اختلاف معنی‌داری ملاحظه نشد.

نتایج تغییرات میزان pH طی مراحل مختلف تولید در پنیر سفید ایرانی در جدول ۳ و نمودار ۲ آورده شده است.

جدول۲- میانگین لگاریتم و انحراف معیار *اشریشیاکلی* (Log cfu/g) در زمان های مختلف تحت تأثیر غلظت های متفاوت اسانس مرزه خوزستانی در پنیر سفید ایرانی (UF)

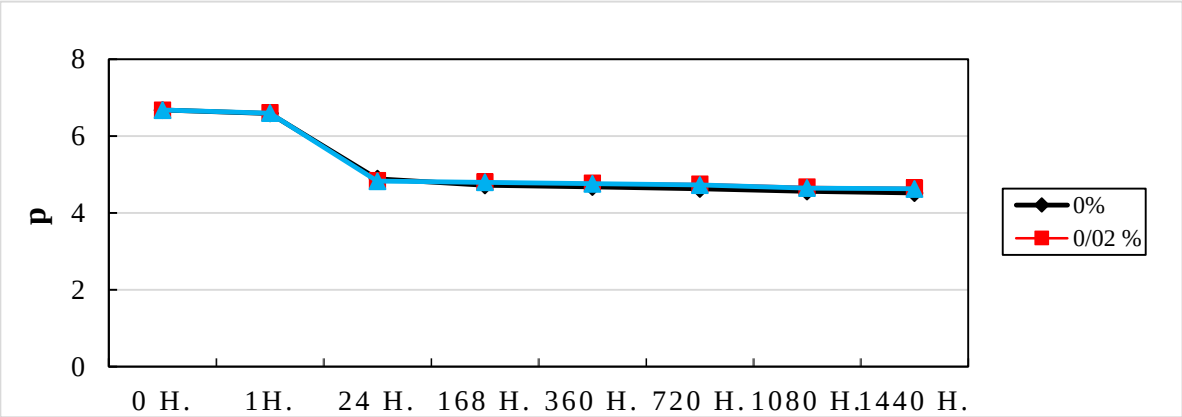
زمان / غلظت	ساعت صفر	ساعت یک	روز یک	روز۷	روز۱۵	روز ۳۰	روز۴۵	روز ۶۰
٪ ۰	۰/۰۲±۴/۶۱	۰/۰۱±۴/۶۵	۰/۰۱±۴/۶۷	۰/۰۱±۴/۶۶	۰/۰۸±۴/۲۶	۰/۰۱±۳/۵۸	۰/۰۷±۳/۵۲	۰/۰۴±۳/۴۴
٪ ۰/۰۲	۰/۰۱±۴/۵۸	۰/۰۱±۴/۵۸	۰/۰۱±۴/۵۹	۰/۰۲±۴/۵۵	۰/۰۲±۳/۷۳	۰/۰۱±۳/۶۰	۰/۰۱±۳/۵۶	۰/۰۱±۲/۷۸
٪ ۰/۰۴	۰/۰۲±۴/۵۴	۰/۰۱±۴/۵۶	۰/۰۲±۴/۵۵	۰/۰۲±۴/۵۰	۰/۰۴±۳/۴۴	۰/۰۱±۳/۳۰	۰/۰۴±۳/۳۱	۰/۰۲±۲/۵۹



نمودار۱- مقایسه اثر سه گروه شاهد فاقد عصاره و حاوی عصاره با غلظت های ۰/۰۲ ٪ و ۰/۰۴ ٪ مرزه خوزستانی بر تراکم باکتری *اشریشیاکلی* در نمونه پنیر سفید ایرانی (UF)

جدول۳- میانگین و انحراف معیار تغییرات میزان pH در زمان های مختلف تحت تأثیر غلظت های متفاوت اسانس مرزه خوزستانی در پنیر سفید ایرانی (UF)

زمان / غلظت	ساعت صفر	ساعت یک	روز یک	روز۷	روز۱۵	روز ۳۰	روز۴۵	روز ۶۰
٪ ۰	۶/۶۸	۰/۰۱±۶/۵۹	۰/۰۷±۴/۸۹	۰/۰۳±۴/۷۲	۰/۰۷±۴/۶۸	۰/۰۲±۴/۶۳	۰/۰۲±۴/۵۶	۰/۰۱±۴/۵۲
٪ ۰/۰۲	۶/۶۸	۰/۰۲±۶/۶۱	۰/۰۴±۴/۸۴	۰/۰۴±۴/۸۱	۰/۰۱±۴/۷۸	۰/۰۱±۴/۷۵	۰/۰۷±۴/۶۸	۰/۰۴±۴/۶۵
٪ ۰/۰۴	۶/۶۸	۰/۰۱±۶/۶۰	۰/۰۳±۴/۸۳	۰/۰۴±۴/۸۰	۰/۰۲±۴/۷۶	۰/۰۲±۴/۷۳	۰/۰۴±۴/۶۳	۰/۰۲±۴/۶۳



نمودار۲- تغییرات میزان pH در غلظت های مختلف اسانس گیاه مرزه خوزستانی در پنیر سفید ایرانی (UF) پس از ۶۰ روز

بحث

باکتری *اشریشیاکلی* موجب باد کردگی 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 (کریم و بنیادیان، ۱۳۸۳). تاکنون پژوهش‌های زیادی بر روی اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی مختلف و اثر ممانعت از رشد این اسانس‌ها بر روی *اشریشیاکلی* صورت گرفته است که اکثریت این بررسی‌ها در محیط‌های کشت آزمایشگاهی بوده است و پژوهش‌های محدودی در مدل‌های غذایی نظیر فرآورده‌های شیر و غیره انجام شده است. اکثر تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد، حساسیت باکتری‌های گرم منفی در مقابل ترکیبات ضد میکروبی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت کمتر است که ممکن است به خاطر وجود غشای خارجی در ساختمان دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی باشد (Oussalah *et al.*, 2007). مرزه خوزستانی یکی از همین گیاهان می‌باشد که به خاطر خواص ضد میکروبی آن مورد توجه بسیاری از پژوهشگران است. در طرح حاضر سعی شده است که اثرات غلظت های مختلف این عصاره بر روی باکتری *اشریشیاکلی* به عنوان یک پاتوژن بیماریزا و خطرناک در پنیر سفید ایرانی (UF) بررسی شود. همانطور که در قسمت نتایج بیان گردید در مطالعه حاضر اسانس مرزه خوزستانی در غلظت ۰/۰۲ درصد و هم غلظت ۰/۰۴ درصد باعث کاهش تعداد باکتری شدند که در صورت مقایسه این دو گروه با گروه شاهد فاقد عصاره که تا پایان زمان ۶۰ روز همچنان حاوی باکتری بیشتری بود، می‌توان چنین نتیجه گرفت که عصاره مرزه خوزستانی دارای اثرات ضد باکتریایی قوی و مطمئنی بر علیه *اشریشیاکلی* است. کاهش جزئی در تعداد باکتری در گروه فاقد اسانس را نیز می‌توان ناشی از تغییرات pH در طی دوره رسیدن پنیر

دانست. هر دو غلظت عصاره توانستند از تعداد باکتری بکاهند. در واقع تأثیرگذارترین زمان نگه داری زمان ۶۰ روز در غلظت های ۰/۰۲ ٪ و ۰/۰۴ ٪ می‌باشد که هر چه مدت زمان نگه داری بیشتر شود میزان رشد باکتری کاهش می-یابد. نتایج اندازه گیری میزان pH در طی ۶۰ روز نشان داد که میزان pH با گذشت زمان در هر ۳ تیمار روند نزولی دارد. همچنین مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری بین pH نهایی نمونه های حاوی اسانس وجود ندارد. تحقیقات متعددی به بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس های گیاهی مختلف در محیط های کشت و در مواردی در مدل های غذایی پرداخته اند. کریم و همکاران (۱۳۸۳) در مطالعه خود تأثیر ضد میکروبی روغن های فرار گیاهان نعناع، ترخون، زیره، پونه و آویشن بر باکتری *اشریشیاکلی* در پنیر سفید ایرانی را اعلام نمودند که در مطالعه آنان پس از آویشن که دارای بیشترین تأثیر ضد میکروبی بر باکتری *اشریشیاکلی* بود، نعناع، زیره و پونه تقریباً تاثیر مشابه داشته به طوری که پس از گذشت ۱۶۸ ساعت (۷روز) در غلظت-های ۰/۳ و ۰/۴ درصد به ترتیب منجر به کاهش ۲ و ۲/۵ log از بار باکتریایی *اشریشیاکلی* نسبت به گروه شاهد شدند این محققین کمترین تأثیر را مربوط به گیاه ترخون اعلام داشتند که می‌توان گفت نتایج مشابه به طرح حاضر بوده است (کریم و بنیادیان، ۱۳۸۳). انصاری و همکاران (۱۳۹۰) در مطالعه خود اثرات ضد میکروبی مرزه خوزستانی (مشابه طرح حاضر) بر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* و نیز بر برخی شاخص‌های فساد فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان که در دمای ۴ درجه و به مدت ۱۸ روز انجام پذیرفت را اعلام نمودند. به این منظور از غلظت‌های ۰/۵۰، ۰/۲۵، ۰/۱۲ و ۰/۰۶ میکروگرم در گرم فیله مرزه خوزستانی استفاده گردید. نتایج این بررسی نشان داد که اسانس این گیاه منجر به کاهش جمعیت باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در فیله ماهی شده است به طوری که غلظت ۰/۵ میکروگرم در گرم مرزه خوزستانی دارای بیشترین اثر بود (انصاری و همکاران ،۱۳۹۳). مقصود لو و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعه خود اثر افزودن اسانس مرزه خوزستانی (در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ پی‌پی ام) و نیتریت سدیم (در غلظت‌های ۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ پی‌پی ام) هر یک به تنهایی و نیز هم افزایی نیتریت سدیم و اسانس مرزه به صورت توأم (در غلظت های ۲۰۰:۲۵۰ و ۲۵۰:۳۰۰) را بر خصوصیات باکتریایی، شیمیایی و حسی سوسیس فرانکفورتر بر باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در یک دوره نگهداری ۲۰ روزه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار دادند. اندازه گیری شمارش میکروبی نمونه ها نشان داد که اسانس مرزه در غلظت ۶۰۰ پی‌پی ام قدرت ضد میکروبی قوی‌تری در برابر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به نیتریت ۵۰۰ پی‌پی ام دارد و همچنین در بین تیمارهای مرزه در سطوح مختلف در مورد محیط کشت شمارش کلی، بیشترین قدرت مهار کنندگی مربوط به بالاترین غلظت مرزه (۶۰۰ پی‌پی ام) در کل دوران نگه داری بود ($p<0/05$). (مقصود لو و همکاران، ۱۳۹۲). صامتی و همکاران (۱۳۹۴) بر اساس نتایج مطالعه خود، اثرات ضد میکروبی پودر مرزه خوزستانی در سطوح ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد بر جلوگیری از رشد کلی‌فرم، کپک و مخمر و هم چنین بر پذیرش کلی، pH و اسیدیته نمونه‌های پنیر محلی بروجرد طی نگه داری در سرما را اعلام نمودند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که با افزایش درصد پودر مرزه خوزستانی در نمونه‌های پنیر، تعداد کلی‌فرم، کپک و مخمر، اسیدیته قابل تیتر، پذیرش کلی و pH به ترتیب به طور معنی‌داری کاهش و افزایش یافت ($p<0/05$). در واقع می‌توان چنین بیان کرد که به کارگیری پودر گیاهی در غلظت ۰/۳ درصد باعث کاهش log cfu/g ۲-۱/۵ در تعداد کلی‌فرم‌ها در هر هفته نسبت به نمونه شاهد شد و نیز نتایج به دست آمده از اندازه گیری pH و اسیدیته نمونه‌های پنیر حاوی مرزه خوزستانی نشان داد که pH نمونه‌های حاوی مرزه خوزستانی بالاتر از نمونه شاهد، و مقدار اسیدیته قابل تیتر کم تر از نمونه شاهد می-باشد که با نتایج پژوهش کنونی مطابقت دارند (صامتی و همکاران، ۱۳۹۴). سفیدکن و همکاران (۱۳۸۶) در مطالعه خود اثرات ضد میکروبی اسانس دو گونه مرزه خوزستانی و بختیاری در دو مرحله برداشت بر ۵ نوع باکتری گرم مثبت و ۳ نوع باکتری گرم منفی را تایید نمودند. اسانس مرزه خوزستانی در هر دو مرحله برداشت و اسانس مرزه بختیاری در مرحله قبل از گلدهی دارای اثرات ضد میکروبی قابل ملاحظه ای هستند که می‌توانند به عنوان جایگزینی مناسب

برای آنتی بیوتیک‌های سنتزی که مقاومت باکتری‌ها به آن ها روز به روز در حال افزایش است به کار روند (سفیدکن و همکاران، ۱۳۸۶). ویریندا و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه خود اثرات ضد لیستریایی روغن میخک در مدل های غذایی یعنی گوشت و پنیر در دو دمای ۷ و ۳۰ درجه سلسیوس را اعلام نمودند که غلظت ۱ درصد اسانس میخک سبب جلوگیری از رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در هر دو دما و هر دو مدل غذایی گردید. بنابراین، چنین نتیجه گیری شد که اسانس میخک دارای یک اثر بالقوه به عنوان یک نگه دارنده طبیعی در گوشت و پنیر است Virinda & Giner, (2006). اسمیت و همکاران (۲۰۰۱) در مطالعه خود اثرات ضد میکروبی چهار اسانس طبیعی گیاهی یعنی اسانس برگ بو ، میخک ، دارچین و آویشن، به عنوان یک نگه دارنده غذایی طبیعی در غلظت های صفر، ۰/۵ و ۱ درصد در پنیرهای نرم با چربی کم و زیاد، بر علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریتیدیس* در دماهای ۴ و ۱۰ درجه سلسیوس در طی ۱۴ روز اعلام نمودند. در پنیر با چربی کم هر چهار اسانس طبیعی در غلظت ۱ درصد باعث کاهش رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* تا کمتر از یک پرگنه در هر گرم شدند، در مقابل در پنیر با چربی زیاد اسانس میخک تنها اسانسی بود که باعث کاهش مشابه گردید Smith *et al.*, 2001). فضل آرا و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه خود تأثیر ضد باکتریایی اسانس گیاه زیره سبز بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر سفید ایرانی را اعلام نمودند که در این مطالعه از غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد (مشابه طرح حاضر) اسانس زیره سبز استفاده شد. نتایج نشان داد غلظت باکتری در پنیر حاوی غلظت ۰/۰۲ ٪ اسانس زیره ی سبز، پس از ۳۰ روز ۱ log کاهش یافت و از این روز به بعد باکتری جدا نشد. همچنین در پنیر حاوی غلظت ۰/۰۴ ٪ اسانس پس از ۱۵ روز، باکتری۱ log کاهش یافت و از این روز به بعد، از این نمونه باکتری جدا نشد در حالی که پنیر فاقد اسانس (شاهد) در تمام طول دوره حاوی باکتری بود (Fazlara *et al.*, 2012).

در طرح حاضر سعی شده است که اثرات غلظت‌های مختلف اسانس مرزه خوزستانی بر روی باکتری *اشریشیاکلی* به عنوان یک پاتوژن بیماریزا و خطرناک در پنیر سفید ایرانی بررسی شود.

در پایان باید خاطر نشان کرد که یافته‌های این پژوهش نشانگر اثرات بالقوه ضد باکتریایی مرزه خوزستانی در پنیر است که قابل پذیرش مصرف کنندگان و سازمان‌های مسئول ملی و بین المللی دخیل در امر بهداشت غذایی، در مقایسه با سایر ترکیبات افزودنی شیمیایی می‌باشد. کاربرد غلظت های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد اسانس مرزه خوزستانی در پنیر می‌توانند سبب ایمنی و سلامت این گونه پنیرها با دستیابی به اثرات مفید ارگانولپتیکی و کاهش رشد باکتری *اشریشیاکلی* شود. با توجه به خاصیت ضد باکتریایی اسانس مرزه خوزستانی، استفاده از آن توأم با سایر فاکتورهای محیطی مانند دما و ... بر روی میکروب‌های پاتوژن و عامل فساد و همچنین اثرات اسانس مذکور بر روی باکتری *اشریشیاکلی* در دیگر مواد غذایی توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از هیئت مدیره شرکت شیر پگاه خوزستان (شوش دانیال)، مدیریت و پرسنل گرانقدر آزمایشگاه های میکروبیولوژی و پنیر UF بخاطر همکاری‌هایشان در اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

۱. انصاری، مهسا.، سلطانی، مهدی.، حسینی، ابراهیم و کمالی، ابوالقاسم. (۱۳۹۳). مطالعه اثر اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja (khuzestanica* بر ممانعت از رشد باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در گوشت قزل آلای رنگین کمان در دمای یخچال. مجله میکروب شناسی مواد غذایی، سال اول، شماره ۳، صفحه ۳۹-۳۳.

۲. داردرفشی، محمدجواد.، بهرامی، غلامرضا.، صادقی، احسان.، خان احمدی، معصومه.، محمدی، میترا و محمدی، رضا. (۱۳۹۲). تأثیر اسانس گیاه چویر بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در طی تولید و نگهداری پنیر سفید ایرانی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال هشتم، شماره۴، صفحه ۲۰-۱۳.

۳. سفیدکن، فاطمه.، صادق زاده، لیلا.، تیموری، مریم.، عسگری، فاطمه و احمدی، شهلا. (۱۳۸۶). بررسی اثرات ضد

میکروبی اسانس دو گونه مرزه خوزستانی و بختیاری در دو مرحله برداشت. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۳، شماره ۲، صفحه ۱۸۲-۱۷۴.

۴. صامتی، صدریه.، فدائی نوغانی، وجیهه. (۱۳۹۴). اثر پودر مرزه خوزستانی بر کلی فرم ها و کپک و مخمر در پنیر محلی بروجرد. فصلنامه فناوری های نوین غذایی، سال سوم، شماره ۱۰، صفحه ۸۷-۷۷.

۵. قهرمان، احمد. (۱۳۷۸). فلور رنگی. جلد۱۷، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، ۱۲۵ صفحه.

۶. مرتضوی، سید علی.، ضیاء الحق، سید حمید رضا. (۱۳۸۸). میکروبیولوژی غذایی مدرن، جلد دوم، ویرایش هفتم، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۸۰ صفحه.

۷. مشاک، زهره.، مرادی، بیژن.، آخوندزاده بستی، افشین.، عباسی فر، آرش و گندمی، حسن. (۱۳۸۷). مطالعه رفتار باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* در طی روند تولید پنیر سفید ایرانی تحت تاثیر اسانس آویشن شیرازی. فصلنامه گیاهان دارویی، سال هشتم، شماره ۲۹، صفحه ۱۲۲-۱۱۴.

۸. مقصودلو، یحیی.، اصغرپور، اطهر و آریایی، پیمان. (۱۳۹۲). اثر افزودن اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja khusestanica*) بر خصوصیات باکتریایی، شیمیایی و حسی سوسیس فرانکفورتر. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، جلد ۲، شماره ۳، صفحه ۲۹۴-۲۷۹.

9. Akhondzade, SH. (2000). *Encyclopedia of Medicinal plants of Iran*. Institute of medicinal plants jahad daneshgahi. Arjmand publication. Tehran, Iran.

10. Delaquis PJ, Stanich K, Girad B and Mazza G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalylptus essential oils, Int J Food Microbiol, 74: 101-109.

11. Dorman, H., Hiltunen, R. (2004). Fe (III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis L.*) Extract and subfractions. Food Chem, 88: 193-199.

12. Fazlara A, Sadeghi E, Rostami Soleimani P. (2012). Study on the antibacterial effects of *Cuminum cyminum* essential oil on *Listeria monocytogenes* in Iranian white cheese. J Food Sci & Tech, 35(9): 35-44.

13. Jamzad, Z. (1994). A new species of the genus Satureja from Iran. Iranian J of Botany, 6(2): 215-218 .

14. Moosavy, M.H., Basti, A.A., Misaghi, A., Karim, G., Zahraei Salehi, T. and Mostafavi, E. (2009). Effect of Nisin on the growth of *Staphylococcus aureus* in Commercial Barley Soup. Pharm. Sci, 15(3): 235- 240.

15. Omidbaigi, R. (1999). *Production and Processing of Medicinal Plants*. Vol. 2. Tarahan Nashr Publications. Tehran, Iran.

16. 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: 414 – 20.

17. Smith p, Stewart J and Fyfe L (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiol, 18: 463-470 .

18. Tassou, C and Nychas G-JE. (1995). Antimicrobial activity of essential oil of mastic gum (Pistacia lentiscus var. chia) on gram positive and gram negative bacteria in brith and in model food system. Int Biodeterior Biodegradation, 12: 411-420.

19. Tassou C, Koutsoumani, K and Nychas G-JE. (2000). Inhibition of *Salmonella entritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. Food Res Int, 33: 273-80.

20. Virinda, H. 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. Int J of Food Microbiol, Vol. 106: 90-94.

The effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on *E.coli* in Iranian white cheese

Shahrabi Sh, Fazlara A *, Zand moghaddam A
Department of food Science and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran
*** Corresponding author:** *Fazlara2000@yahoo.com*
Accepted: 29 December 2016 Received: 21 March 2017

Abstract
Escherichia coli is one of the most important members of coliforms, which are important in terms of Pathogenicity and toxicity. The aim of this study using of *Satureja khuzestanica* essential oil as an antibiotic and natural preservatives in a food model (cheese UF) was after 60 days of storage. The data was analyzed using SPSS 16 and statistical tests One_Way ANOVA and Repeated Measures Define. The effect of *Satureja khuzestanica* essential oil (in 0.02% and 0.04% concentration) was studied on *Escherichia coli* with 10^4 cfu/ml in retentate consumed for cheese making with the blank sample which was not contained essential oil. The concentration of 0.02 and 0.04 % bacteria in the cheese containing the essential oil of 15 keeping up with the other days showed significant difference with the cheese without *Satureja khuzestanica* essential oil ($p<0.05$). And its reduction rate at the end of the storage period in experimental treatments were 2.78 and 2.59 Log more than the blank sample respectively. While the cheese without *Satureja khuzestanica* essential oil (0%) until the end of the 60 days it still contains more bacteria. Results of determination of pH over a period of 60 days showed significant differences between all treatment groups ($p<0.05$). These results showed that *Satureja khuzestanica* essential oil has antimicrobial effects on *Escherichia coli* in Iranian UF white cheese.

Keywords: Anti bacterial, Cheese, *E. coli*, *Satureja khuzestanica* essential oil, Ultrafiltration.