بررسي آلودگي ميكربي زيره سبز و مريم گلي و كاهش آلودگي آنها از طريق پرتودهي با باريكه الكترون ۱۰ MeV

حسین مسعودی*، نیره فلاح نژاد تفتی ، بهرام وخشور، اقدس مهدیزاده
پژوهشگاه علوم وفنون هسته‌ای- پژوهشکده کاربرد پرتوها (یزد)
Masoudi@yrpc.ir

چکیده

در این تحقیق آلودگی میکربی زیره سبز و مریم گلی که در طب سنتی و در صنایع دارویی کاربرد دارد مورد بررسی قرار گرفت.تعیین میزان آلودگی میکربی نمونه ها با روش شمارش صفحه ای هوازی که بهترین معیار سنجش آلودگی است انجام گرفت . همچنین باکتریهای کلیفرمهای مدفوعی ، اشرشیا کلی ، استافیلوکوکوس اورئوس ، باسیلوس سرئوس ، سالمونلاها در گیاهان دارویی مورد مطالعه با روشهای ذکر شده در استاندارد ملی ایران شناسایی و در مواردی شمارش شدند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که از میان گیاهان دارویی مورد مطالعه بالاترین میزان آلودگی مربوط به زیره ، و سپس مریم گلی بود.پس از برآورد میزان ونوع آلودگی میکربی ، مقاومت جمعیت میکربی نمونه ها به تابش که تحت عنوان ارزش D_{10} مطرح می شود ، باپرتودهی نمونه ها بادزهای مختلف (۱۰-۰ کیلوگری) و رسم منحنی دز – پایندگی برای هریک از نمونه ها بطور جداگانه ، تعیین گردید.. در مرحله بعد با استفاده از میزان آلودگی اولیه نمونه ها ، فاکتور ارزشD_{10} و سطح نهایی مطلوب کاستن آلودگی ،کمترین مقدار دز لازم برای کاستن میزان ریزسازواره ها تا حد مطلوب بین ۲تا ٦ کیلوگری تعیین شد.در این کار پژوهشی از روش تابش دهی با باریکه الکترون برا ی کاستن بار میکربی استفاده شد.

کلید واژه : *گیاهان دارویی ، ریزسازواره ها، تابش دهی ،میکرب زدایی ، باریکه الکترون*

مقدمه

اعجاز گیاهان دارویی از روزگاران کهن در میان ایرانیان، مورد توجه بسیار بوده است. یکی از مسائل مهم آلودگی میکربی گیاهان دارویی می باشد.گیاهان دارویی بدلیل اینکه بطور سنتی کشت ، برداشت وخشک می شوند و همچنین در طی شرایط حمل ونقل و فروش به میکروارگانیسم های زیادی آلوده می شوند که سبب تخریب محصول وبروز بیماری در مصرف کنندگان می شود. تحقیقات نشان می دهند که گیاهان دارویی به طور طبیعی نسبت به سایر مواد غذایی دارای سطح بالاتری از ریزسازواره ها هستند {۱و۲}.

میکرب زدایی گیاهان دارویی خشک با مشکلات زیادی همراه بوده وهست .استفاده از اتیلن اکسید و پروپیلن اکسید و ازن بعلت باقی ماندن مقادیر کمی از این گازها در مواد غذایی و سرطانزا بودن منسوخ شده است . استفاده از پرتوهای یونیزان راه مناسب وموثری برای میکرب زدایی است . این پرتوها یک عامل زیست کش غیر انتخابی می باشند که بر روی تمام اشکال حیات تاثیر گذار هستند و می توان این پرتو ها را با مقادیر دقیقی به نام دز به مواد انتقال داد. رابطه مشخص وتعریف شده ای بین کشتن میکربها و میزان دز

جذبی وجود دارد .یک تناسب معکوس بین لگاریتم تعداد سلولهای زنده و دز جذبی در کشتهای میکربی وجود دارد . دز لازم برای رسیدن به کاهش تعداد میکروارگانسیم های اولیه (N0) تا یک سطح مطلوب انتهایی (NT) را می توان براحتی از معادله $D = D10(\log N0 - \log NT)$ محاسبه کرد {۲} .D10 ، دز لازم برای کشتن ۹۰ درصد میکروارگانیسم ها می باشد که به نوع میکربها و شرایط پرتودهی بستگی دارد. تیمار با پرتوهای یونیزان هم اکنون یکی از روشهای عمده میکرب زدایی در جهان می باشد وراهنماهای متعددی در بارهٔ فرآیند پرتودهی ادویه جات ، طعم دهنده ها و سبزیجات خشک تدوین شده که گیاهان دارویی نیز در این گروه قرار می گیرند(ASTM 1998 , ICGFI 1992) {۱}.در این طرح پژوهشی آلودگی میکربی تعدادی از گیاهان دارویی خشک بررسی شده است و همچنین مقاومت جمعیت ریزسازواره ها موجود در این گیاهان به پرتو که تحت عنوان ارزش D10 بیان می شود محاسبه شده و براساس این اطلاعات دز موثر لازم برای کاستن بار میکربی این مواد پیشنهاد گردیده است .

مواد وروشها

۱–نمونه برداری : گیاهان دارویی خشک که در این تحقیق انتخاب شدند گل مریم گلی و میوه زیره سبز بود که از ٤ فروشگاه گیاهان دارویی استان یزد تهیه گردید.از هر۲ گیاه دارویی از ٤ منبع مختلف نمونه هایی در بسته های ۱۰ گرمی و۲۵ گرمی بسته بندی شدند. بر روی تعدادی از نمونه ها بعنوان شاهد قبل از پرتودهی آزمونهای میکربی انجام گرفت و بقیه نمونه ها با دزهای بین ۰ تا ۸ کیلوگری با باریکه الکترون پرتودهی شدندو سپس آزمونهای شمارش کلی میکربی وشمارش وشناسایی باکتریهای بیماریزای مورد نظر روی آنها انجام گرفت.

۲– تعیین بار میکربی :پس از تهیه رقت در پپتون واتر۱ درصد ،برای شمارش کلی باکتریهای مزوفیل هوازی، محیط کشت طشتک شمارش آگار به روش مخلوط کردن نمونه با محیط کشت) و برای شمارش کلی کپکها ومخمرها از محیط کشت سابورودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکول ۰/۵ درصد به روش مخلوط کردن نمونه با محیط کشت استفاده شد.شناسایی وشمارش استافیلوکوکوس اورئوس ، شناسایی باسیلوس سرئوس ،شناسایی وشمارش کلیفرمهای مدفوعی ،شناسایی وشمارش اشرشیا کلی وشناسایی سالمونلا طبق استانداردهای مربوطه (استاندارد ملی ایران) انجام گرفت.

۳– پرتودهی :پرتودهی نمونه ها با شتاب دهنده الکترون رودوترون TT200 انجام شده است .

نتایج :

۱-تعیین میزان آلودگی :مقادیر حداکثر آلودگیهای میکربی نمونه های گیاهان دارویی خشک جمع آوری شده از ٤ منبع مختلف در جداول ۱ تا۳ آمده است . بیشترین آلودگی با کپکها درگل مریم گلی مشاهده شد. همچنین نتایج نشان می دهد که این نمونه ها که از ٤ منبع مختلف تهیه شده اند از لحاظ آلودگی میکربی تفاوت زیادی با هم ندارند.ودر اکثر موارد برگها نسبت به دانه ها ومیوه ها آلودگی میکربی بیشتری نشان می دهند. نتایج بررسی وجود و تعداد باکتریهای سالمونلا، استافیلوکوکوس، اورئوس، کلیفرمهای مدفوعی ، اشرشیا کلی ، باسیلوس سرئوس در جداول ۱۵ تا ۱۹ مندرج شده است.بر طبق نتایج بدست آمده ، از نمونه های مریم گلی تقریبا اکثریت نمونه های تست شده با کلیفرمهای مدفوعی آلوده بودند. نیمی از نمونه‌های زیره سبز آلودگی اشرشیا کلی را دارابودند. مریم گلی عاری از این باکتری بود.
رخداد استافیلوکوکوس اورئوس در بین نمونه های مورد آزمون نسبت به دو مورد قبل کمتر بوده و زیره سبز عاری از استاف اورئوس بودند و مریم گلی تنها در یکی از منابع این آلودگی را نشان دادند . میزان آلودگی با سالمونلا مانند آلودگی با استاف اورئوس بود . مریم گلی فاقد این آلودگی بودند. بطور کلی از لحاظ آلودگی با باکتریهای بیماریزای فوق زیره سبز بیشترین آلودگی و مریم گلی کمترین آلودگی را دارا بودند.

۲-تعیین ارزش D_{10}:نتایج حاصل از آزمونهای میکربی نمونه های گیاهان دارویی خشک مورد آزمون از دو منبعی که بیشترین آلودگی را داشتند و با دزهای بین ۲ تا ۸ کیلو گر ی پرتودهی شده اند در جداول ۲۰ تا ۲۹ ارائه شده است.با استفاده از اطلاعات مندرج در این جداول منحنی دز –پایندگی مربوط به هرنمونه و هرباکتری ترسیم شد و برای محاسبه فاکتور ارزش D10 ، با استفاده ازمعادله حاصل از برازش منحنی ها ، مقدار میانگین ارزش D10 معین شد. مقادیر ارزشهای D10 بدست آمده در جدول ۳۰ مندرج شده است.با توجه به نتایج بدست آمده ، در اغلب موارد باکتریها مقاومت بیشتری نسبت به مخمرها ومخمرها مقاومت بیشتری نسبت به کپکها در برابر پرتو از خود نشان می دهند. بیشترین تفاوت ارزش D10 مربوط به مخمرها بود که احتمالا بعلت تنوع مخمرها در نمونه های مورد آزمون یا بعلت اثر نوع ماده غذایی بر این میکروارگانیسمها باشد. بر اساس نتایج بدست آمده ارزش D10 کلیفرمها بین ۱/۳۳ – ۱/.۳ کیلوگری ، اشرشیاکلی بین ۰/۷ – ۰/٦ کیلوگری و استاف اورئوس بین ۰/۸ – ۰/۷ کیلوگری می باشد. باکتریهای سالمونلا و باسیلوس سرئوس تا دز ۳ و ٦ کیلوگری مشاهده شدند. وپس از آن از نمونه ها حذف شده بودند. بطورکلی باکتریهای بیماریزا مقاومت کمی نسبت به پرتو دارند واکثر آنها در دزهای پایین ، تا ۳ کیلوگری از بین می روند. از بین باکتریهای بیماریزای فوق باسیلوس سرئوس بعلت داشتن اسپور مقاومت بیشتری نسبت به پرتو نشان داده و با وجود تعداد اولیه پایین تا دز٦ کیلوگری در نمونه ها وجود داشت.

۳-محاسبه دز بهینه: برای محاسبه دز بهینه پرتودهی برای کاهش بار میکربی سه فاکتور مورد نیاز است : ۱- میزان آلودگی میکربی اولیه (N0) ۲- ارزش D10 ۳- سطحی از آلودگی باقیمانده در مواد پس از پرتودهی که مطلوب و مورد نظر است(NT) .

$$D = D10(\log N0 - \log NT)$$

بدلیل در دست تدوین بودن استاندارد ویژگی میکربی گیاهان داروئی در ایران ، سطح مطلوب انتهایی را می توان بر اساسر خواست شرکتهای تولید کننده (متقاضی پرتودهی) و یا بر اساس استانداردهای بین المللی تعیین کرد.با توجه به استانداردهای در دسترس ، سطح مطلوب پیشنهادی نویسنده در جدول ٤۲ ارائه شده است وبراساس آن دز بهینه پرتو برای کاهش بارمیکربی تا سطح مورد نظر محاسبه شده که در جداول ٤۳ تا ٤۷ آمده است.همانطور که مشاهده می شود در صورتیکه گیاهان دارویی با آب جوش تهیه شوند میزان دز پرتو برای رسیدن به سطح مطلوب کمتر از حالتی است که برای تهیه آنها از آب جوش استفاده نشود.
از یافته ها ونتایج می توان به این مطلب رسید که علیرغم این نکته که بار میکربی گیاهان دارویی خشک که به بصورت دم کرده با آب جوش تهیه می شوند به میزان قابل ملاحظه ای کاهش می یابد ولی به دلیل

آلودگی به باکتریهای بیماریزا ، این گیاهان دارویی به هر صورتی که مصرف شوند چه بصورت دم کرده با آب جوش یا بدون آب جوش باید با دزی بین ۲ تا ٦ کیلوگری پرتودهی و میکرب زدایی شوند.

بحث :

نتایج بررسیهای منتشر شده در متون علمی نشان می دهد که آلودگی میکربی گیاهان دارویی از سایر مواد غذایی بیشتر است . نتایج بدست آمده ما نیز بر این واقعیت منطبق است . میزان ونوع میکروارگانیسم های گیاهان دارویی ارتباط مستقیم با روشهای کشاورزی سنتی ، شرایط برداشت وفرآوری بعدی این محصولات وشرایط اقلیمی منطقه رویش گیاه دارد. نتایج بدست آمده ما در این طرح با مطالعات مشابه در مقالات علمی هماهنگی دارد. مطالعات نشان می دهد که تهیه دم کرده های گیاهان دارویی با آب جوش آلودگیهای میکربی را بطور چشمگیری کاهش می دهدکه این کاهش باعث به حداقل رسیدن خطر مصرف این دم کرده ها برای سلامتی انسان می شود{۳}. بنابراین توصیه می شود در صورتیکه این گیاهان مورد مصرف با هیچکدام از روشهای مرسوم ، میکرب زدایی نشده اند برای تهیه آنها حتما از آب جوش استفاده شود وحتی المقدور از مصرف آنها بصورت خیسانده یا دم کرده با آب زیر ۸۰ درجه خودداری شودو پیشنهاد می گردد که گیاهان دارویی که به بازار برای مصرف عامه مردم عرضه می شود حتما برچسبی برای طریقه مصرف و توصیه مصرف با آب جوش به همراه داشته باشد همچنین برای حصول به نتیجه بهتر وایمنی بیشتر بایستی شرایط کنترل شده ای برای کشت و برداشت وخدمات پس از برداشت این گیاهان وجود داشته باشد و بر این اساس باید راهنماهایی تحت عنوان " روشهای خوب کشاورزی " تدوین شده وبه مرحله اجرا درآید . برای کنترل آلودگیها پس از اجرای روشهای خوب کشاورزی ، لازم است کارگاهها یا کارخانجاتی جهت تمیز سازی و بسته بندی بهداشتی گیاهان دارویی تاسیس شود تا آلودگی در مراحل حمل ونقل و فروش به حداقل رسانده شود.و نهایتا در این مرحله است که بر اساس نتایج حاصله از این طرح لزوم یک روش میکرب زدایی خوب احساس می شود.

تحقیقاتی که در طول چند دهه گذشته در سراسر دنیا انجام گرفته این نکته را اثبات کرده که پرتودهی گیاهان دارویی وادویه با پرتوهای یونیزان یک فرآیند بسیار موثر در تخریب ریزسازواره های آلاینده می باشد وهمچنین اینکه، هردونوع پرتودهی ، چشمه های گاما وشتابدهنده های الکترون را می توان بطور موفق برای میکرب زدایی ادویه وگیاهان دارویی بکار برد{۲}.

جدول ۱ : تعداد ریزسازواره ها در هر گرم (cfu/g) زیره و مریم گلی تابش دهی شده

KGy / تکرار	۰			۲/۲			۳/۲			٥/٤			۸/٦		
	باکتری	کپک	مخمر	باکتری	کپک	مخمر	باکتری	کپک	مخمر	باکتری	کپک	مخمر	باکتری	کپک	مخمر
زیره D	۷×۱۰٥ / ۹	۳×۱۰۳ / ۹	۸×۱۰۳ / ٥	۱×۱۰۳ / ۷	۲×۱۰۳ / ۱	۱۰۳	٥×۱۰۲ / ۹	۷×۱۰۲ / ۳	۱×۱۰۲ / ٥	٤۰	٤۰	۱×۱۰۲ / ۲	۱۰	--	٥۰
زیره C	٤×۱۰٦ / ۱	۲×۱۰۳ / ۲	۲×۱۰۳ / ۲	٤×۱۰۳ / ۹	۸٥	۱۰۲ ×٤	۲×۱۰۳ / ۱	۲٥	۳×۱۰۲ / ۱	۱۰۲	--	۲۰	۱۰	--	--
مریم گلیB	۹×۱۰٤ / ۱	٦×۱۰٦ / ۷	--	٤×۱۰۲ / ٦	٦×۱۰۳	--	٥×۱۰۲ / ۲	۲×۱۰۲ / ۲	--	۹٥	۱۰	--	--	--	--
مریم گلی D	۲×۱۰٤ / ۲	۸×۱۰٦ / ٦	--	۸×۱۰۳ / ۱	۸×۱۰۳ / ۷	--	٦×۱۰۲ / ۱	٥×۱۰۲ / ۱	--	۱٥	۱۰	--	--	--	--

جدول۲- تعدادکل باکتریها (cfu/g) در زیره و مریم گلی قبل از تابش دهی

منابع	A	B	C	D
زیره سبز	$٥/٦\times۱۰^{٥}$	$۸/۸\times۱۰^{٥}$	$۱/٤\times۱۰^{٦}$	$۹/۷\times۱۰^{٥}$
مریم گلی	$٥/۲\times۱۰^{٤}$	$۱/۹\times۱۰^{٤}$	$۷/٤\times۱۰^{٤}$	$۲/۲\times۱۰^{٤}$

جدول۳- تعدادکپکها (cfu/g) در زیره و مریم گلی قبل از تابش دهی

منابع	A	B	C	D
زیره سبز	۲×۱۰^{٤}	$۱/۸\times۱۰^{٤}$	$۲/۲\times۱۰^{٤}$	$۹/۳\times۱۰^{٤}$
مریم گلی	$٥/۹\times۱۰^{٦}$	$۷/۶\times۱۰^{٦}$	۷×۱۰^{٦}	$۶/۸\times۱۰^{٦}$

جدول ٤- تعداد مخمرها (cfu/g) در زیره و مریم گلی قبل از تابش دهی

منابع	A	B	C	D
زیره سبز	$۱/۴×۱۰^{۳}$	$۹×۱۰^{۲}$	$۲/۲×۱۰^{۳}$	$۵/۸×۱۰^{۳}$
مریم گلی	—	—	—	—

جدول٥ : دز بهینه پیشنهادی میکرب زدایی گیاهان دارویی

نمونه‌ها	در صورتیکه با آب جوش تهیه شود	در صورتیکه با آب جوش تهیه نشود
زیره D	۴/۴	۴/۴
زیره C	نیازی به پرتودهی ندارد.	۲
مریم گلی B	۱/۶	۲/۵۱
مریم گلی D	۱/۹	۲/۴

جدول ٦ : میانگین تعداد باکتریهای شاخص نمونه های مریم گلی تابش دهی شده با دزهای مختلف

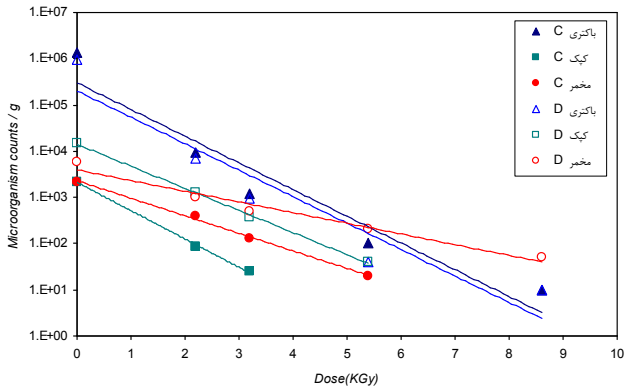
منابع و نوع آلودگی / دز KGy	مریم گلی B	مریم گلی D
	کلیفرم	استافیلوکوکوس اورئوس
۰ شاهد	۲٤۰	٤۳۰
۰/۸	٤۰	۲٥
۱/٥	۱۰	٥
۲	۰	۰
۳	۰	۰
٤/٤	۰	۰
٦	۰	۰

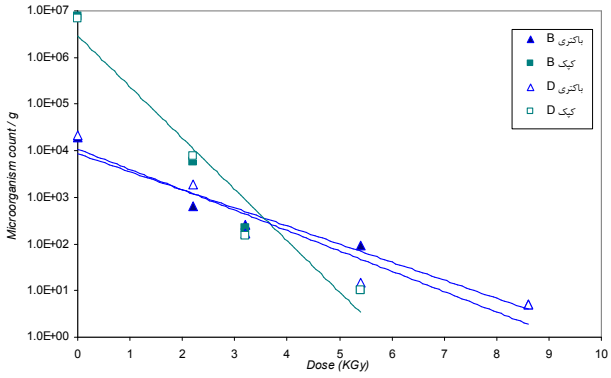
جدول ۷ : میانگین تعداد باکتریهای شاخص نمونه زیره تابش دهی شده با دزهای مختلف

منابع ونوع آلودگی / دز KGy	زیرهC		زیرهD			
	کلیفرم	اشرشیا کلی	کلیفرم	اشرشیا کلی	باسیلوس سرئوس	سالمونلا
۰ شاهد	۸۴۰	٤۰	۱۱۰۰۰۰	۱٤۰	+	+
۰/۸	۸۰	۰	۲۰۰۰۰	۱۰	+	+
۱/٥	۳۰	۰	۳٥۰۰	۰	+	+
۲	۰	۰	۱۱۰۰	۰	+	–
۳	۰	۰	٤٦۰	۰	+	–
۴/۴	۰	۰	۰	۰	–	–

جدول۸ : دز بهینه پیشنهادی پرتو نمونه های گیاهان دارویی

آزمونها	شمارش کلی هوازی زنده حداکثر تعداد مجاز در گرم			کلیفرمها حداکثر تعداد مجاز در گرم	اشرشیا کلی حداکثر تعداد مجاز در گرم	سالمونلا	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس
	باکتریها	کپکها	مخمرها					
گیاهان دارویی که قبل از مصرف به آنها آب جوش اضافه می شود.	$۱۰^{۷}$	$۱۰^{۵}$	$۱۰^{۵}$	$۱۰^{۳}$	$۱۰^{۲}$	در ۲۵ گرم نمونه وجود نداشته باشد.	در ۱۰ گرم نمونه وجود نداشته باشد	در ۱۰ گرم نمونه وجود نداشته باشد
گیاهان دارویی که قبل از مصرف به آنها آب جوش اضافه نمی شود.	$۱۰^{۵}$	$۱۰^{۴}$	$۱۰^{۴}$	$۱۰^{۲}$	در ۱۰ گرم نمونه وجود نداشته باشد	در ۲۵ گرم نمونه وجود نداشته باشد	در ۱۰ گرم نمونه وجود نداشته باشد	در ۱۰ گرم نمونه وجود نداشته باشد





نمودار دز- پایندگی ریزسازواره های میوه زیره (منابع C و D) و مریم گلی (منابع B و D) پس از پرتودهی با باریکه الکترون

محاسبه دز بهینه نمونه های زیره

منابع و دز بهینه / ریزسازواره	منبع D		منبع C	
	دز بهینه (کیلوگری) در صورتیکه با آب جوش تهیه شود.	**دز بهینه (کیلوگری)** در صورتیکه با آب جوش تهیه نشود	**دز بهینه (کیلوگری)** در صورتیکه با آب جوش تهیه شود.	**دز بهینه (کیلوگری)** در صورتیکه با آب جوش تهیه نشود
باکتری	نیازی به پرتودهی ندارد	۱/۷	نیازی به پرتودهی ندارد.	۲
کپک	نیازی به پرتودهی ندارد	۰/۳	نیازی به پرتودهی ندارد.	نیازی به پرتودهی ندارد.
مخمر	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد.
کلیفرم	۲/۶	۳/۸	نیازی به پرتودهی ندارد	۰/۹
اشرشیا کلی	۰/۱	۱/۵	نیازی به پرتودهی ندارد	<۰/۸
استاف اورئوس	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد
باسیلوس سرئوس	۴/۴	۴/۴	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد
سالمونلا	۲	۲	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد

محاسبه دز بهینه نمونه های مریم گلی

منابع و دز بهینه / ریزسازواره	منبع D		منبع B	
	دز بهینه (کیلوگری) در صورتیکه با آب جوش تهیه شود.	**دز بهینه (کیلوگری)** در صورتیکه با آب جوش تهیه نشود	**دز بهینه (کیلوگری)** در صورتیکه با آب جوش تهیه شود.	**دز بهینه (کیلوگری)** در صورتیکه با آب جوش تهیه نشود
باکتری	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد
کپک	۱/۵	۲/۴	۱/۶	۲/۵۱
مخمر	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد
کلیفرم	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	۰/۲
اشرشیا کلی	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد
استاف اورئوس	۱/۹	۱/۹	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد
باسیلوس سرئوس	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد
سالمونلا	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد	نیازی به پرتودهی ندارد

مراجع :

1- Dusan Razem, Branka Katusin-Razem; "Dose requirements for microbial decontamination of botanical materials by irradiation." ; Radiation Physics and chemistry ;63 ;697-701;2002.

2- Branka Katusin-Razem,Boris novak,dusan razem ; "Microbiological decontamination of botanical raw materials and corresponding pharmaceutical products by irradiation." ; Radiation Physics and chemistry ;62 ;261-275;2001.

3-Nobert Kolb; "Microbiological Status of Untreated Herbal Materials";European Herbal Infusions Association (EHIA) ; http://ehia-online.org.