نشریه علمی

تحقیقات در علوم مهندسی سطح و نانو مواد

سال ۱، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱ ٤٦

کاربرد نانو امولسیون اسانس زیره (*Cuminum cyminum*) به منظور کنترل باکتری‌های بیماری‌زای و انگل‌ها در کاهو (*Lactuca sativa*)

فاطمه بختیاری[۱]، مهرنوش تدینی*[۱]، فرید جمالی شینی[۲]

[۱] گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

[۲] مرکز تحقیقات مهندسی سطح پیشرفته و نانو مواد، گروه فیزیک، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

چکیده

با توجه به اهمیت سبزیجات خوراکی در تغذیه روزانه، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی تاثیر نانو امولسیون اسانس زیره (Cuminum cyminum) به منظور کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و انگل‌ها در کاهو (Lactuca sativa) انجام شد. شمارش کلی باکتری‌های کاهو تحت تاثیر نانوامولسیون زیره کاهش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار آب نشان داد. کمترین بار میکروبی در تیمار ۰/۱ درصد زیره و بالاترین بار میکروبی در تیمار آب اندازه‌گیری شد. نانوامولسیون زیره بر روی دو باکتری ویبریو کلرا (گرم منفی) و لیستریا مونوسیتوژنز (گرم مثبت) در مقایسه با دو باکتری سالمونلا تیفی موریم (گرم منفی) و اشرشیا کلی (گرم منفی) اثر ضدباکتریایی بیشتری نشان داد. در بررسی تعداد و نوع انگل‌های جداسازی شده در مرتبه‌های مختلف شستشو، لارو نماتود، کیست ژیاردیا، تخم آسکاریس، کیست آنتامباکولی، تخم تنیا جداسازی شد که بیشترین تعداد انگل جدا شده در تیمار زیره ۱ و ۲ درصد بود.

واژه‌های کلیدی: *نانو امولسیون؛ اسانس گیاهی؛ اثرات ضد باکتری؛ آلودگی سبزی‌ها.*

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰٤/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۵/۳۰

Application of cumin essential oil nanoemulsion (*Cuminum cyminum*) to control pathogenic bacteria of lettuce (*Lactuca sativa*)

Fatemeh Bakhtiari [1], Mehrnoosh Tadayoni * [1], Farid Jamali sheini [2]

[1] Department of Food Science and Industry, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

[2] Advanced Surface Engineering and Nano Materials Research Center, Department of Physics, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

Abstract

Considering the importance of edible vegetables in daily nutrition, the present study was conducted with the aim of investigating the effect and application of cumin essential oil nanoemulsion (Cuminum cyminum) in order to control pathogenic bacteria and parasites in lettuce (Lactuca sativa). The total bacterial count of lettuce under the effect of cumin nanoemulsion showed a significant decrease compared to water treatment, so the lowest microbial load was measured in 0.1% cumin treatment and the highest microbial load was measured in water treatment. Cumin nanoemulsion had more antibacterial effect on Vibrio cholerae (gram negative) and Listeria monocytogenes (gram positive) compared to salmonella typhimurium (gram negative) and Escherichia coli (gram negative).. In the investigation of the number and types of parasites isolated in different washing stages, nematode larvae, cysts of Giardia, Ascaris eggs, entambacoli cysts, and taenia eggs were isolated.

Keywords: *nanoemulsion; plant essential oil; antibacterial effects; vegetable contamination.*

Received: 19/07/2022
Accepted: 21/08/2022

* نویسنده مسئول: مهرنوش تدینی

آدرس: اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، دانشکده کشاورزی

پست الکترونیکی: m.t.tadayoni@gmail.com , mtadayoni@iauahvaz.ac.ir

۱. مقدمه

اسانس گیاهان، دارای خواص مفید و گوناگون زیادی هستند و از این رو استفاده گسترده‌ای در صنایع مختلف ازجمله صنایع غذایی دارند. اسانس گیاهان ماهیت روغنی دارد؛ بنابراین برای استفاده از آن در فرمولاسیون مواد غذایی نیاز به تهیه امولسیون از آن‌ها است. تحقیقات نشان داده است که گیاهان معطر متعلق به خانواده‌ی نعناعیان و چتریان غنی از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان آن‌ها هستند [۱،۲]. این گیاهان معطر ضمن سمیت بسیار پایین برای پستانداران و مقبولیت بالا نزد اغلب مردم [۳]، اثرات جانبی کمتری نسبت به مواد شیمیایی داشته و کیفیت سبزی‌ها و طول دوره‌ی نگهداری آن‌ها را افزایش می‌دهند [٤،٥]. اصلی این ترکیبات با خاصیت ضد قارچی، شامل ترپن‌ها[1]، تانن‌ها[2]، فلانوئیدها[3]، اسانس‌ها، آلکالوئیدها[4]، لکتین‌ها[5] و پلی پپتیدها[6] می‌باشند [٦]. در بین این ترکیبات از اسانس‌ها به دلیل تاثیر گذاری در فاز بخار، بیشتر از سایر ترکیبات ضد میکروبی استفاده می‌شود به طوری که امکان کنترل بیماری‌های پس از برداشت محصولات کشاورزی و غذایی را به‌صورت تدخینی نیز فراهم می‌کند [۷]. خاصیت ضد قارچی اسانس‌ها نیز به برخی از ترکیبات آن‌ها کاروآکرول، منتول، سیمن، تیمول، سینام آلدهید، اوژنول، پینن و لینالول مرتبط است که به عنوان ترکیبات با تاثیر بالای ضد قارچی شناخته می‌شوند [۸]. مصرف اسانس‌ها به‌طورکلی به دلیل حلالیت پایین در آب، فشار بخار بالا و ناپایداری فیزیکی و شیمیایی با دشواری‌هایی در کاربرد همراه است. علاوه بر این، اسانس‌ها در محصولات ایجاد بو و مزه می‌کنند که این امر خوشایند مصرف‌کنندگان نمی‌باشد بنابراین امروزه تلاش می‌شود تا اثرات نا مطلوب اسانس‌ها کاسته شود. یکی از روش‌های به حداقل رساندن این اثرات نامطلوب، استفاده از نانو امولسیون آن‌هاست که سبب افزایش پایداری ترکیبات فرار، محافظت آن‌ها در برابر اثرات متقابل با سایر ترکیبات و افزایش خواص ضد میکروبی از طریق افزایش جذب سلولی می‌شود [۹]. نانو امولسیون اسانس‌ها ازنظر خصوصیات ساختاری و فیزیکی با امولسیون آن‌ها تفاوت دارند. استفاده از کمک حلال‌ها در تهیه‌ی نانو ذرات اسانس-ها، منجر به تولید فرمولاسیونی با ویسکوزیته و پایداری مناسب می‌شود. علاوه بر این، کوچک بودن اندازه‌ی ذرات نیز برای افزایش پایداری و نیمه‌عمر ماده مؤثره و سهولت رسیدن به موضع اثر بسیار موردتوجه می‌باشد [۱۰]. با توجه به خواص منحصربه‌فرد نانو امولسیون‌ها، ساختار نانو امولسیونی یکی از امیدبخش‌ترین ساختارها برای بهبود حلالیت و افزایش ارزش زیستی و عملکردی ترکیبات آب‌گریز[7] است. به همین دلیل، متخصصان صنایع غذایی در سال‌های اخیر در پی استفاده از این ساختارها برای یکپارچه کردن ترکیبات فراسودمند آب‌گریز (چربی‌دوست) در شبکه‌های غذایی بوده‌اند. البته، لازم به یادآوری است که به‌رغم مزایا و خواص منحصربه‌فرد نانو امولسیون‌ها، کاربرد آن‌ها در سامانه‌های غذایی هنوز با چالش‌هایی ازجمله فرایند تولید، به‌ویژه هزینه، توصیف نانو امولسیون‌های حاصل و نیز پذیرش و سلامت سامانه‌های غذایی‌ای که نانو امولسیون‌ها در آن‌ها به کار می‌روند روبه‌رو است [۱۱]. ازاین‌رو، انجام پژوهش‌هایی درزمینه‌ی بهینه‌سازی روش‌های تولید، ویژگی، پایدارسازی و امکان کاربرد سامانه‌های نانو امولسیونی در صنایع غذایی یک نیاز ضروری تلقی می‌گردد. امولسیون سامانه‌ای ناهمگن و متشکل از دو مایع غیرقابل امتزاج است که یکی از آن‌ها در دیگری به‌صورت قطره‌هایی پراکنده‌شده است. امولسیون‌هایی با اندازه قطرات در حدود نانومتری و به‌طورمعمول در محدوده ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر را نانو امولسیون می‌نامند [۱۲]. نانو امولسیون‌ها سامانه‌های غیرتعادلی هستند که به‌صورت خودبه‌خودی تشکیل نمی‌شوند و اعمال انرژی برای تولید آن‌ها موردنیاز است. به واسطه ویژگی اندازه، نانو امولسیون‌ها با چشم غیرمسلح به‌صورت شفاف یا نیمه شفاف قابل مشاهده‌اند و پایداری بالایی دارند. ساختار و

[1] Terpenes
[2] Tannen
[3] Flavonoids
[4] Alkaloid
[5] Lectin
[6] Polypeptide
[7] Hydrophobic

ویژگی‌های منحصر به فرد نانو امولسیون‌ها در مقایسه با امولسیون‌های معمولی مزیت‌هایی را برای کاربرد آن‌ها در بسیاری از صنایع، از جمله صنایع غذایی، ایجاد کرده است. از کاربردهای سامانه‌های نانو امولسیونی در صنایع غذایی می‌توان به نقش آن‌ها در ریز پوشینه‌دار کردن (انکپسوله کردن) و کنترل رهایش ترکیبات فراسودمند مانند انواع اسانس‌ها، رنگ‌ها، ویتامین‌ها و غیره اشاره کرد [۱۳]. نیرمالا[1] و همکاران (۲۰۲۰) اثرات نانوامولسیون اولتراسونیک عصاره زیره سبز[2] بر روی باکتری‌ها را بررسی کردند [۱۱]. نصیری و همکاران (۲۰۲۰) تولید و فعالیت زیست فعال نانوامولسیون اسانس‌های رزماری[3] و دارچین[4] را بر روی فعالیت باکتریای‌ها [۱۲] و سیاپیتری[5] و همکاران (۲۰۲۲) ساختار نانوامولسیون اسانس نارگیل را بررسی کردند [۱۳]. در پژوهش حاضر سعی شده ضمن توصیف نانو امولسیون‌ها، مروری اجمالی بر روش‌های تولید، مزایا و برخی از کاربردهای نانو امولسیون‌ها در صنایع غذایی، تاثیر نانو امولسیون‌های گیاه دارویی زیره بر کنترل باکتری‌های بیماری‌زا در کاهو نیز بررسی گردد تا در صورت حصول نتایج مطلوب از آن‌ها به عنوان جایگزین‌های شوینده‌های شیمیایی در سبزی‌ها استفاده گردد.

۲. مواد و روش‌ها

۲. ۱. مشخصات منطقه‌ی نمونه برداری

اهواز یکی از کلان شهرهای ایران است که در بخش مرکزی شهرستان اهواز قرار دارد و به‌عنوان مرکز استان خوزستان شناخته می‌شود. جمعیّت این شهر طبق آمار رسمی سال ۱۳۹۰ برابر ۱٬۱۱۲٬۰۲۱ نفر می‌باشد که به عنوان هفتمین شهر پرجمعیت ایران به شمار می‌آید. اهواز در موقعیت جغرافیایی ۳۱ درجه و ۲۰ دقیقه عرض شمالی و ۴۸ درجه و ۴۰ دقیقه طول شرقی، در بخش جلگه‌ای خوزستان و با ارتفاع ۱۲ متر از سطح دریا واقع‌شده است.

۲. ۲. روش نمونه‌برداری

نمونه کاهو به‌طور تصادفی طی پنج نوبت از بازار میوه و تره بار اهواز تهیه و در یک نایلون استریل قرار داده شد و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردیدند، کلیه آزمایش‌ها در آزمایشگاه بر روی نمونه‌ها انجام گردید.

۲. ۳. روش آماده‌سازی و تجزیه‌ی نمونه‌ها

ابتدا عصاره گیاه زیره به صورت آماده خریداری شد و جهت تهیه نانو امولسیون اسانس زیره هرکدام از گیاهان با چند قطره توین ۸۰ به نسبت ۱:۲ توزین و توسط همزن مغناطیسی به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد. سپس توسط دستگاه اولتراسوند نانو امولسیون تولید شد. سپس کاهوهای شستشه شده با نانوامولسیون اسانس زیره، طبق دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت، سانتریفوژ شدند. هم‌چنین در هر مرتبه نمونه‌گیری، از آب شهری (بدون هیچ‌گونه شوینده) نیز جهت شستشوی سبزی‌ها استفاده گردید. کاهو در دمای ٤ درجه در یخچال نگهداری شد.

۲. ٤. ارزیابی میکروب‌های تلقیح شده

در شرایط استریل g ۲۵ از هر نمونه وزن و به مخلوط کن استریل منتقل گردید و ۲۲۵ میلی‌لیتر بافر پپتون واتر به آن اضافه و ۲ دقیقه مخلوط و رقت‌های ده‌تایی تا 10^{-6} تهیه و برای آزمایشات میکروبی استفاده گردید. آزمایشات میکروبی بر طبق روش استاندارد HPA [۱٤،۱۵] انجام شد. اشرشیا کلی بر روی محیط کشت کروم آگار *اشرشیا کلی* کشت و در دمای ۳۰ °C به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد. سپس کلنی‌های سبز-آبی بر روی محیط کشت SMAC Agar کشت و در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد. تست تکمیلی آگلوتیناسیون بود. برای باکتری *سالمونلا تیفیموریوم*[6]، نمونه هموژنیزه شده به مدت ۲٤-۱٦ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار داده شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از این محیط در دو محیط راپاپورت واسیلیادیس[7] و تتراتیونات براث[8] حاوی محلول بد و آنتی‌بیوتیک نوبیوسین منتقل و در دمای ٤۱/۵ °C به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور قرار داده شداز محیط افتراقی

[1] Nirmala
[2] C. cyminum
[3] Salvia rosmarinus
[4] Cinnamomum verum
[5] Syapitri
[6] Salmonella typhimurium
[7] Rappaport-Vassiliadis
[8] Tetrathionate broth

برلیانت گرین بابل براث، XLD و بیسموت سولفیت آیرون آگار به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار داده شد. تائید نهایی بر روی محیط‌های لیزین دکربوکسیلاز آگار، تریپل شوگر آیرون آگار و آوره براث کشت داده شد. باکتری‌های کل بر روی محیط کشت PCA آگار کشت داده شده و در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت و جهت شمارش پرگنه‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* از محیط انتخابی لیستریا پالگام آگار و به روش کشت سطحی در دمای ۳۷ °C و به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. باکتری *ویبریو کلرا* بر روی محیط کشت TCBS (تیوسولفات-سیترات-نمک صفراوی-ساکارز) کشت و محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ °C انکوبه شد. از روش شناور سازی برای تعیین بار انگلی گاهو استفاده شد. به این منظور در آزمایشگاه نمونه-های کاهو در ظروف بیکر که تا نیمه از آب پر شده بود منتقل و ۵ قطره از محلول‌های اسانس زیره ۰/۱، ۱، ۲ درصد به آن اضافه و هم زده شد و پس از ۱۵ دقیقه تماس با سبزی‌های مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. علاوه بر نانوامولسیون زیره از محلول ضدعفونی‌کننده تجاری با ماده موثر بنزالکونیوم کلراید با غلظت ۱۰ درصد و آب نیز استفاده شد. سپس نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در سکون قرار گرفتند. پس از خارج کردن کاهوها از ظرف، آب شستشو جمع‌آوری و از پارچه تنظیف عبور داده شد و به مدت ۲ ساعت در حالت سکون قرار گرفت تا رسوبات ته‌نشین شوند. مایع انتهایی به لوله سانتریفیوژ منتقل و با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب باقی مانده در زیر میکروسکوپ جهت بررسی کیست، تخم و نیز انگل‌های احتمالی بررسی شد. شناسایی براساس کلیدهای کوک[1] و همکاران [۱۶] و روبرتسون[2] و جردو[3] [۱۷] انجام شد.

۲. ۵. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش نمونه‌برداری‌ها به‌صورت کاملا تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل تمام داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای *SPSS23* و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی دانکن برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار *Excel 2013* رسم گردید.

۳. نتایج

۳ .۱. شمارش کلی باکتری‌های کاهو تحت تاثیر نانوامولسیون اسانس زیره

تغییرات بار میکروبی در کاهو تحت تاثیر نانوامولسیون اسانس زیره (جدول ۱)، روند افزایشی را در هر سه تیمار ۰/۱ و ۰/۰۵ درصد نانوامولسیون اسانس زیره و تیمار آب نشان داد. در تیمار ۰/۱ درصد نانوامولسیون اسانس زیره این شاخص بین زمان‌های ۳، ۶ و ۹ اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). تیمار ۰/۰۵ درصد نانوامولسیون اسانس زیره بین تمام ساعات اختلاف معنی‌داری نداشت اما در سایر زمان-های اختلاف معنی‌دار بود(P< ۰/۰۵). میزان شمارش کلی باکتری‌ها در تیمار آب بین ۴ ساعت ۰، ۳، ۶ و ۹ اختلاف معنی‌دار داشت و بالاترین تعداد باکتری در مقایسه با دو تیمار دارای نانوامولسیون اسانس در این تیمار اندازه‌گیری شد. ساعت ۷۲ در تمام تیمارها، بالاترین تعداد باکتری شمارش شد.

۳ .۲. شمارش باکتری ویبریو کلرا کاهو تحت تأثیر نانوامولسیون اسانس زیره

شمارش باکتری ویبریوکلرا کاهو تحت تاثیر نانوامولسیون اسانس زیره در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان ویبریو کلرا در ساعت‌های ۳ و ۲۴ بین دو تیمار ۰/۱ و ۰/۰۵ درصد نانوامولسیون اسانس زیره اختلاف معنی‌داری نداشت اما هر دو تیمار با شمارش این باکتری در تیمار آب دارای اختلاف معنی‌دار بودند (P< ۰/۰۵). در ساعت ۷۲ تیمار آب بالاترین شمارش باکتری ویبریو کلرا را در کاهو گزارش داشت. روند کاهشی میزان ویبریو کلرا در کاهو با افزایش زمان ماندگاری در تمام تیمارها قابل مشاهده بود و کمترین شمار ویبریو کلرا در کاهو در تمام تیمارها در ساعت ۷۲ شمارش شد.

[1] Cook
[2] Robertson
[3] Gjerdo

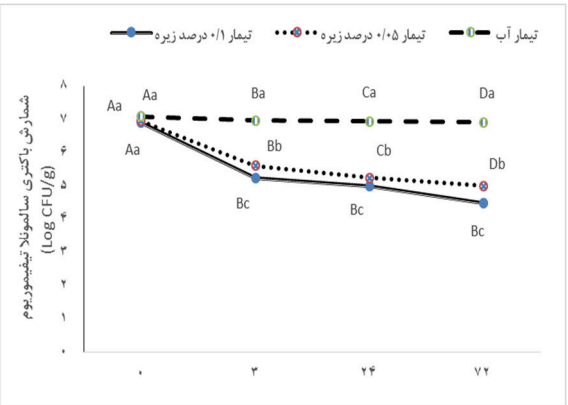
۳. ۳. شمارش باکتری سالمونلا تیفیموریوم کاهو تحت تاثیر نانوامولسیون اسانس زیره

شمارش باکتری *سالمونلاتیفیموریوم* کاهو تحت تاثیر نانوامولسیون اسانس زیره روند کاهشی را در هر سه تیمار ۰/۱، ۰/۰۵ و آب نشان داد که در تیمارهای ۰/۱ و ۰/۰۵ درصد زیره بین ساعت‌های ۳، ۲٤ و ۷۲ معنی‌دار بود اما در تیمار آب شمار باکتری‌های *سالمونلاتیفیموریوم* بین ساعت‌های ۳، ۲٤ و ۷۲ اختلاف معنی‌داری نداشت(P<۰/۰۵). همچنین مقایسه این باکتری بین تیمارهای مختلف نشان داد، کاهوی تیمار آب، در ساعت‌های ۳، ۲٤ و ۷۲ با اختلاف معنی‌دار در مقایسه با دو تیمار ۰/۱ و ۰/۰۵ زیره شمار بالاتری از این باکتری را داشت(P<۰/۰۵) (شکل ۱).

جدول ۱- شمارش باکتری‌های کاهو تحت تاثیر نانوامولسیون اسانس زیره (Log CFU/g)

ساعت / تیمار	۰	۳	٦	۹
	باکتری‌های کل			
تیمار ۰/۱ درصد زیره	۳/۲٤±۰/۰٦ Aa	۳/۹۷±۰/۲۰ Ba	٤/۲۲±۰/۱۱ Ba	٤/۲٤±۰/٤۳ Ba
تیمار ۰/۰۵ درصد زیره	۳/٤٥±۰/۲٤ Aa	٤/۱۹±۰/۲٤ Ba	٤/۹٤± ۰/۰۸ Cb	٥/۹٦± ۰/۱۸ Db
تیمار آب	۳/٦±۰/۳۰ Aa	٤/٦٦±۰/۱۲ Bb	٥/۲۸±۰/۱۸ Cc	٦/٤۳±۰/۱۳ Dc
باکتری ویبریو کلر				
تیمار ۰/۱ درصد زیره	٦/۹۹±۰/۱۷ Aab	٤/۱۷±۰/۲٥ Ba	۳/٥٤±۰/۱٥ Ca	۳/٤۲±۰/۱۸ Ca
تیمار ۰/۰۵ درصد زیره	٦/۸۲±۰/۱۰ Ab	٤/۳۲±۰/۲٥ Ba	۳/٥٦±۰/۲۷ Ca	۳/۷۸±۰/۱۲ Cb
تیمار آب	۷/۰۸±۰/۰٦ Aa	٦/۹۱±۰/۰٦ Bb	٦/۸۲±۰/۰۸ BCb	٦/۷۰±۰/۰٦ Cc

* حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین ساعت‌ها در سطح ۰/۰۵ است (P< ۰/۰۵).

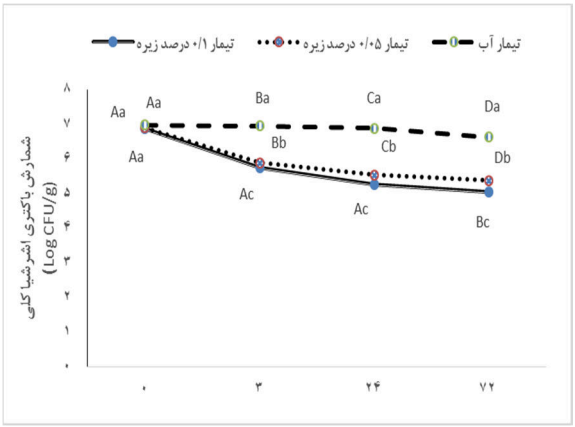


شکل ۱- شمارش باکتری سالمونلا تیفیموریوم کاهو تحت تاثیر نانوامولسیون اسانس زیره (Log CFU/g)

* حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین ساعت‌ها در سطح ۰/۰۵ است (P< ۰/۰۵).

۳ .٤. شمارش باکتری اشرشیا کلی کاهو تحت تاثیر نانوامولسیون اسانس زیره

روند کاهشی بار باکتری *اشرشیا کلی* کاهو با افزایش زمان ماندگاری در تیمارهای ۰/۱، ۰/۰۵ درصد زیره و تیمار آب در شکل ۲، قابل نشان داده شده است. کمترین شمار باکتری *اشرشیا کلی* کاهو در ساعت ۷۲ اندازه‌گیری شد. همچنین نتایج نشان داد بار باکتریایی کاهو در تیمار آب در مقایسه با دو تیمار دیگر با اختلاف معنی‌دار در تمام ساعت‌ها به جز صفر، بالاتر بود.

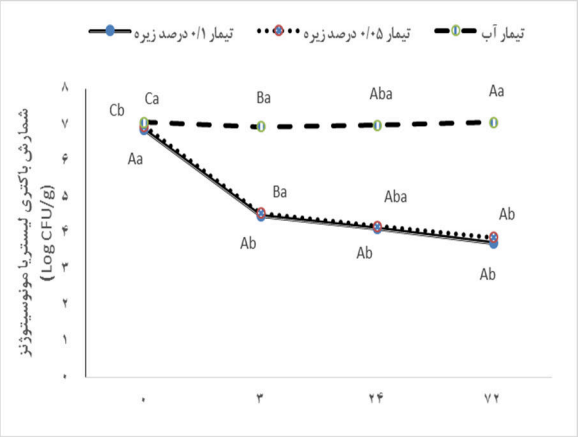


شکل ۲ - شمارش باکتری *اشرشیا کلی* کاهو تحت تاثیر نانوامولسیون اسانس زیره (Log CFU/g)

* حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین ساعت‌ها در سطح ۰/۰۵ است (P< ۰/۰۵).

۳. ۵. شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز کاهو تحت تاثیر نانواملسیون اسانس زیره

شمار باکتری لیستریا مونوسیتوژنز کاهو با افزایش زمان ماندگاری در تیمار ۰/۱ و ۰/۵درصد ریزه روند کاهشی را نشان داد(P< ۰/۰۵). تیمار آب در تمام زمان‌های مورد بررسی بالاترین سطح باکتری را نشان داد. در ساعت ۷۲، بار باکتری در تیمار ۰/۱ درصد زیره با اختلاف معنی‌دار در مقایسه با تیمار ۰/۰۵ درصد زیره و آب کمترین مقدار بار بارکتری را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳- شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز کاهو تحت تاثیر نانواملسیون اسانس زیره (Log CFU/g)

* حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین ساعت‌ها در سطح ۰/۰۵ است (P< ۰/۰۵).

۳. ٦. تعداد و نوع انگل‌های جداسازی شده در مرتبه‌های نمونه‌گیری

کارایی نانواملسیون اسانس‌های تیمارهای مختلف در حذف انگل‌های کاهو در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج این جدول، تیمار ۱ درصد زیره و ۲ درصد زیره در مقایسه با تیمار ۰/۱ درصد زیره، بالاترین کارایی را در حذف انگل‌ها داشتند که علت آن را می‌توان به مقاومت بالاتر انگل‌ها در مقایسه با باکتری در برابر نانواملسیون دانست.

٤. بحث

شمارش کلی باکتری‌های کاهو تحت تاثیر نانواملسیون زیره کاهش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار آب نشان داد به شکلی که کمترین بار میکروبی در تیمار ۰/۱ درصد زیره و بالاترین بار میکروبی در تیمار آب اندازه‌گیری شد. به این معنی که با افزایش سطح نانواملسیون، بار میکروبی کاهو به شکل معنی‌داری کاهش یافت(P< ۰/۰۵). بهارگاوا[1] و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی استفاده از نانواملسیون نارنج بر روی باکتری‌های *Listeria monocytogenes Salmonella typhimurium and Escherichia coli* عنوان کردند که سطوح ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد اسانس نارنج به شکل نانواملسیون توانست بار میکروبی باکتری‌های نامبرده را کاهش دهد [۱۸] که با یافته‌های تحقیق حاضر همخوانی دارد. زارع بیدکی و همکاران (۱۳۹۳) در بررسی اثر اسانس نعناع بر روی باکترهای اشرشیا کلی و سالمونلا، قدرت باکتری کشی بالای این اسانس را بر روی این دو باکتری گزارش کردند [۱۹]، همچنین نقدهی و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی تاثیر اسانس نعناع در شرایط آزمایشگاهی، عنوان کردند که اسانس نعناع مانع از رشد کامل این دو باکتری شد که با خاصیت ضدباکتریای مشاهده شده در اثر استفاده از نانواملسیون نعناع [۲۰] در مطالعه حاضر همخوانی دارد. خاصیت ضدمیکروبی اسانس‌های تحت تاثیر ترکیبات شیمیایی آن‌ها قرار دارد. این ترکیبات شامل کارواکرول، تیمول، سایمن و منتول و نیز گروه هیدروکسیل، مشتقات اکسیژن دار نظیر الکل‌ها، آلدهیدها، استرها، کتون‌ها و فنول‌ها هستند که از اجزای اصلی اسانس‌های گیاهی در مقابله با باکتری‌ها هستند[۲۱].

زیره در بردارنده کومین آلدئید، گاما- ترپینن، پارا-سیمن، بتا- پینن، آلفا- پینن، میرسن و لیمونن است[۲۲]. همچنین یاکوبلیس[2] و همکاران (۲۰۰۵) حضور کومین آلدئید، آلفا پینن و سابینن را عامل خواص ضدباکتریایی اسانس زیره دانستند [۲۳] که خواص ضدباکتریایی بدست آمده در مطالعه حاضر را تایید می‌کند.

[1] Bhargava

[2] Iacobellis

جدول ۲ - تعداد و نوع انگل‌های جداسازی شده در مرتبه‌های نمونه‌گیری

مرتبه نمونه-	شوینده	تعداد کل انگل جداسازی شده	نوع و تعداد انگل جداسازی شده
مرتبه اول	زیره ۰/۱ درصد	۱۰	۷ لارو نماتود زنده، ۱ لارو نماتود مرده، ۱ کیست زیاردیا، ۱ تخم آسکاریس
	زیره ۱درصد	۱۳	٦ لارو نماتود زنده، ۳ لارو نماتود مرده، ۲ کیست زیاردیا، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۱ تخم آسکاریس
	زیره ۲ درصد	۱۵	۷ لارو نماتود زنده، ۲ لارو نماتود مرده، ٤ تخم آسکاریس، ۲ تخم تنیا
	کلرید بنزالکونیوم ۱۰ درصد	۱۲	٦ لارو نماتود زنده، ۳ لارو نماتود مرده، ۲ تخم آسکاریس،۱ تخم تنیا
	آب	۱۲	۹ لارو نماتود زنده، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۲ تخم تنیا
مرتبه دوم	زیره ۰/۱ درصد	۱۳	٤ لارو نماتود زنده، ۲ لارو نماتود مرده، ۳ کیست زیاردیا، ۲ تخم آسکاریس، ۲ تخم تنیا
	زیره ۱درصد	۱۷	۸ لارو نماتود زنده، ۵ لارو نماتود مرده، ۳ کیست زیاردیا، ۱ کیست آنتامبا کولی
	زیره ۲ درصد	۱۹	۱۱ لارو نماتود مرده، ۳ کیست زیاردیا، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۲ تخم آسکاریس، ۲ تخم تنیا
	کلرید بنزالکونیوم ۱۰ درصد	۱۵	۷ لارو نماتود زنده، ۳ لارو نماتود مرده، ۲ کیست زیاردیا، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۱ تخم آسکاریس، ۱ تخم تنیا
	آب	۱٤	۱۰ لارو نماتود مرده، ۲ کیست زیاردیا، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۱ تخم آسکاریس
مرتبه سوم	زیره ۰/۱ درصد	۱۱	۵ لارو نماتود زنده، ۳ لارو نماتود مرده، ۳ کیست زیاردیا
	زیره ۱درصد	۱۵	۹ لارو نماتود زنده، ۳ لارو نماتود مرده، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۲ تخم تنیا
	زیره ۲ درصد	۱٦	٦ لارو نماتود زنده، ٤ لارو نماتود مرده، ۳ کیست زیاردیا، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۲ تخم آسکاریس
	کلرید بنزالکونیوم ۱۰ درصد	۱۳	۸ لارو نماتود زنده، ۳ لارو نماتود مرده، ۲ تخم آسکاریس، ۲ تخم تنیا
	آب	۱۳	۵ لارو نماتود مرده، ۳ کیست زیاردیا، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۲ تخم آسکاریس، ۲ تخم تنیا
مرتبه چهارم	زیره ۰/۱ درصد	۸	۳ لارو نماتود زنده، ۱ لارو نماتود مرده، ۳ کیست زیاردیا، ۱ تخم تنیا
	زیره ۱درصد	۱۱	٦ لارو نماتود زنده، ۲ لارو نماتود مرده، ۳ کیست زیاردیا
	زیره ۲ درصد	۱۲	۷ لارو نماتود زنده، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۲ تخم آسکاریس، ۲ تخم تنیا
	کلرید بنزالکونیوم ۱۰ درصد	۱۰	٤ لارو نماتود زنده، ۲ لارو نماتود مرده، ۲ تخم آسکاریس، ۲ تخم تنیا
	آب	۱۰	۵ لارو نماتود زنده، ۱ لارو نماتود مرده،۲ کیست زیاردیا، ۲ تخم تنیا
مرتبه پنجم	زیره ۰/۱ درصد	۹	٤ لارو نماتود مرده، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۲ تخم آسکاریس، ۲ تخم تنیا
	زیره ۱درصد	۱۱	۳ لارو نماتود زنده، ۵ لارو نماتود مرده، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۲ تخم آسکاریس
	زیره ۲ درصد	۱۲	٤ لارو نماتود زنده، ۲ لارو نماتود مرده، ۳ کیست زیاردیا، ۱ کیست آنتامبا کولی، ۲ تخم تنیا
	کلرید بنزالکونیوم ۱۰ درصد	۱۰	٦ لارو نماتود زنده، ۲ تخم آسکاریس، ۲ تخم تنیا
	آب	۱۰	۵ لارو نماتود زنده، ۳ لارو نماتود مرده،۱ کیست آنتامبا کولی، ۱ تخم تنیا

همچنین در مطالعه خسروی‌نیا و همکاران (۱۳۹۲) که اثرات ضدباکتریایی اسانس و عصاره زیره را در مقابل باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* مثبت اعلام کرد، وجود ترکیبات ترپن‌دار و کومین‌آلدئید را به عنوان عامل اصلی فعالیت ضدباکتریایی اسانس زیره معرفی کرد [۲٤]. ممتاز و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای بر روی فعالیت ضدباکتریایی زیره بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی و شیگلا دیسانتری انجام داند، عنوان کردند که اسانس زیره به دلیل داشتن کومین آلدئید، آلفا پینن و سابینن، دارای اثرات میکروبی بر روی باکتری‌های ذکر شده است [۲۵].

در مطالعه حاضر از بین باکتری‌های موجود نانوامولسیون‌های زیره بر روی دو باکتری *ویبریو کلرا* (گرم منفی) و *لیستریا مونوسیتوژنز* (گرم مثبت) در مقایسه با دو باکتری *سالمونلا تیفی موریم* (گرم منفی) و *اشرشیا کلی* (گرم منفی) اثر ضدباکتریایی بیشتری داشتند. باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن غشای فسفولیپیدی خارجی که در برابر ترکیبات چربی دوست غیر قابل نفوذ است، در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بالاتری در برابر اسانس‌ها دارند [۱۱]. در تحقیق حاضر نیز نانوامولسیون زیره بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی موثر بود اما حضور نانوامولسیون سبب افزایش تاثیرات ضدمیکروبی اسانس بر روی باکتری‌های گرم منفی شد که این امر به خصوص در مورد باکتری *ویبریو کلرا* به خوبی موثر بود. همچنین نوع تاثیری که اسانس‌ها و یا نانوامولسیون‌ها بر روی باکتری‌ها می‌گذارند، به خواص دیواره غشا پلاسمایی میکروب نیز وابسته است [۲٦] که این امر از جمله دلایل احتمالی، کارایی بیشتر این نانوامولسیون بر روی *ویبریو کلرا* در مقایسه با *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریم* است.

افزایش تاثیرات ضدباکتریایی نانوامولسیون را می‌توان به وسیله فرمولاسیون پایدار ترکیبات و کاهش واکنش این ترکیبات با مواد آلی به عنوان مثل مقابله با اسانس‌های روغنی آزاد یا مواد روغنی محلول در آب است که ممکن است به آسانی از بافت آزاد شده و کیفیت محصول را کاهش دهند.

همچنین استفاده از نانوامولسیون سطح امولسیون را بالا می‌برد که این امر کارایی اسانس روغنی را بالا می‌برد [۱۸] که این برتری این نانوامولسیون را در مقایسه با آب را به خوبی اثبات می‌کند.

عطایی کچویی (۱۳۹٤) عنوان کردند که از میان باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* بیشترین اثر ضدباکتریایی نعناع فلفلی بر روی *اشرشیاکلی* و بیشترین اثر ضدباکتریایی اسانس زیره سیاه بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* بود، هر چند بر روی سایر باکتری‌ها نیز موثر بود [۲٦] که با یافته‌های مطالعه حاضر مغایریت دارد. تفاوت در روش‌های خشک کردن، استخراج و تهیه عصاره و نوع حلال مورد استفاده، نوع محیط کشت و مواد موجود در آن و غلظت عصاره [۲۷،۲۸] از عوامل موثر بر روی قدرت متفاوت اسانس و فعالیت متفاوت اسانس بر روی باکتری هستند.

متابولیت‌های فنلی با آزاد سازی هیدروژن از گروه هیدروکسیل، رادیکال‌های آزاد چربی را اکسید کرده و سبب تخریب بیومولکول‌های غشای سلولی شده و مرگ باکتری را به دنبال دارد [۲۹]. در واقع اسانس‌ها با داشتن خاصیت آب‌گریزی، در غشای سلول باکتری نفوذ کرده و سبب خارج شدن یون‌ها و محتویات سلولی می شود که این امر عامل مرگ سلول باکتری است [۳۰]. همچنین این ترکیبات موجود در اسانس‌ها با طولانی‌کردن فاز تاخیری رشد باکتری، سرعت رشد باکتری را در فاز لگاریتمی کاهش می‌دهد [۳۱] که این امر کاهش رشد باکتری را در تیمارهای دارای نانوامولسیون‌های نعناع و زیره در مقایسه با تیمار آب نشان می‌دهد. مقایسه بین میزان تاثیر نانوامولسیون بر روی بار باکتریایی، نشان داد که تیمار ۰/۱ نانوامولسیون زیره، تیمار ۰/۵ نانوامولسیون زیره و تیمار آب به ترتیب کمترین و بیشترین بار میکروبی را داشتند، چنین نتیجه‌ای در مورد باکتری *ویبریو کلرا*، *سالمونلا تیفیموریوم*، *اشرشیا کلی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* نیز مشاهده شد. همانطور که بیان شد.

بهارگاوا[1] و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی که بر روی تاثیر نانوامولسیون نارنج بر روی باکتری‌ها انجام دادند عنوان کردند که هم باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی، به خوبی تحت تاثیر نانوامولسیون قرار گرفتند و این ترکیب توانست بار میکروبی را تا ۳ لوگ در مقایسه با روش های معمول کاهش دهد [۱۸]. آنها گزارش کردند که خواص فرمول نانوامولسیون به خوبی کارآمدی بالاتری در مقایسه با تیمارهای بدون نانوامولسیون در مطالعات پیشین دارد.

در بررسی تعداد و نوع انگل‌های جداسازی شده در مرتبه-های مختلف شستشو، لارو نماتود، کیست ژباردیا، تخم آسکاریس، کیست آنتامباکولی، تخم تنیا جداسازی شد. در مطالعه حاضر تیمار تیمار زیره کارایی بالاتری در حذف انگل‌ها از کاهو داشت. در مطالعه عزیزنیا و همکاران (۱۳۹۳) بر روی تاثیر عصاره ریشه کهورک[2] در انگل‌زدایی سبزیجات، تیمار عصاره ریشه کهورک با غلظت ۱ درصد با جداسازی ۷۵ عدد انگل و تخم انگل، در مقایسه با شستشو با شوینده تجاری با ۳۲ عدد انگل و تخم انگل و تیمار شستشو با آب با ۲۹ عدد انگل و تخم انگل، بالاترین کارایی را داشت [۳۲] که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. آنها دلیل این امر را به وجود ترکیباتی نظیر ساپونین در عصاره گیاهی مربوط دانستند که با کاهش کشش سطحی، جداسازی انگل و تخم‌انگل را از بافت آسانتر می‌کند. علاوه بر ساپونین ترکیباتی نظیر تانن، فلاونوئید، فلاوانول نیز چنین عملکردی دارند [۳۳] که اسانس زیره هر دو در بردارنده این گونه مواد هستند.

آنزیم پلی فنل اکسیداز با ایجاد تغییراتی در ترکیبات پروتئینی هیدروکسی پرولین موجود در دیواره سلولی، باعث مقاوم-سازی در برابر عوامل بیمارگر می‌شود[۳٤]. زکئو[3] و همکاران (۱۹۹۵) عنوان کردند که بین افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز گیاه و مقاومت آن به انگل‌ها از جمله نماتد ارتباط مستقیمی وجود دارد [۳۵]. این آنزیم سبب سنتز ترکیبات منهدم‌کننده ساختار بدن نماتد از جمله پراکسیدهیدرژن می‌شود. چنین مکانیسمی، سایر عوامل بیمارگر را نیز محدود می‌کند [۳٦]. همچنین آنزیم‌های نظیر پلی فنل اکسیداز، با لیگنینی شدن دیواره سلول ورود انگل-هایی نظیر نماتد رو به درون سلول کاهش می‌دهد و از این طریق زمینه حذف انگل‌ها را در جریان شستشو افزایش می-دهد [۳۷].

۵. نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد نانوامولسیون اسانس زیره با کاهش شمار کلی باکتری‌ها و نیز باکتری ویبریو کلرا، سالمونلا تیفیموریوم، اشرشیا کلی و لیستریا مونوسیتوژنز و نیز افزایش جدا سازی انگل‌ها در جریان شستشو سلامت کاهو را برای مصرف کنندگان افزایش می‌دهد.

مرجع‌ها

[1] R. Gyawali, S.A. Ibrahim, Natural products as antimicrobial agents, *Food Control* **46** (2014) 412–429.

[2] G. Petretto, F. Fancello, K. Bakhy, C.A. Faiz, Z. Sibawayh, M. Chessa, S. Zara, M.L. Sanna, M. Maldini, J.P. Rourke, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Cuminum cyminum* L. Collected in Different Areas of Morocco, *Food Bioscience* **22** (2018) 50–58.

[3] P.A. Paranagama, K.H.T. Abesekera, K. Abeywickrama, L. Nugliyad, Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemon-grass) against *Aspergillus flavus* Link. Isolated from stored rice, *Letters in Applied Microbiology* **37** (2003) 86-90.

[4] M. Tajkarimi, S. Ibrahim, D. Cliver, Antimicrobial herb and spice compounds in food, *Food Control* **21** (2010) 1199-1218.

[5] M. Hyldgaard, T. Mygind, R.L. Meyer, Essential oils in food preservation: mode of action, ynergies, and interactions with food matrix components, *Frontiers in Microbiology* **3** (2012) 1-12.

[6] S. Javadi, N.M. Kazemi, R. Halabian, Preparation of O/W nano-emulsion containing nettle and fenugreek extract and cumin essential oil for evaluating antidiabetic properties, *AAPS Open* **7** (2021) 1-18.

[7] P. Tripathi, N.K. Dubey, A.K. Shukla, Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24** (2008) 39–46.

[۸] ب. حقیرالسادات، ع. وحیدی، م.ح. صبور، م. عظیم زاده، س م. کلانتر، م. شرف الدینی، بررسی ترکیبات مؤثره و خواص آنتی اکسیدانی اسانس گیاه دارویی زیره سبز (*Cuminum Cyminum* L) بومی استان یزد، *مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد*، ٤ (۱۳۹۰) ٤٨١ -٤٧٢.

[9] R.G. Saratale, H.S. Shin, G. Kumar, G. Benelli, D.S. Kim, G.D. Saratale, Exploiting antidiabetic activity of silver

[1] Bhargava
[2] Prosopis farcta
[3] Zacheo

nanoparticles synthesized using *Punica granatum* leaves and anticancer potential against human liver cancer cells (HepG2), *Artif Cells Nanomedicine and Biotechnology* **46** (2018) 211–222

[10] E. Nuryadi, T.B.M. Permata, S. Komatsu, Inter-assay precision of clonogenic assays for radiosensitivity in cancer cell line A549, Oncotarget **9** (2018) 13706–13712.

[11] M. Nirmala, L. Durai, K. Rao, R. Nagarajan, Ultrasonic Nanoemulsification of *Cuminum cyminum* Essential Oil and Its Applications in Medicine, *International Journal of Nanomedicine* **15** (2020) 795- 807

[12] M. Nasiri, A. Hamed, S. Anousheh, A. Anvar, S. Kakolaki, Nanoemulsion production techniques upgrade bioactivity potential of nanoemulsified essential oils on *Acipenser stellatus* filet preserving, *International Journal of Food Properties* **23** (2020) 2174-2188.

[13] H. Syapitri, S.L. Panduragan, S. Babu, V. Purwandari, C.M. Thaib, Preparation of Black Cumin Extract Nano emulsion Using the Oil Phase of Virgin Coconut Oil (VCO) Tween 80 and PEG 400 Surfactants, *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences* **3** (2022) 1-5

[14] Health Protection Agency (HPA), St*andard Methods for Food Products. Detection of Salmonella Spp*. 2005.

[15] Health Protection Agency (HPA)., 2004, Direct Enumeration of Escherichia coli.National Standard Method Standard F20, Issue 1

[16] N. Cook, C.A. Paton, N. Wilkinson, R.A. Nichols Barker, K. Smith, Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: development and optimization of methods, *International Journal of Food Microbiology* **109** (2006) 215-21.

[17] L.J. Robertson, B. Gjerde, Isolation and enumeration of Giardia cysts, cryptosporidium oocysts, and Ascaris eggs from fruits and vegetables, *Journal of Food Protection* **63** (2000) 775-8.

[18] K. Bhargava, D.S. Conti, S.R.P. Rocha, Y. Zhang, Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce, *Food Microbiology 47* (2015) 69-73.

[۱۹] م. زارع بیدکی، م. عرب، م. خزاعی، ا. افکار، اثر ضدباکتریایی اسانس نعناع سبز (*Mentha spicata L.*) بر هشت گونه باکتری بیماری زای مهم دستگاه گوارش، *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند*، **۳** (۱۳۹۳) ۲۷۴-۲۸۲.

[20] M. Neyriz Nagadehi, S.M. Razavi Rohani, G. Karim, V. Razavilar, A. Zeynali, R. Delshad, The effect of monolaurin in combination with mentha pulegium l. and *Mentha spicata*. Essential oils on bacillus cereus and *E.coli* o157:h7: in vitro study. *Veterinary Journal*, **3** (2010) 657-66.

[21] A. Sivropoulou, E. Papanikolaou, C. Nikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras, M. Arsenakis, Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils.J. Agric, *Food Chemistry* **44** (1996) 1202 - 1205.

[۲۲] م، مقتدر، ع، ایرج منصوری، ح. سالاری، آ. فرهمند، شناسایی ترکیب های شیمیایی و بررسی اثر ضد میکروبی اسانس زیره سیاه (*Bunium persicum* Boiss.)، *فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران* **۲۵** (۱۳۸۸) ۲۸-۲۰.

[23] N.S. Iacobellis, P. Lo Cantore, F. Capasso, F. Senatore, Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and Carum carvi L. essential oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 57-61.

[۲۴] س. خسروی‌نیا، م. زیارت نیا، ع. باقری، ح. مرعشی، مطالعه اثر ضدباکتریایی عصاره سلولی حاصل از کشت درون شیشه ای زیره سیاه (*Bunium persicum*) و مقایسه آن با عصاره حاصل از بذر و اسانس، *نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی*، **۲** (۱۳۹۲) ۹۲-۷۹.

[25] H. Momtaz, F. Safarpoor Dehkordi, E. Rahimi, H. Ezadi, R. Arab, Incidence of Shiga toxin-producing Escherichia coli serogroups in ruminant's meat, *Meat Science* **95** (2013) 381-388.

[۲۶] م. عطایی کچویی، بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس گیاهان نعناع فلفلی، پونه کوهی و زیره سیاه بر برخی باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی، *مجله میکروب شناسی مواد غذایی*، **۱** (۱۳۹۴) ۱۰-۱.

[27] M. Naderi Hagibaghercandi, F. Sefidkon, A. Azizi, Effect of various methods of distillation on quantity and quality of *Lauris nobilis* essential oil, *Journal of Medicinal Plants*, **38**(2012) 78-84.

[28] H. Mahmoodi, K. Rahnama, M. Arabkhani, Evaluation of antibacterial activity of essential oil and hydro extract of herbal plants on Bacteria*, Journal of Medicinal Plants*, **9** (2011) 34-45.

[29] S. Strycharz, K. Shetty, Peroxidase activity and phenolic content in elite clonal lines of *Mentha pulegium* in response to polymeric dye R-478 and *Agrobacterium rhizogenes*, *Process Biochemistry*, **37** (2002) 805- 812.

[30] W.R. Diao, Q.P. Hu, H. Zhang, J.G Xu, Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), *Food Control*, **35** (2014) 109-116.

[31] W.R. Diao, Q.P. Hu, S.S. Feng, W.Q. Li, J.G. Xu, Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from green huajiao (*Zanthoxylum schinifolium*) against selected foodborne pathogens, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(2013) 6044-9.

[۳۲] س. عزیز نیا، ح. ورهرام، م. عزیز نیا، ح. یارحسینی، س.ر. بنائیان دستجردی، د. موسوی، و. گودرزی، بررسی میزان تاثیر عصاره ریشه کهورک در انگلزدایی از سبزیجات خوراکی در شهرستان ایلام، *فصلنامه فناوری های نوین غذایی*، **۲** (۱۳۹۳) ۱۰۳-۹۵.

[33] S. Malik, S. Mann, D. Gpta, R.K. Guptar, Nutraceutical properties of *Prosopis cineraria*(*L.*) Druce pods: A component of Panchkuta, *J. Pharmacognosy and Phytochemistry*, **2** (2013) 66- 73.

[34] R. Hammerschmidt, J. Kuc, *Induced resistance to disease in plants*, Kluwer Academic Publishers, American, 1995.

[35] G. Zacheo, T. Bleve-Zacheo, D. Pacoda, C. Orlando, R.D. Durbin, The assocation between heatinduced susceptiblity of tomatos to *Meloidogyne incognita* and peroxidase activity, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **46** (1995) 491-50.

[36] M. Mohammadi, H. Kazemi, Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance, *Plant Science*, **162** (2002) 491-498.

[37] N. Koike, M. Hyakumachi, K. Kageyama, S. Tsuyuma, N. Doke, Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth – promoting fungi: Lignification and superoxide generation, *European Journal of Plant Pathology*, **107** (2001) 523-533.