مقاله تحقیقی

مقایسه اثر دو نوع اسانس پرتقال و لیموترش بر تولید و مدت ماندگاری آب های آشامیدنی طعم دار

ارمغان سعیدی، سیمین اسداللهی*، مهناز هاشمی روان

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین – پیشوا، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، ورامین، ایران

***مسئول مکاتبات:** سیمین اسداللهی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد ورامین پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، آدرس الکترونیکی: asadollahi@iauvaramin.ac.ir

محل انجام تحقیق: گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد ورامین پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۸

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۰- شماره ۴- زمستان ۱۳۹۴

چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی خاصیت ضدمیکروبی دو نوع اسانس روغنی در تولید آب آشامیدنی طعم دار با حذف مراحل کلر و ازن‌زنی روی باکتری اشرشیاکلی در پروسه تولید بود. بدین مجموعه رقت سریالی ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۴۰، ۱:۸۰، ۱:۱۶۰، ۱:۳۲۰ و ۱:۶۴۰ در لوله‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد. از آنجایی‌که اسانس گیاهان فرار می‌باشند و حلالیت آنها در محیط آبی کم است، بنابراین جهت رفع این نقیصه، ۵۰ میکرولیتر از اسانس در حلال حاوی ۴۹ میکرولیتر اتانول ۹۶ درجه و ۱ میکرولیترتوئین ۲۰ حل گردید. بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که بیشترین اثر باکتری‌کشی، تیمارحاوی غلظت ۱:۱۰ اسانس روغنی پرتقال بود که بعد از ۷ روز در آب آشامیدنی از لحاظ میکروبی کاهش قابل توجهی مشاهده گردید و با در نظر گرفتن نتایج آزمون حسی بهترین غلظت مورد استفاده ۱:۸۰ بود. بطور کلی نتایج این پژوهش نشان داد هر چه مدت زمان ماندگاری اسانس روغنی در آب آشامیدنی حاوی میکروارگانیسم بیشتر باشد، تعداد بیشتری از میکروارگانیسم ها از بین می‌روند بطوری که در روز ۳۰ در تمامی تیمارها با اسانس های روغنی هیچ میکروارگانیسمی دیده نشد.

واژه های کلیدی: پرتقال، لیموترش، اشرشیاکلی، ضدباکتری

مقدمه

آب آشامیدنی مطابق استاندارد ملی شماره ۱۰۵۳ ایران، آبی است که ویژگی های فیزیکی، شیمیایی، بیولوژیکی و مواد رادیواکتیو آن در حدی باشد که مصرف آن جهت آشامیدن، عارضه سویی در کوتاه مدت یا دراز مدت، برای سلامت انسان ایجاد نکند (۱). در حال حاضر استفاده از کلر برای گندزدایی به دلیل ارزان بودن و قدرت میکروب‌کشی و اثر ابقایی نسبتاً خوب آن، متداول‌ترین روش در دنیا و از جمله کشور ایران می‌باشد. کلرزنی جهت ضدعفونی کردن آب آشامیدنی از پاتوژن ها، ظهور محصولات جانبی بطور ناخواسته می‌باشد که از خطرات بالقوه این محصولات می‌توان به ایجاد سرطان مثانه، ریزش موی سر، ناراحتی کلیوی، اثرات منفی بر تولیدمثل و رشد و نمو اشاره نمود (۸). نقش ازن در تصفیه آب و پساب به عنوان یک عامل اکسید کننده و یک ترکیب میکروب‌کش حائز اهمیت بوده و در محیط آبی خصوصیات مشابهی با کلر دارد، از این رو این دو ماده در مواردی به عنوان مکمل یکدیگر مطرح می‌شوند. باید توجه شود که

حلالیت ازن در آب ۱۲ مرتبه کمتر از حلالیت کلر بوده و محلول آبی آن نیز ناپایدار می‌باشد. با توجه به ناپایداری گاز ازن، باید در محل مصرف و نیز زمان مصرف تولید شود و نمی‌توان آن را مانند کلر ذخیره نمود (۹).

علی‌رغم پیشرفت های مدرن در بهداشت و تکنیک های تولید غذا هنوز هم سلامت غذا اهمیت فزایندهای در سلامت عمومی ایفا کند (۱۰). اثر گیاهان معطر و ادویه‌ها در نگهداری و پیشگیری از فساد مواد غذایی از دوران باستان برای انسان به خوبی شناخته شده بود (۱۱). اخیرا متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از نظر اثرات ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۲). مشخص شده است که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری و ضد ویروس می باشند (۱۳).

گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که اسانس‌ها دارای خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی هستند (۲). اسانس پوست گیاه پرتقال با نام علمی *Citrus auratium* از تیره *Rotaceae* است. اسانس پرتقال مایعی است زرد، نارنجی یا قهوه ای مایل به زرد با بوی مشخص پرتقال و با طعم ملایم عطری. این اسانس توسط روش‌های مکانیکی از پوست پرتقال حاصل می‌شود، اگرچه تولید آن به نوعی است که بدون بهینه سازی (ترپن زدایی)، امکان استفاده مستقیم در مواد غذایی را نمی‌دهد (۱۴).

مینوئی و همکاران (۱۳۸۵) نقش ضد باکتریال اسانس پرتقال را روی باکتری های هوازی و بی‌هوازی اختیاری در بیماران مبتلا به ضایعات پوستی بررسی کردند و بیان نمودند که اسانس پرتقال روی باکتری‌های استافیلوکوک جداشده از ضایعات پوستی جواب خوبی دارد. در حقیقت استافیلوکوک حساس به اسانس پرتقال می‌باشد.

علی‌رغم پیشرفت علم، همچنان سلامت و ایمنی مواد غذایی یک نگرانی اساسی هم برای مصرف کننده و هم برای صنایع غذایی می‌باشد بویژه که آمار عفونت‌های ناشی از غذا روند رو به افزایشی را نشان می‌دهد (۱۵). اسانس لیموترش روغنی است به رنگ زرد روشن یا زرد مایل به سبز با بوی مشخص وگرم عطری با طعم کمی تلخ (۳). این اسانس به روش فشردن پوست تازه لیمو و یا به روش تقطیر با آب تهیه می‌شود. این اسانس عمدتاً از لیمونن همراه با مقدار کمی ترپن‌های دیگر مانند فلاندرن، کامفن، پاراسمین و غیره که ۹۰ ٪ اسانس را تشکیل می دهند، تشکیل یافته است. Shaefi طی آزمایشات خود در بررسی فعالیت ضدمیکروبی، موثرترین گونه ها را آویشن، مرزنجوش، مریم گلی و نعناع معرفی کرد (۱۷). Parish در سال ۲۰۰۳ بیان کرد که فعالیت این گونه ها بستگی به نوع، ترکیب، غلظت اسانس های روغنی، نوع و غلظت میکروارگانیسم مورد نظر، ترکیب ماده و ... دارد (۱۸). یغمایی و همکاران (۴) در تحقیق خود به بررسی اسانس پوست لیمو ترش بر میزان چربی‌های خون و شمارش افتراقی لکوسیت های خون در موش های نر بالغ نژاد ویستار این‌چنین بیان نمودند که احتمالاً مصرف اسانس روغنی لیمو ترش با کاهش لیپید پلاسما می‌تواند از بروز آرتواسکلر و در نتیجه بیماری‌های قلبی و عروقی بکاهد. همچنین این احتمال وجود دارد که اسانس به علت اثر افزایشی بر لکوسیت‌ها و درصد لنفوسیت‌های خون، بتواند با تقویت دستگاه ایمنی سبب جلوگیری از بروز بیماری‌های عفونی و سرطان گردد.

Valent و Therapt در تحقیقات خود این چنین بیان نمودند که اسانس روغنی لیموترش دارای اثر ضدعفونی کننده و ضد باکتریایی است که به دلیل خواص اسیدی آن می‌باشد (۱۹).

هدف از این تحقیق مطالعه تاثیر دو نوع اسانس پرتقال و لیموترش روی شاخص آلودگی آب‌های آشامیدنی (استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۳) می باشد. در بین ۲۵۰ نوع بیماری ناشی از مصرف غذا که $\frac{2}{3}$ باکتریایی می‌باشد، مسمومیت‌های ناشی از سالمونلا، اشرشیاکولی و استافیلوکوکوس ارئوس از مهمترین این بیماری‌ها بوده که در بسیاری از کشورها جایگاه‌های اصلی را به خود اختصاص داده‌اند (۲).

مواد و روش‌ها

تهیه مواد مورد نیاز

اسانس‌های روغنی به صورت آماده از شرکت نوین شیمی (شرکت تولیدکننده‌ی اسانس‌های گیاهی)، سویه اشرشیاکلی ATCC 19433 از مرکز کلکسیون صنعتی قارچ ها و باکتری های ایران به صورت آمپول لیوفلیزه، محیط کشت جامد مک کانکی آگار ساخت شرکت کیولب کانادا، جهت انجام آزمون‌ها و تهیه سویه میکروبی، توئین

۲۰ و اتانول ۹۶ درجه، ساخت شرکت کیمیاگستر ایران، جهت ساخت حلال خریداری گردید.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

جهت تهیه سوسپانسون میکروبی مطابق دستور العمل شرکت سازنده (مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری ها)، ابتدا آمپول لیوفلیزه، روی تنظیف گذاشته شد، سپس در محلی که پنبه درون آمپول قرار می‌گیرد الکل ریخته شد و روی آن با قلم الماس992 خط انداخته شد. دوباره روی همان قسمت الکل ریخته و با تنظیف خشک شد. این کار مانع از کشیده شدن الکل به داخل آمپول، هنگام شکسته شدن خلاء می‌گردد. با فشار دست آمپول را از محل خراش شکسته و با استفاده از پنس استریل، پنبه درون آمپول را خارج کرده، سپس با پیپت پاستور استریل، ۰/۴ – ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول استریل را به ماده خشک درون آمپول اضافه کرده و به دقت آن را مخلوط کرده تا به شکل سوسپانسیون یکنواختی درآید.کل سوسپانسیون تهیه شده فقط روی یک لوله بزرگ حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مناسب منتقل گردید. قطرات آخر، سوسپانسیون روی پلیت حاوی محیط کشت منتقل گردید و کشت خطی به منظور تهیه تک کلنی انجام شد. به منظور دستیابی به کشت تازه و فعال، میکروب مورد نظر در مجاورت شعله و زیر هود لامینار توسط لوپ سترون در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند.

تهیه امولسیون آبی اسانس‌ها

از آنجایی که اسانس‌های گیاهان به تنهایی فرار می‌باشند و حلالیت آنها در محیط آبی کم می‌باشد، بنابراین جهت رفع این نقیصه، ۵۰ میکرولیتر از اسانس روغنی در حلال حاوی ۴۹ میکرولیتر اتانول ۹۶ درجه و ۱ میکرولیترتوئین ۲۰ حل گردید (۱۹).

تهیه رقت سریالی از اسانس‌ها

از اسانس مورد نظر، مجموعه رقت سریالی ۱:۱۰ ، ۱:۲۰ ، ۱:۴۰ ، ۱:۸۰ ، ۱:۱۶۰ ، ۱:۳۲۰ و ۱:۶۴۰ در لوله‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه گردید، بدین صورت که ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر داخل هر لوله ریخته شد. در لوله اول ۰/۵ میلی‌لیتر از اسانس مورد نظر وارد شده پس از اطمینان از انحلال، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول لوله اول به لوله دوم منتقل گردید. بعد از اطمینان از انحلال، مجدداً ۰/۵ میلی‌لیتر از لوله دوم برداشته و به لوله سوم منتقل گردید و الی آخر... . در نهایت ۰/۵ میلی‌لیتر از لوله آخر بعد از انحلال دور ریخته شد (۱۹).

تعیین ضریب لوپ

یک محلول ذخیره رنگی ۰/۵ درصد از بلودومتیلن در آب مقطر تهیه گردید. ۹ لوله آماده کرده و به لوله اول ۱ میلی‌لیتر و به ۸ لوله باقی مانده ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس به لوله اول ۰/۰۱ میلی‌لیتر از محلول ذخیره رنگی اضافه گردید و پس از مخلوط نمودن ۰/۵ میلی‌لیتر از لوله اول به دوم و ۰/۵ میلی‌لیتر از لوله دوم به لوله سوم و... . در نهایت ۰/۵ میلی‌لیتر از لوله آخر برداشته و دور ریخته شد (۲۰).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها

آب آشامیدنی بعد از استخراج از منابع زیر زمینی، از فیلتر شن، فیلترکربن اکتیو، سیستم اسمز معکوس و نهایتاً از لامپ UV عبورکرده و درون بطری آسپتیک، در هر بطری به اندازه ۲۰۰ میلی‌متر آب در حضور شعله ریخته شد و به آزمایشگاه منتقل گردید (۳). داخل ۷ بطری نمونه آب در کنار شعله از استارتر اشرشیاکلی کشت داده شده، ۵ عددکلنی با لوپ استریل و ضریب ۱۰۲ کلنی (۵۰۰ عدد کلنی) وارد هر بطری گردید. یک لوله آزمایش فاقد اسانس نیز به عنوان کنترل رشد (کنترل مثبت) در نظر گرفته شد، بنابراین کنترل دارای ۴۹ میکرولیتر اتانول ۹۶ درجه و ۱ میکرو لیتر توئین ۲۰ می باشد. پس از انجام این مراحل از نمونه های تیمار شده به صورت خطی روی محیط کشت مک کانکی آگار در کنار شعله و زیر هود لامینار جهت بررسی خاصیت ضد باکتری در لحظه صفر برده شدند، تا پس از یک شب گرمخانه‌گذاری در ۳۷ سانتی‌گراد تعداد کلونی‌های رشد کرده شمارش شوند. بعد از طی ۷ روز، ۱۴ روز، ۲۱ روز و ۳۰ روز مجدداً از نمونه‌های تیمار شده کشت میکروبی گرفته شد تا میزان عملکرد میکروب‌کشی اسانس‌ها در رقت‌ها و زمان‌های متفاوت بررسی شوند. این عملیات در سه تکرار به طور جداگانه انجام شد.

ارزیابی حسی

برای ارزیابی حسی، از یک گروه پانل متشکل از ۱۰ فرد آموزش دیده استفاده شد. پرسشنامهٔ مورد نظر براساس روش دونیک برای امتیازدهی به آب‌های آشامیدنی طعم‌دار در اختیار ارزیابان قرار گرفت. سپس، این افراد دیدگاه‌های خود را پس از ارزیابی طعم، بو، بافت، رنگ و مطلوبیت کل تیمارها روی پرسشنامه منتقل کردند.

نتایج

جدول ۱- مقایسه میانگین تأثیر نوع اسانس و آب بدون اسانس بر تعداد اشرشیاکلی(cfu/ml)

تیمار	آب بدون اسانس	اسانس لیموترش	اسانس پرتقال
میانگین	۵۰۰a	۱۲۳ b	۱۱۰bc

- حروف مشابه نشان دهنده عدم معنادار بودن می‌باشد.
- (P >۰/۰۱)

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر غلظت اسانس و آب بدون اسانس بر تعداد اشرشیاکلی(cfu/ml)

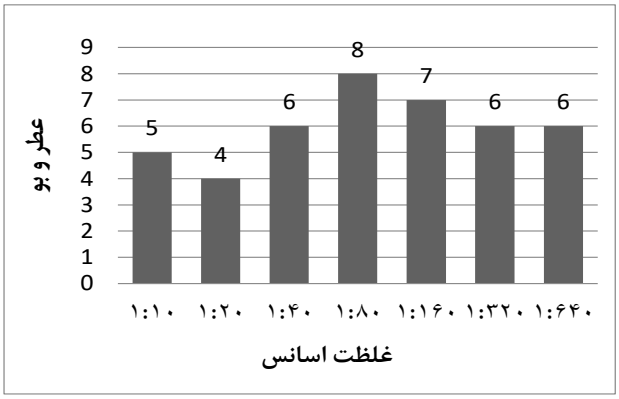
تیمار	۱:۱۰	۱:۲۰	۱:۴۰	۱:۸۰	۱:۱۶۰	۱:۳۲۰	۱:۶۴۰
میانگین	۲۰۸a	۲۰۸a	۲۰۹b	۲۱۰b	۲۱۰b	۲۱۱b	۲۱۱b

- حروف مشابه نشان دهنده عدم معنادار بودن می‌باشد.
- (P >۰/۰۱)

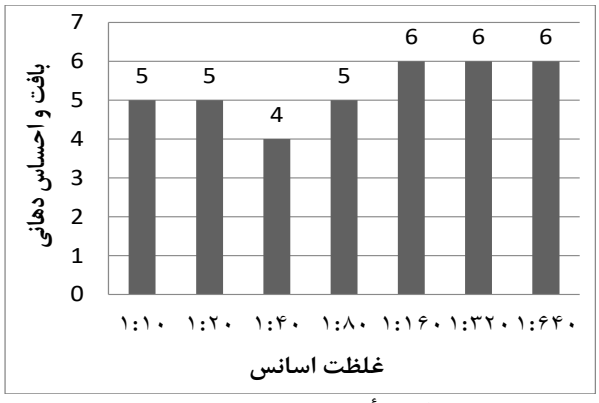
جدول ۳-مقایسه میانگین تأثیر زمان اسانس و آب بدون اسانس بر تعداد اشرشیاکلی

تیمار	روز صفر	روز ۷	روز۱۴	روز۲۱	روز۳۰
میانگین	۵۰۰a	۱۶۹b	۱۲۹c	۱۲۵c	۱۲۵c

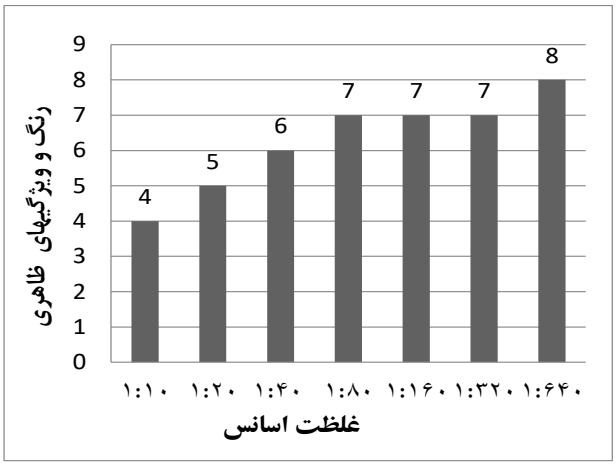
- حروف مشابه نشان دهنده عدم معنادار بودن می‌باشد
- (P >۰/۰۱)



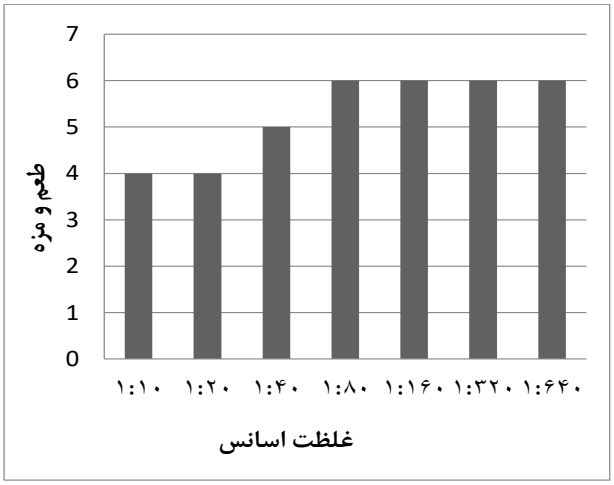
شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیر غلظت اسانس بر عطر و بو.



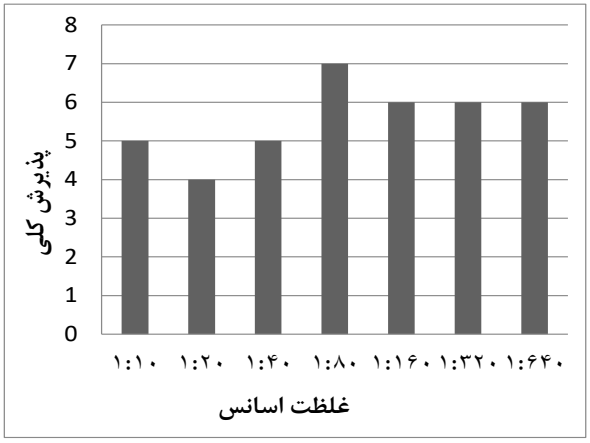
شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر غلظت اسانس بر بافت و احساس دهانی.



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر غلظت اسانس بر رنگ و ویژگی‌های ظاهری.



شکل ۴- مقایسه میانگین تأثیر غلظت اسانس بر طعم و مزه



شکل ۵ - مقایسه میانگین تأثیر غلظت اسانس بر مقبولیت حسی کلی.

بحث، تفسیر و نتیجه‌گیری

در جداول ۱، ۲ و ۳ تغییرات جمعیت باکتری اشرشیاکلی با توجه به نوع اسانس؛ غلظت و زمان ماندگاری اسانس در آب آشامیدنی نشان داده شده است. همان‌گونه که در نتایج آمده است نوع اسانس مورد استفاده، غلظت کاربردی آن و مدت زمان ماندگاری اسانس در آب روی جمعیت میکروبی تاثیرگذار هستند. با افزایش غلظت اسانس مورد استفاده و افزایش مدت ماندگاری اسانس کاهش چشمگیر اثر شیاکلی مشاهده گردید به نحوی که در بالاترین غلظت (۱:۱۰) و بیشترین زمان (۳۰ روز) بیشترین اثر باکتری‌کشی اسانس‌ها بدون توجه به نوع اسانس به کار رفته مشاهده گردید. تمامی آزمون‌ها در سه مرتبه تکرار انجام شدند. جهت بررسی تاثیر حلال مورد استفاده در طول تحقیق آب بدون اسانس به عنوان کنترل رشد (کنترل مثبت) استفاده گردید. طبق نتایج به دست آمده حلال‌های مورد استفاده (اتانول و توین ۲۰) تاثیری بر جمعیت میکروبی نداشتند.

از سال‌های بسیار دور از ترکیبات متنوع و متفاوت شیمیایی برای ممانعت از فعالیت میکروبی و قارچی استفاده می‌گردند. گیاهان و ادویه‌جات از زمان باستان به عنوان یک ممانعت کننده میکروبی در مواد غذایی استفاده می‌شده‌اند (۲۱). تحقیقات انجام شده در انگلستان، استفاده از اسانس‌های روغنی بعنوان ضدعفونی کننده‌های جایگزین طبیعی جهت استفاده مجدد از آب خاکستری (آبی که به واسطه فعالیت‌های خانگی کدر شده و در ضمن از نظر بهداشتی چیزی بین آب تمیز و فاضلاب است. مثلا آبی که حاصل شستشوی لباس و ظروف و حتی استحمام است یا آب برگشتی از آبیاری گیاهان آپارتمانی که معمولا زیرگلدان‌ها جمع می‌شود، نمونه‌های خوبی از آب خاکستری است (۵) دارای فعالیت ضد میکروبی بود. در حضور ۹۴ میلی گرم در لیتر اسانس روغنی مرزنجوش با بیش از ۳۰ دقیقه زمان تماس، اثر بسیار کمی بر غلظت کلی‌فرم‌ها در آب خاکستری داشت، در حالی‌که با غلظت ۴۶۸ میلی گرم در یک لیتر آب خاکستری فعالیت بارزی از خود نشان داد، به طوری‌که کلی‌فرم‌ها در ۱۰۰ سی سی از آب مذکور قابل تشخیص نبودند. با افزایش مدت زمان تماس اسانس روغنی با آب‌های خاکستری به مدت ۱۴ روز تعداد بیشتری از کلی‌فرم‌های موجود در آب مذکور غیرفعال گردید، به طوری که در طی این زمان تماس و غلظت مذکور بدون استفاده از اشعه ماوراء بنفش از رشد کلی‌فرم‌ها به طور کامل جلوگیری کرد.

اگرچه مطالعات زیادی روی خصوصیات ضدباکتریایی اسانس‌ها و ترکیباتشان انجام شده است، اما جزئیات مکانیسم عمل آنها به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است. ساختمان شیمیایی هر یک از ترکیبات اسانس‌ها بر طرز عمل و فعالیت ضدباکتریایی آنها تأثیر می‌گذارد. از زمانی که مشخص شد ترپن‌های موجود در اسانس‌های ادویه‌جات عوامل ضدمیکروبی اولیه هستند، مکانیسم عملی مشابه به این ترکیبات، نسبت داده شد (۲۲).

نتایج ارزیابی حسی آب‌های آشامیدنی طعم‌دار در غلظت‌های مختلف در نمودارهای ۱ تا ۵ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها بیانگر کاهش معنادار صفات

حسی در کاهش غلظت اسانس‌ها در آب می باشد. با توجه به نتایج بدســـت آمده، نمونه تیمار شـــده حاوی غلظت زیادی از ا سانس، میزان عطر و بو در نمونه بیشتر شده به طوری که در غل ظت ۱:۱۰ و ۱:۲۰ از اســـانس دارای بیشترین عطر و بو بود اما بر میزان طعم و مزه محصول اثر مغایر با این نتیجه داشـــتند. در تیمار حاوی اســـانس باغلظت‌ها ی ۱:۸۰ و ۱:۱۶۰ از لحاظ بافت و احســـاس دهانی همچنین پذیرش کلی محصولات تولیدی مطلوبیت بیشـــتری داشـــتند. همچنین می‌توان گفت از لحاظ رنگ و ظاهر نمونه‌های تیمار شـــده با اســـانس هیچ مغایرتی دیده نشد. در تحقیق دیگری با افزودن ا سانس سیر در آزمون مغایر با نتیجه تحقیق به دســـت آمده نشـــان دادند که افزودن ا سانس سیر در غلظت‌های ۰/۵٪ ، ۱/۵ ٪ و ۲/۵ ٪ بو، قابلیت جویدن و ظاهر فیلم خوراکی تهیه شده از ایزوله پروتئین سویا را به شدت کاهش داد (۷).

به طور کلی می توان گفت روش عمل اســـانس‌های روغنی به غلظت آنها وابسته ا ست. برا ساس نتایج بد ست آمده هر چه غلظت اســـانس و مدت زمان تماس اســـانس با میکروارگـــانیســـم بیشـــتر گردد، تعـــداد بیشـــتری از میکروارگانیسم‌ها از بین می‌روند به طوری‌که بعد از سپری شـــدن ۳۰ روز، در تمامی غلظت‌ها هیچ میکروارگانیســـمی دیده نشد.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی واحد ورامین قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

۱. دوانی، الف. ۱۳۸۸. میکروب شنا سی آب، صص: ۱۰-۱۵.

۲. الوندی، ک، شـــریفان، ا، آقازاده مشـــگی، م. ۱۳۸۹. برر سی ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی ا سانس گیاه نعناع فلفلی.مجله علمی پژوه شی صنایع غذایی، سال هفتم، شماره ۴، ص: ۲۶۴-۳۵۵.

۳. شاهرخی، م، مومنی، ب. ۱۳۷۷. ا سانس‌های گیاهی و اثرات آنها، ص: ۱۰-۱.

۴. زرگری، ع. ۱۳۷۱ . گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران، ص ص ۱۴-۵.

۵. یغمایی، پ.، پریور، ک. هفت سوار، م.و ذره بینان ،ف. ۱۳۸۸. بررســـی تاثیر اســـانس روغنی لیمو ترش بر میزان چربی های خون و شـــمارش لکوســـیت های خون در موش رت نر بالغ نژاد ویســـتار. مجله علمی دانشـــگاه علوم پزشـــکی کردســـتان، دوره ۱۴، صـــص: ۵۵-۶۴.

۶. نوروزی، الف. ۱۳۹۰. آب خاکســـتری، انتشـــارات شبستری، ص: ۱۰- ۲.

۷. علوی، ز. ۱۳۸۹. اسانس‌های روغنی. ویژه نامه گیاهان با اثر ضد میکروبی،ص: ۹-۱ .

8. Richardson, S. 2011. Methods of disinfection of drinking water. Pp, 110-136.
9. Ledon, H., 1991. The hazards Ozone in drinking water disinfectant. Pp, 603-611.
10. Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223–253.
11. Bullerman, L. B., Lieu, Y., Seier, S. A., 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. Journal of Food Science 42(4): 1107-1116.
12. Yang, S., Yu, R., Chou, C., 2001. Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin in egg products. International Journal of Food Microbiology 63: 99-107.
13. Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., Baerheim, A., 1987. Antimicrobial activity of essential. Pharmaceutisch Weekblad 9: 193–197.
14. Chachoyan, A. A., Oganesyan, G. B., 1996. Antitumor activity of some spices of the family Lamiaceae. Rastitelnye Resursy 32(4):59-64.
15. Owusu-Yaw, J., Mathews, R. F., West, P. F., 1986. Alcohol deterpenation of orange oil. Journal of Food Science 4: 51-56.
16. Shafie, F., 2009. The study microorganisms in use our understanding for improving our lives.
17. Parish, M.E., Baum, D., Kryger, R., Goodrich, R.M., Baum, R., 2003. Fate of salmonellae in citrus oils and aqueous aroma. J Food Prot 66(9): 1704-1707.
18. Valnet, J., Therapie, P., 1970. Anti-infective effect of essential oil of lemon. Pp, 178.
19. Cowan, M. M., 2002. Plant products as antimicrobial agents. Journal of Medicinal Plants 3(3): 69-73.

20. Koneman Elmer, W., 1987. Diagnostic microbiology 5th edition, page 96.
21. Tyagi, A. K., Malik, A., 2012. Bactericidal action of lemon grass oil vapors and negative air ion*s*. Innovative Food Science and Emerging Technologies 13:169-177.
22. Lambert, R. J. W., Skandais, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J. E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oils, thyme and caracole. Journal of Applied Microbiology 13: 453-462.