Archive of SID

بررسی اثر کود دهی بر ترکیبات شیمیایی اسانس زیره و فعالیت ضد میکروبی آن

فرهنگ مراقبی[۱] ، مریم تیموری[۲] ، علیرضا صاحبی[۳]

چکیده

با افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها نیاز بسیاری به یافتن منابع جدیدی برای تولید داروهای جدید وجود دارد. زیره به عنوان گیاه دارویی می‌تواند انتخاب مناسبی برای این کار باشد. هدف این مطالعه بررسی تأثیر کودهای شیمیایی و آلی بر کیفیت اسانس و فعالیت ضد میکروبی اسانس زیره است. برای این کار بذرهای زیره به هنگام کاشت تحت تأثیر کودهای شیمیایی و آلی قرار گرفتند. اسانس بذرها با روش تقطیر با آب تهیه و با دستگاه گاز کروماتوگرافی تجزیه و ترکیبات آن تعیین شد. اثرات ضد میکروبی اسانس زیره با روش انتشار در آگار اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تیمار A_2 تأثیرات مثبتی بر کیفیت اسانس داشته سبب افزایش ترکیب بتاپینن شده است. اثرات ضد باکتریایی اسانس قابل ملاحظه بوده و حساسیت باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی بوده است. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که اسانس زیره می‌تواند جایگزین مناسبی برای تعدادی از آنتی بیوتیک‌ها باشد.

کلمه‌های کلیدی: کوددهی – اسانس – زیره - فعالیت ضد میکروبی.

۱- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری (E.Mail:Moraghebi@yahoo.com)

۲- مربی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع

۳- عضو انجمن علمی دانشجویان کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری

تاریخ دریافت: پاییز ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: زمستان ۱۳۸۷

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در طول قرن‌های بسیاری گیاهان همواره به عنوان منابع غنی از فرآورده‌های طبیعی مورد توجه بوده‌اند. در طب سنّتی از بخش‌های مختلف گیاهان برای درمان بیماری‌های عفونی و غیر عفونی استفاده شده است (Parekh & All, 2005). در سال‌های اخیر به دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و در نتیجه افزایش مقاومت دارویی در بین عامل بیماری‌زا، توجه زیادی به گیاهانی که فعالیت ضدمیکروبی دارند، شده است. زیره سبز با اسم علمی *Cuminum cyminum* از خانواده‌ی چتریان، گیاهی کوچک، ترد و یکساله است که ارتفاع آن تقریباً به ۳۰ سانتی‌متر می‌رسد؛ دارای گل‌های کوچک سفید قرمز یا سوسنی رنگ است که به دور چتری متشکل از ۱۰ تا ۲۰ گل قرار می‌گیرند. میوه‌های آن که به عنوان بذرهای آن شناخته می‌شود به رنگ زرد تا خاکستری مایل به قهوه‌ای است (مظفریان ،۱۳۸۳). زیره از زمین‌های مسطح و تا ارتفاع ۳۳۳۵ متری رشد می‌کند. آب و هوای معتدل تا گرم را ترجیح می‌دهد و در طول سال دو بار (اردیبهشت و اواخر شهریور) محصول می‌دهد (De & All.2003). زیره سبز دارای خواص دارویی بسیاری بوده و از آن به عنوان ضد نفخ ، بادشکن، مسهل و قابض استفاده می‌شود. به علاوه از آن در درمان ناراحتی‌های دستگاه تنفسی، کاهش سرفه و تحریک اندام‌های جنسی استفاده می‌شود. از زیره سبز به عنوان نگهدارنده در غذاهای تند و سایر فرآورده‌های غذایی استفاده می‌شود. ثابت شده است که این گیاه از رشد قارچ‌های عامل فساد مواد غذایی جلوگیری می‌کند. به علاوه از ان برای کنترل کپک زدن مواد غذایی استفاده می‌شود (De & All, 2003).

اسانس‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند و خصوصیات ضد باکتریایی آن‌ها به خوبی شناخته شده و به‌کار می‌رود. بر اساس یافته‌های محققان مختلف خصوصیات کمی و کیفی اسانس گیاهان دارویی به عوامل زیادی مانند نور (Voirin & All,1990 ; Fahlen & All, 1997)، زمان کاشت و کوددهی (Marotti & All, 1994 ; Dragland & Aslaksen, 1997) و زمان برداشت (Shu & Lawrence, 1997) بستگی دارد.

در مطالعه انجام شده توسط Iacobellis & All (۲۰۰۵) اثر ضد باکتریایی اسانس زیره بر تعدادی از باکتری‌ها نشان داد که این اسانس اثرات ضد میکروبی قوی بر علیه باکتری‌های متعلق به جنس‌های Clavibacter, Agrobacterium, Xanthomonas, Ralstonia, Curtobacterium, Rhodococcus, Erwinia داشته اما اثر آن بر باکتری Pseudomonas قوی نبوده است. نتایج این بررسی نشان دهنده‌ی امکان استفاده از اسانس زیره در کنترل باکتری‌های بیماری‌زا در گیاهان نیز بوده است. مطالعه دیگری توسط Agaogolu & All (۲۰۰۷) بر روی اثرات ضد میکروبی تعدادی از ادویه‌های مورد استفاده در غذاهای کشور ترکیه از جمله زیره انجام گرفته که نتایج این بررسی نشان داد که عصاره‌ی دی‌اتیل‌اتر زیره دارای اثرات بازدارنده بر رشد استافیلوکوکوس ارئوس،

www.SID.ir

Archive of SID

استرپتوکوکوس فکالیس، میکروکوکوس لوتئوس و کاندیدا البیکنس بوده است. البته اثرات باز دارنده مشابهی در ارتباط با کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلی مشاهده نشد.

این بررسی برای مطالعه اثر کود دهی بر ترکیبات شیمیایی اسانس زیره سبز و فعالیت ضد میکروبی آن بر علیه ۸ باکتری که معمولاً از راه مواد غذایی منتقل می‌شوند صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای زیره از استان اصفهان تهیه و به صورت کشت بهاره در مزرعه‌ی تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری در کیلومتر ۱۲ اتوبان تهران– قم کاشته شد. خاک مزرعه از نوع رسی و بدون هر گونه محدودیّت غذایی بود، کشت بذرها به صورت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرارصورت گرفت. برای کود دهی از کودهای شیمیایی و آلی استفاده شد (جدول ۱). برای کود ازته از کود اوره $CO(NH_2)_2$ با ۴۸٪ ماده مؤثر (NO_3NH_4)، سوپر فسفا ت تریپل $CaH_4(PO_4)_2$ با ۲۱٪ ماده مؤثر (P_2O_5) و از کود کلرید پتاسیم KCl با ۵۲ ٪ ماده مؤثر (K_2O) استفاده شد. از کود یکساله پوسیده‌ی گوسفندی به عنوان کود دامی نیز استفاده شد. تیمارهای کود در زمان بذر پاشی اعمال شد به غیر از کود اوره که نصف آن در زمان بذرپاشی و بقیه در زمان پنجه‌زنی اضافه شد. برداشت بذرها در خرداد ماه زمانی که ۷۰٪ بذر ها رسیده بودند، صورت گرفت.

اسانس‌گیری و تعیین ترکیبات شیمیایی

پس از خشک کردن بذرها در سایه، به روش تقطیر با آب در دستگاه کلونجر به مدت ۴ ساعت اسانس‌گیری به عمل آمد. اسانس‌ها را در شیشه تیره جمع‌آوری کرده به کمک دکانتور فاز آبی را از اسانس جدا کرده و پس از توزین در یخچال نگهداری شدند. ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها در پژوهشگاه صنعت نفت با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی Varian3400 متصل به دستگاه طیف‌سنج جرمی varian/q69drupole1200 و با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت تعین شدند. ستون مورد استفاده factor four (v7-5ms) به طول ۳۰ متر، قطر ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه فاز ساکن۰/۲۵ میکرومتر برای دامنه جرمی ۴۰۰-۳۳ بود. از درجه حرارت ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت افزایش ۱۰درجه سانتی‌گراد در دقیقه استفاده شد. درجه حرارت محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد و دمای ترانسفرلاین ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. از گاز هلیم به عنوان گاز حامل که

www.SID.ir

Archive of SID

فشار آن در سر ستون ۱/۵ml/min بود استفاده شد. نوع ترکیبات با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه‌ی کامپیوتری Wiley و کتابخانه‌ی تخصصی ترپنوییدها NIST شناسایی شدند.

بررسی اثرات ضد میکروبی

در این مطالعه اثرات ضد میکروبی اسانس‌های زیره بر چهار نوع باکتری گرم مثبت شامل *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus*، *Micrococcus loteus* و *Staphylococcus areous* و چهار نوع باکتری گرم منفی شامل *Kelebsiella pneumonia*، *Pseudomonas aeroginosa* Escherichia coli و Yersinia enteroolitica بررسی شد. این باکتری‌ها از کلکسیون میکروبی مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. برای بررسی اثر ضد میکروبی اسانس‌ها، از روش انتشار در آگار به صورت دیسک دیفیوژن استفاده شد. از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌ها مایه تلقیح با غلظت ۱ استاندارد مک فارلند معادل ۳×۱۰^{۸} cfu/ml در محیط کشت تریپتوکیس سوی برات تهیه و ۵۰۰ میکرو لیتر به سطح محیط کشت تریپتوکیس سوی آگار تلقیح و با استفاده از سواپ پنبه‌ای استریل به شکل یکنواخت در سطح محیط پخش شد. بر روی محیط کشت دیسک‌های بلانک با قطر ۶ میلی‌متر (شرکت پادتن طب) دارای ۳۰ میکرو لیتر از اسانس با غلظت‌های مذکور بر روی پلیت قرار گرفت. از دیسک بلانک حاوی ۳۰ میکرو لیتر دی‌متیل‌سولفوکساید به عنوان شاهد منفی استفاده شد. برای مقایسه اثرات ضد میکوبی اسانس‌ها ازدیسک جنتامایسین و کربنی سیلین بر علیه باکتری‌های گرم منفی و از دیسک تتراسایکلین و اریترومایسین بر علیه باکتری‌های گرم مثبت استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد. این آزمایش با ۳ تکرار انجام گرفت (United States Pharmacopoeia Convention, 1999).

نتایج

الف - اسانس

تعیین ترکیبات متشکله اسانس با استفاده از دستگاه GC/MS و اطلاعات کتابخانه‌ای نشان داد که ۷ ترکیب اصلی در اسانس زیره وجود دارد که در مجموع حدود ۹۸٪ ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهند. این ترکیبات عبارتند از بتا- پینن، سیمن (Cymene)، گاما- ترپینن، پولگن(Pulegone) ،کومینیل آلدیید (Cuminyl aldehyde) ، (پارا) منتا ۱،۳ دین-۷-آل (Mentha-1,3-dien-7-al (p)) و میرتنال (Myrtenal)،

www.SID.ir

Archive of SID

(جدول ۲). نتایج آورده شده در این جدول نشان می‌دهد که میزان بتا- پینن درکلیه‌ی تیمارها به غیر از تیمار A_1 بیش از مقدار آن در نمونه‌های شاهد است. تیمارهای A_2،A_3،B_1 اعمال شده نیز سبب افزایش میزان گاما- ترپینن در اسانس شده است. میزان ترکیب پولگن (Pulegone) در تیمار شاهد بیش از سایر تیمارها است و این امر نشان می‌دهد تیمارهای انجام گرفته سبب حذف این ترکیب می‌شود. میزان ترکیب کومینیل آلدیید تحت تأثیر تیمارهای انجام شده قرار نگرفته و میزان آن در تیمار شاهد بیش از بقیه است. تیمارهای A_1 و A_3 نیز سبب افزایش میزان پارا- منتا ۱،۳ دین-۷-آل (p Mentha-1,3-dien-7-al) نیز شده است. ترکیب میرتنال اصلی‌ترین ترکیب تشکیل دهنده‌ی اسانس بوده و تیمارهای A_1 و B_2 موجب افزایش قابل ملاحظه‌ای در آن شده است. هیچ کدام از تیمارهای اعمال شده تأثیری در میزان ترکیب سیمن (Cymene) نداشته است.

ب- اثرات ضد میکروبی

در جدول ۳ اثر ضد میکروبی اسانس زیره بر گونه‌های مورد بررسی آورده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود اسانس زیره در رقت ۱:۳ مورد استفاده در این بررسی اثرات ضد میکروبی قابل توجه‌ای از خود نشان داده است به طوری که هاله عدم رشد در مورد باکتری‌های گرم مثبت بیش از ۳۰ میلی‌متر بوده است. اثرات بازدارنده اسانس زیره بر باکتری‌های گرم منفی کم‌تر از باکتری‌های گرم مثبت بوده و حساسیت یرسینیا انتروکولیتیکا بیش از سایر باکتری‌های گرم منفی بوده است و وسودوموناس آئروژینوزا مقاومت بیش‌تری در مقایسه با سایر باکتری‌های گرم منفی از خود نشان داده است. در مورد اثر تیمارهای انجام شده با توجه به حساسیت بالای باکتری‌های گرم مثبت تفاوتی بین تیمارها مشاهده نشد اما در مورد باکتری‌های گرم منفی که حساسیت کم‌تری داشتند تفاوت‌هایی در بین تیمارهای محتلف مشاهده می‌شود.

بحث

زیره گیاهی است با بوی معطّر و نافذ که در تولید آب میوه‌های محتلف، انواع شیرینی، پنیر، ساندویچ، انواع مختلف سس سالاد و غیره کاربرد دارد. به علاوه دارای اثرات دارویی زیادی است که برای درمان ناراحتی‌های دستگاه گوارش، دستگاه تنفسی و نیز درمان پوسیدگی دندان از آن استفاده می‌شود (Bown , 1995). از اسانس زیره به عنوان آرام کننده‌ی دردهای معده استفاده می‌شود. به علاوه در درمان اسهال و سوء هاضمه مفید است. به شکل کاتاپلاسم (کمپرس) برای درمان لکه‌های پوستی و دردهای موضعی کاربرد دارد (Pruthi, 1976). با مراجعه

www.SID.ir

Archive of SID

به ترکیبات تشکیل دهنده در اسانس تیمار A_2 میزان ترکیبات بتا- پینن با اثرات ضد میکروبی شناخته شده (Leite & All, 2007) در مقایسه با شاهد افزایش یافته است و میزان کومینیل آلدیید در اسانس در حد مطلوب است به علاوه مقدار ترکیب نامطلوب پارا منتا ۱،۳ دین-۷- آل کاهش یافته است این ترکیب سبب ایجاد بوی نامطلوب در اسانس زیره حرارت دیده می‌شود و کم بودن آن نشانه مطلوبیّت اسانس است. بنابراین با توجه به بالارفتن عملکرد اسانس، افزایش میزان بتا- پینن و کاهش مقدار پارا منتا ۱،۳ دین-۷- آل تیمار A_2 برای افزایش کارایی کمی و کیفی اسانس پیشنهاد می‌شود.

در مجموع نتایج آزمایش‌های ضد میکروبی نشان می‌دهد که اسانس زیره بر باکتری‌های گرم مثبت اثرات بازدارنده‌ی بیش‌تری داشت که با مطالعه و یافته‌های Agaogolu & All (۲۰۰۷) برابری دارد در بررسی‌های انجام شده توسط آن‌ها باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس، استرپتوکوکوس فکالیس، میکروکوکوس لوتئوس حساسیت بیش‌تری از باکتری‌های گرم منفی نشان دادند. در مجموع یافته‌های محققان دیگر از جمله Ouattara & All (۱۹۹۷) ، Shelef & All (۱۹۸۰) و نیز Agaogolu & All (۲۰۰۷) نشان دهنده‌ی حساسیت بالاتر باکتری‌های گرم مثبت هستند. حساسیت بالاتر باکتری‌های گرم مثبت می‌تواند به دلیل ساختار دیواره‌ی سلولی باکتری‌های گرم مثبت و نفوذپذیری بیش‌تر آن‌ها باشد (Unluturk, 1998). تفاوت مشاهده شده در حساسیت بین باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به وجود ژن‌های احتمالی موجود بر روی پلاسمید که عامل مقاومت به عوامل ضد میکروبی هستند نسبت داد (Karaman & All, 2003). با توجه به اثرات ضد میکروبی بالای زیره بر علیه باکتری‌های آزمایش شده می‌توان نتیجه گرفت که از زیره و ترکیبات فرار آن به عنوان جایگزین افزودنی‌های شیمیایی در صنایع غذایی و هم‌چنین به عنوان نگهدارنده استفاده کرد.

جدول ۱- تیمارهای کود اعمال شده بر بذرهای زیره سبز

تیمار کود	اوره $CO(NH_2)_2$	سوپر فسفات تریپل $CaH_4(PO_4)_2$	پتاس (KCl)	کود دامی
A_1	۲۰ kg/h	۱٦ kg/h	۲۰ kg/h	-
A_2	٤۰ kg/h	۳۲ kg/h	٤۰ kg/h	-
A_3	۸۰ kg/h	٦٤ kg/h	۸۰ kg/h	-
B_1	-	-	-	۱۵۰۰۰ kg/h
B_2	-	-	-	۲۵۰۰۰ kg/h
شاهد	-	-	-	-

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۲- در صد اجزای ترکیبات اسانس‌های به دست آمده در ٦ تیمار کودی

تیمار / ترکیب	شاهد٪	٪ A_1	٪ A_2	٪ A_3	٪ B_1	٪ B_2
بتا - پینن	٦/٣	٤/٢	٢٠/٦٥	١٣	٨/٩	٩/٨
سیمن	٧	٤/٤	٧/٩٨	٦/٣	١٠/٧	٦/٠٨
گاما- ترپین	١٦/٢٨	١٦/٤٤	٢٣/٠٨	٢٢/٥	٢٦/٦	١٣/٩٥
پولگن	٧/٤٦	٢/١	ناچیز	٠/٨	ناچیز	ناچیز
کومینیل آلدیید	٢٧/٨	٢٣/٩٠	١٦/٥٩	١٩/٥	٢٣/٥	٢٦/٨٦
منتا ١-٣ دین-٧-آل	٣/٨	٥/٣	٣/٢٠	٩/٦	٢/٣٩	٢/٢٥
میرتنال	٣١	٤٣/٥	٢٨/٤٨	٢٨	٣٢/٧	٤٠/٢

جدول ٣- قطر هاله ممانعت از رشد (بر حسب میلی‌متر) ایجاد شده توسط اسانس زیره تحت تأثیر تیمارهای مختلف

باکتری‌ها	A_1	A_2	A_3	B_1	B_2	Control	GEM	CB	TET	ERY
سودوموناس ائروژینوزا	١٣	١٢	١١	٩	٩	١٢	١٢	١٤	nt	nt
اشرشیا کلی	١٥	١٢/٥	١٣	١٤	١٣/٥	١٣	١٢	٢٥	nt	nt
کلبسیلا پنومونیه	١٥	١٥	١٥	١٥	١٠	١٥	٢١	١٥	nt	nt
یرسینیا انتروکولیتیکا	١٧	٢١	١٩	١١	١٤	> ٢٠	١٢	١٥	nt	nt
باسیلوس سوبتیلیس	> ٣٠	> ٣٠	> ٣٠	> ٣٠	>٣٠	> ٣٠	nt	nt	٢٣	٢٣
باسیلوس سرئوس	> ٣٠	> ٣٠	> ٣٠	> ٣٠	>٣٠	> ٣٠	nt	nt	٣٠	٢٥
استافیلوکوکوس ارئوس	> ٣٠	> ٣٠	> ٣٠	> ٣٠	>٣٠	> ٣٠	nt	nt	٢٢	٢٠
میکرکوکوس لوتئوس	> ٣٠	> ٣٠	> ٣٠	> ٣٠	>٣٠	> ٣٠	nt	nt	١٠	٣٠

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

مظفریان، و . ۱۳۸۳، رده‌بندی گیاهی (۲ جلد)، انتشارات امیرکبیر.

Agaogolu S., Dostbil N. and Almedar .S . 2007. Antimicrobial activity of some spices used in meat industry *Bull Vet Inst Pulawy , 51, 53-57*

Bown D. 1995. Encyclopaedia of Herbs and their Uses. Dorling Kindersley, London.

De M, De A.K, Mukhopadhyay R, Banerjee A.B. and Miro M. 2003. Antimicrobial Activity of Cuminum cyminum L. Ars Pharmaceutica, 44:3; 257-269

Dragland, S. and Aslaksen, T. H. 1997. Effect of fertilization on yield and quality of the essential oil of peppermint (*Mentha½piperita*L.). Norwegian Crop Research Institute, Report No. 20.

Fahlen A., Welander M. And Wennersten R. 1997. Effects of light–temperature regimes on plant growth and essential oil yield of selected aromatic plants. J. Sci. Food Agric. 73, 111–119.

Iacobellis N., Cantore P., Capasoo f. and Senatore F. 2005. Antibacterial activity of Cuminum cyminum L. and Carum carvi L. Essential Oils . Journal of Agricultural and food chemistry. 53:57-61

Karaman L., Sahin F., Gulluce M., Ogutcu B., Sengul F. and Adigguzel A. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. Journal of Ethnopharmocology . 85: 231-235

Leite A., Lima E., Souza E., Diniz M., Trajano V. and Mederios A. 2007. Inhibitory effect of β-pinene, α-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causingGram –positive bacteria. Brazillian Journal of pharmaceutical . 41(1): 121-125

www.SID.ir

Archive of SID

Marotti M., Piccaglia R., Giovanelli E., Deans S.G. and Eaglesham, E. 1994. Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha½piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. Flav. Fragr. J. 9, 125–129.

Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G.J.P. and Begin A. 1997 Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. Int J Food Microbiol, 37, 155-162.

Parekh J., D. Jadeja and Chanda S. 2005. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *Turk. J. Biol*., 29: 203-210.

Serrentino J. 1991. How Natural Remedies Work. Point Robert, W.A.: Harley and Marks Publishers pp: 222.

Pruthi J.S. 1976 . Spices and condiments. National Book Trust, Delhi,.

Shelef L.A., Naglik O.A. and Bogen D.W. 1980. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary and all spice. J Food Sci, 45, 1042-1044.

Shu C. K. and Lawrence B. M. 1997. Reasons for the variation in composition of some commercial essential oils. In: Risch, S. J. & Ho, C. T. (eds) Spices – Flavor Chemistry and Antioxidant Properties. ACS Symposium Series 660, 254 pp.

United States Pharmacopoeia Convention. 1999. Biological tests and assays.: Antibiotics- microbial assays. In United States Pharmacopoeia XXIV . National Publishing : Philadelphia PA., 1823

Ünlütürk A. 1998 . The principles of food preservation. In: *Food Microbiology*, Mengi Tan Publishing House, İzmir, Turkey . p. 605.

Voirin, B., Brun, N. & Bayet, C. 1990. Effects of daylength on the monoterpene composition of leaves of *Menthapiperita*. Phytochemistry
29, 749.

www.SID.ir