

## Survey on the use of *Eryngium billardieri*, *Citrus aurantium* and *Foeniculum vulgare* distillate wastewaters as a potential source antioxidant and antibacterial

Taghizadeh M<sup>1</sup>, Sharafati-Chaleshtori R<sup>1\*</sup>, Daizadeh H<sup>2</sup>, Akhavantaheri M<sup>3</sup>

1- Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

2- Research and Development Group, Zarrin Golab company, Kashan, I.R. Iran.

3- Anatomical Science Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

Received: 2019/06/13 | Accepted: 2020/06/1

### Abstract:

**Background:** Waste of plant distillates industries are a source of organic compounds. Therefore, this study aimed to evaluate the antibacterial and antioxidant effects of *Eryngium billardieri*, *Citrus aurantium* and *Foeniculum vulgare* wastewaters materials in vitro. **Materials and Methods:** In this experimental study, samples of *Eryngium billardieri*, *Citrus aurantium* and *Foeniculum vulgare* wastewaters were collected at one of the factories in Kashan. After filtration and drying of the obtained solutions, total phenolic and flavonoid compounds were determined by colorimetric method. Also, antioxidant activity was evaluated by ferric reducing ability and antibacterial activities against antibiotic resistance *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* using the micro-dilution and disc diffusion methods.

**Results:** The results showed that the highest amount of phenolic compounds (106.46 mg/g) and flavonoids (13.6 mg/g) were in the *F. vulgare* wastewaters. The highest antioxidant activity was for *F. vulgare* (1229.9±30.44), *C. aurantium* (679.39±1.3), and *E. billardieri* (549.28±15.35 mmol Fe<sup>2+</sup>/g at their highest concentration, respectively. None of the wastewaters samples had any effect on *S. aureus*, but *F. vulgare* and *E. billardieri* showed an anti-*E. coli* effect with MIC (166.66 mg/mL) and MBC (333.3 mg/mL).

**Conclusion:** This study was the first research on the biological activity of herbal distillate wastewaters in Iran. The results showed the presence of active compounds and the biological effects of these wastes. It is suggested that more extensive studies be carried out on the antibacterial activities on various gram negative and positive bacteria, as well as the identification of other compounds and biological properties such as cytotoxicity of herbal distillate wastewaters.

**Keywords:** Antibacterial effect, Antioxidant effect, Herbal distillate waste, *In vitro*

**\*Corresponding Author:**

**Email:** Sharafati.reza@gmail.com

**Tel:** 0098 315 5540 021

**Fax:** 0098 315 554 1112

Conflict of Interests: *No*

Feyz, *Journal of Kashan University of Medical Sciences*, August, 2020; Vol. 24, No 3, Pages 312-321

Please cite this article as: Taghizadeh M, Sharafati-Chaleshtori R, Daizadeh H, Akhavantaheri M. Survey on the use of *Eryngium billardieri*, *Citrus aurantium* and *Foeniculum vulgare* distillate wastewaters as a potential source antioxidant and antibacterial. *Feyz* 2020; 24(3): 312-21.

# بررسی استفاده از پسماندهای مایع عرقیات بوقناق، بهارنارنج و رازیانه به عنوان یک منبع بالقوه آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی

محسن تقی‌زاده<sup>۱</sup>، رضا شرافتی چالشتی<sup>۱\*</sup>، حسین دابی‌زاده<sup>۲</sup>، مریم اخوان‌طاهری<sup>۳</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** پسماندهای کارخانجات عرقیات گیاهی به عنوان یک منبع ترکیبات آلی می‌باشند. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی پسماندهای صنعتی عرقیات بوقناق، بهارنارنج و رازیانه در شرایط آزمایشگاهی بود. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، پسماندهای عرقیات بوقناق، بهارنارنج و رازیانه از یک کارخانه تولیدی در کاشان جمع‌آوری شد. پس از فیلترکردن، محلول‌های به دست آمده، خشک و میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به روش رنگ‌سنجی شناسایی شدند. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش احیای آهن و خاصیت ضدباکتریایی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک به روش میکرودیالوژن و دیسک دیفیوژن بررسی شدند.

**نتایج:** نتایج نشان داد بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۱۰۹/۴۶ میلی‌گرم در گرم) و فلاونوئیدی (۱۳/۶ میلی‌گرم در گرم) در پسماند عرق رازیانه بود. بیشترین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز به ترتیب برای رازیانه (۱۲۲۹/۹±۳۰/۴)، بهارنارنج (۶۷۸/۳۹±۱/۳) و بوقناق (۵۴۹/۱۵±۲۸/۳ میلی‌مول Fe<sup>2+</sup> در گرم در بالاترین غلظت آن‌ها بود. هیچ‌کدام از پسماندها بر *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر نداشتند، ولی رازیانه و بوقناق با میزان MIC (۱۶۶/۶۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و MBC (۳۳۳/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اثر ضد *اشریشیا کلی* نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه اولین بررسی در زمینه فعالیت بیولوژیکی پسماندهای عرقیات گیاهی در ایران بود و نتایج حاکی از وجود ترکیبات فعال و اثرات بیولوژیکی این پسماندها بود. پیشنهاد می‌شود مطالعات گسترده‌تری در خصوص ویژگی‌های ضدباکتریایی علیه انواع باکتری‌های گرم منفی و مثبت، همچنین شناسایی سایر ترکیبات و اثرات بیولوژیکی مانند سمیت سلولی این پسماندها صورت گیرد.

**واژگان کلیدی:** اثر ضدباکتریایی، اثر آنتی‌اکسیدانی، پسماند عرقیات گیاهی، شرایط آزمایشگاهی

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۳، مرداد - شهریور ۱۳۹۹، صفحات ۳۲۱-۳۱۲

## مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی و به خصوص عرقیات گیاهی در ایران رو به افزایش بوده است. استفاده از این ترکیبات متنوع به عنوان منابع بالقوه آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی با هدف‌های دارویی، آرایشی، بهداشتی و همچنین کاربردی در صنایع غذایی امری اجتناب‌ناپذیر است. قسمت‌های مختلف گیاهان مانند برگ، ساقه، گل، میوه و ریشه جهت تهیه انواعی از دمنوش‌ها، عرقیات گیاهی و ادویه‌ها استفاده می‌شوند [۱-۳].

تجربه‌های دهه‌های گذشته محققان حاکی از این است که مواد سنتتیک با تمام کارایی مؤثر، می‌تواند اثرات نامطلوب و ناخواسته را ایجاد کند و یکی از دلایلی است که توجه محققان را نسبت به خواص این گیاهان و جایگزینی آن‌ها با مواد شیمیایی جلب نموده است. این گیاهان به دلیل دارا بودن انواعی از ترکیبات شیمیایی به ویژه فنولیک، خواص فارماکولوژیکی متعددی نشان می‌دهند [۴]. تولیدات متنوع فراوری شده و بسته‌بندی شده گیاهان دارویی و معطر، جهت مصارف خرده‌فروشی در سطوح کلان (Mass Market Retailers) در حال گسترش است [۵]. تنها به دلیل این واقعیت که حدود ۸۰ درصد از مردم جهان در کشورهای در حال توسعه هنوز به طب سنتی اعتماد دارند [۶]. نتیجه این فعالیت‌ها افزایش تولید پسماند و فاضلاب این صنعت شده است [۵]. بنابراین برای دولت‌ها و سازمان‌های دوست‌دار محیط زیست، هزینه‌های اقتصادی و زیست‌محیطی ناشی از این پسماندهای جامد و مایع جهت دستیابی و اجرای محیط‌های پایدار بسیار مهم است. یکی از راه‌های ایجاد محیط‌های پایدار، بهبود فرآیندهاست که سبب کاهش تأثیرات منفی بر محیط می‌شوند [۷]. عرقیات گیاهی در صنعت به روش تقطیر با آب تهیه می‌شوند، به طوری که در

۱. مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۲. گروه تحقیق و توسعه، شرکت زرین گلاب کاشان، کاشان، ایران
۳. مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

## \* نشانی نویسنده مسؤله:

کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، گروه تغذیه

تلفن: ۰۹۱۳۱۸۵۰۵۰۳ | دورنویس: ۰۳۱ ۵۵۵۴۱۱۱۲

پست الکترونیک: Sharafati.reza@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۲۳ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۹/۳/۱۲

هنگام تقطیر مواد فرار و اسانس‌های موجود در گیاهان تبخیر شده، سپس در اثر تماس با مبردها (لوله‌هایی که توسط سردکننده‌ها خنک می‌شوند)، تقطیر می‌شوند. مایع به‌دست‌آمده دارای دو فاز می‌باشد که در قسمت بالایی فاز روغنی یا اسانس قرار می‌گیرد و در قسمت زیرین فاز آبی حاوی ترکیبات و مواد معطر محلول در آب باقی می‌ماند که همان عرق گیاهی نامیده می‌شود [۹۸]. در صنعت گلابگیری و عرقیات گیاهی، مواد گیاهی تقطیر شده به‌عنوان یک محصول فرعی (by-product) این صنعت قلمداد می‌شوند و به‌صورت فاضلاب و پسماند دور ریخته می‌شوند که حجم بسیار بالایی دارند. در پسماندها، ترکیبات غیرفرار و محلول در آب باقی می‌مانند. متأسفانه در کشورهای در حال توسعه به موضوع تولید مواد زائد توجهی نمی‌شود که این امر می‌تواند منجر به آلودگی‌های فراوان محیط زیست شود. بنابراین با اتخاذ رویکردهای هدفمند در به‌کارگیری مناسب ترکیبات زائد می‌توان آن‌ها را مدیریت نمود. این مسأله برای یک کارخانه فراوری ترکیبات گیاهان دارویی و معطر مانند کارخانجات تهیه‌کننده عرقیات گیاهی دارای ارزش افزوده زیادی می‌باشد [۱۰۵]. Solimine و همکاران (۲۰۱۶)، مقادیر بالای ترکیبات فلاونوئیدی و اثرات ضدآنزیم تیروزیناز را در پسماند گلاب گزارش دادند [۱۱]. در مطالعه دیگری پسماند ناشی از تقطیر رزماری را، حاوی مقادیر بالای رزماریک اسید با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا نشان دادند [۱۲]. Celano و همکاران (۲۰۱۷) نیز پسماند ناشی از تقطیر گیاهان رزماری، ریحان و مریم گلی را به‌عنوان منابع غنی از ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا معرفی کردند و آن‌ها را به‌عنوان مواد افزودنی در مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی پیشنهاد دادند [۵]. گیاه بوقناق (*Eryngium billardieri*) از خانواده چتریان است و در سرتاسر جهان جهت درمان انواعی از بیماری‌های انتهایی استفاده می‌شود [۱۳]. اعضای جنس *Eryngium* حاوی ترکیبات استیلن، فلاونوئید، کومارین و ساپونین‌ها هستند [۱۴]. از این جنس در درمان انواعی از دردهای مزمن، ادم، التهاب مجاری تنفسی، عفونت‌های ادراری و مارگزیدگی استفاده می‌کنند [۱۳]. در مطالعه‌های گذشته اثرات ضددیابتی و ضدالتهابی عصاره‌های به‌دست آمده از قسمت‌های ریشه و اندام هوایی گیاه بوقناق گزارش شده است [۱۶، ۱۵]. گل‌های درخت نارنج (*Citrus aurantium*) که از جنس (*Citrus*) و خانواده مرکبات (*Rutaceae*) هستند و به آن‌ها بهار نارنج می‌گویند، از معطرترین گل‌های مرکبات و دارای ترکیبات کومارین، فلاونوئیدها و مونوتروپنئیدها می‌باشند. از آن در طب سنتی به‌عنوان آرامش‌بخش، ضدتشنج و برطرف‌کننده تپش قلب

استفاده می‌کنند. همچنین به شکل یک ترکیب آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی به‌عنوان افزودنی غذایی در مدل‌های مختلف غذایی کاربرد دارد [۱۸، ۱۷]. گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، گیاهی است علفی و معطر از تیره جعفری (*Umbelliferae*) که ظاهری شبیه به شوید با گل‌های چتری زردرنگ دارد و دارای مصارف متعدد صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی است. خصوصیات ضداکسایشی و ضد میکروبی آن را مربوط به حضور قندهای احیاکننده، ترکیب‌های فلاونوئیدی، گلیکوزید فلاونول‌ها و به‌خصوص حضور فنیل پروپانئیدها (ترانس - آنتول و استراگول) و هیدروکربن‌های ترپنی اکسیژنه (فنچون) می‌دانند [۱۹]. با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی انواعی از باکتری‌های عامل عفونت و مسمومیت‌های انسان به‌واسطه مصرف نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها، این مقوله به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مشکلات دنیای پزشکی مطرح شده است [۲۱، ۲۰]. مطالعات گذشته نشان‌دهنده مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیژنوز*، *سودوموناس آنروژینوزا*، *سالمونلا* و غیره می‌باشد [۲۲-۲۵]. همچنین مطالعات گذشته خاصیت آنتی‌اکسیدانی انواعی از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی را به روش‌های مختلف نشان داده‌اند [۲۷، ۲۶]. علاوه بر این، اثر ضدباکتریایی آن‌ها علیه *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آنروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیژنوز* نشان داده شده است [۲۸-۳۰]. با توجه به این‌که تاکنون در ایران مطالعه‌ای در زمینه اثرات بیولوژیکی پسماندهای مایع عرقیات گیاهی انجام نشده بود و احتمال دارد ترکیبات مؤثر و فعالیت‌های بالقوه فارماکولوژیکی در آن‌ها وجود داشته باشد، هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی پسماندهای صنعتی عرقیات بوقناق، بهارنارنج و رازیانه در شرایط آزمایشگاهی بود.

#### مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی در زمستان ۱۳۹۷، گیاهان بوقناق (*Eryngium billardieri*)، گل‌های درخت نارنج (*Citrus aurantium*) و رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، به‌ترتیب از استان‌های اصفهان، مازندران و همدان جمع‌آوری و تهیه شدند. این گیاهان توسط واحد تحقیق و توسعه کارخانه زرین گلاب کاشان و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد شهرکرد مورد تأیید قرار گرفتند. قسمت‌های مورد استفاده بوقناق شامل تمام قسمت‌های گیاه به‌جز ریشه، بهارنارنج شامل گلبرگ‌ها و رازیانه شامل بذر بودند. تقطیر گیاهان بوقناق، بهارنارنج و رازیانه به‌ترتیب

به نسبت‌های حدود ۱ به ۲۵، ۱ به ۴۰ و ۱ به ۳۵، آب و گیاه موردنظر در دیگ‌های استیل ضدزنگ صنعتی انجام شد. پس از تقطیر، محصول نهایی عرقیات گیاهی به میزان ۵۰۰ لیتر جمع‌آوری شد. در این تحقیق، مقدار ۲۰ لیتر از هر نمونه پسماند مایع عرقیات گیاهی بوقناق، بهارنارنج و رازیانه پس از تقطیر برداشت و به‌سرعت به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی کاشان منتقل شد. سپس پسماندها با استفاده از کاغذ صافی جهت حذف مواد جامد فیلتر شدند. محلول‌های باقی‌مانده به داخل پتری دیش‌ها منتقل و در فور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد جهت خشک شدن قرار داده شدند. جهت تعیین میزان ترکیبات فنولی از روش رنگ‌سنجی فولین سیوکالتیو استفاده شد [۲۸]. ابتدا محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۶۲/۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ppm از اسید گالیک در محلول ۶۰ درصد متانول تهیه شد. از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به لوله آزمایش منتقل و به آن‌ها ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ درصد واکنش‌گر فولین سیوکالتیو اضافه شد. پس از ۳ الی ۸ دقیقه به آن ۴۰۰ میکرولیتر از محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. در نهایت میزان جذب به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و نمودار استاندارد رسم شد ( $R^2=0/9973$  و  $y=0/1098x-2/5$ ). سپس ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم از عصاره در متانول ۶۰ درصد حل شد و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسید. سایر مراحل طبق روش مذکور انجام شد، با این تفاوت که به‌جای محلول استاندارد ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره اضافه شد و نتایج برحسب میلی‌گرم در گرم عصاره برحسب اسید گالیک گزارش شد. جهت تعیین میزان ترکیبات فلاونوئیدی از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد [۳۱]. محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ppm از کوئرستین در متانول ۶۰ درصد تهیه شد. آن‌گاه ۵۰۰ میکرولیتر از رقت‌ها به لوله‌های آزمایش منتقل و ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. میزان جذب پس از ۳۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری و نمودار استاندارد رسم شد ( $R^2=0/999$  و  $y=0/0064x-0/01$ ). سپس ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم از عصاره در متانول ۶۰ درصد حل شد و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسید. سایر مراحل طبق روش مذکور انجام شد، با این تفاوت که به‌جای محلول استاندارد ۵۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره اضافه شد و نتایج برحسب میلی‌گرم در گرم عصاره برحسب کوئرستین گزارش شد. جهت تعیین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی از روش احیای آهن (Ferric

Reducing Antioxidant Power) استفاده شد [۳۲]. ابتدا معرف FRAP شامل محلول ۲، ۴ و ۶ تری پیریدیل تریازین (TPTZ) ۱۰ میلی‌مولار تهیه‌شده در کلریدریک اسید ۴۰ میلی‌مولار و محلول آبی کلرید آهن ۲۰ میلی‌مولار و بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار به نسبت (۱:۱:۱۰) تهیه شد. به منظور اندازه‌گیری این فعالیت، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به‌دست‌آمده ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه شد و مخلوط حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه و جذب محلول‌ها در ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به همراه ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP) خوانده شد. نتایج به‌صورت میلی‌مول  $Fe^{+2}$  در گرم گیاه خشک گزارش شد. به‌منظور تهیه منحنی استاندارد از محلول آبی  $Fe(II)$  با غلظت در محدوده  $M=200-10$   $\mu$  (۱۰۰  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) استفاده شد ( $y=180/12x-36/035$  و  $R^2=0/999$ ). جهت تعیین فعالیت ضد میکروبی از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* جداشده از نمونه‌های مواد غذایی موجود در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی کاشان استفاده شد. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن *S rRNA* ۲۳ و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های متی‌سیلین، پنی‌سیلین، اگزاسیلین، سفوکستین، کانامایسین، وانکومایسین، تتراسیکلین، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل، آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم، نیتروفورانتوئین، نورفلوکساسین، سفتریاکسون و جنتامایسین و حساس به کوتریموکسازول بود. همچنین *اشریشیا کلی* واجد ژن *ECO*، *STX1*، *STX2* و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، کانامایسین، تتراسیکلین، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل، سفنازیدیم، نورفلوکساسین و جنتامایسین و حساس به نیتروفورانتوئین، نورفلوکساسین و کوتریموکسازول بود. باکتری‌های موردنظر جهت تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند به محیط کشت تریپتیک سوی براث منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل میزان کشندگی باکتری‌ها (MBC) با استفاده از روش میکرودیالوژن اندازه‌گیری گردید. به این صورت که برای هر تست، ۹ چاهک از پلیت الیزا انتخاب شد و به هر کدام ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون براث اضافه شد، سپس ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل لوله ۰/۵ مک‌فارلند به همه چاهک‌ها اضافه نمودیم. سپس به هر کدام از چاهک‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی عصاره‌ها را معادل  $333/33-2/6$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه کردیم. چاهک شماره ۸ صرفاً حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت به‌عنوان کنترل منفی و

SPSS به صورت میانگین، همراه با انحراف معیار گزارش گردید. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون ANOVA و در سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  صورت گرفت.

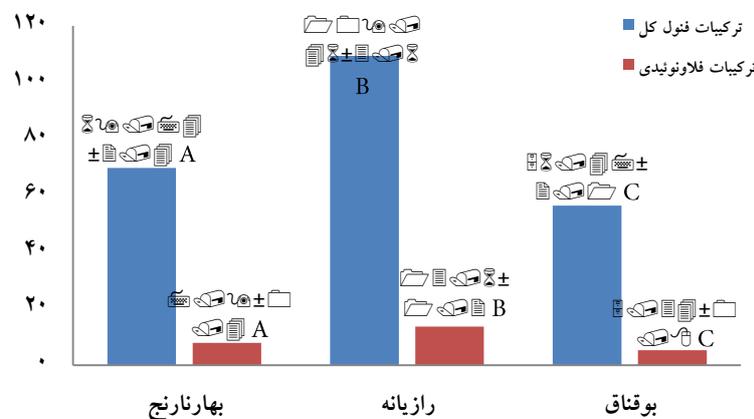
### نتایج

براساس نتایج به دست آمده، بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مربوط به پسماند عرق رازیانه بود که تفاوت معناداری ( $P < 0/05$ ) با پسماند عرقیات بوقناق و بهارنارنج داشت (نمودار شماره ۱). همچنین نمودار شماره ۲ نشان‌دهنده بالاتر بودن میزان قدرت احیاکنندگی آهن توسط پسماند عرق رازیانه در بالاترین غلظت (۳۳۳/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در روش FRAP بود. به طوری که در غلظت ۸۳/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پسماند عرق رازیانه، خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن با غلظت ۱۶۶/۶۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پسماند عرق بوقناق و بهارنارنج حدوداً برابر بود ( $P > 0/05$ ). نتایج نشان داد با افزایش غلظت پسماند عرق گیاهان، خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش یافت. با این وجود، خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نسبت به آنتی‌اکسیدان شیمیایی BHT کمتر بود. خواص ضد میکروبی پسماندهای عرقیات در جدول شماره ۱ قابل مشاهده است. طبق نتایج، هیچ کدام از پسماندها در غلظت‌های مورد استفاده اثری بر روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک نداشتند؛ این در حالی است که هر سه پسماند بر روی باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک اثر مهارکنندگی رشد و اثر کشندگی نشان دادند. بیشترین اثر مربوط به پسماند عرق رازیانه و بوقناق بود.

چاهک شماره ۹ حاوی ۱۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون پرات به اضافه ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. حجم نهایی در تمامی چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. پس از مخلوط کردن نمونه‌ها توسط شیکر (۲۰ ثانیه با دور ۳۰۰ rpm)، آن‌ها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشتیم و چاهک‌ها را از نظر وجود کدورت و یا عدم کدورت مورد بررسی قرار دادیم. رقت چاهک حاوی کمترین غلظت عصاره که باعث جلوگیری از رشد باکتری (عدم ایجاد کدورت) شد، به عنوان میزان حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد باکتری (MIC) تعیین گردید. سپس از نمونه‌های چاهک‌های بدون کدورت بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار پاساز داده و میزان حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) نیز تعیین شد [۲۸]. تعیین حساسیت باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به روش دیسک دیفیوژن انجام گرفت. پس از تهیه غلظت‌های ۴۱/۶۶-۳۳۳/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره‌ها، از هر غلظت ۲۰ میکرولیتر بر روی دیسک‌های بلانک ریخته شد و در زیر هود میکروبی خشک شدند. به عنوان کنترل منفی از دیسک بلانک و برای کنترل مثبت از دیسک کوتریموکسازول (۱۰ میکروگرم) استفاده شد. سپس از سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شده از باکتری‌های مذکور، بر روی محیط کشت مولر هیتون کشت داده شد و دیسک‌های خشک شده توسط پنس در مکان مناسب قرار گرفتند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن میزان قطر هاله عدم رشد توسط کولیس اندازه‌گیری شد [۳۳].

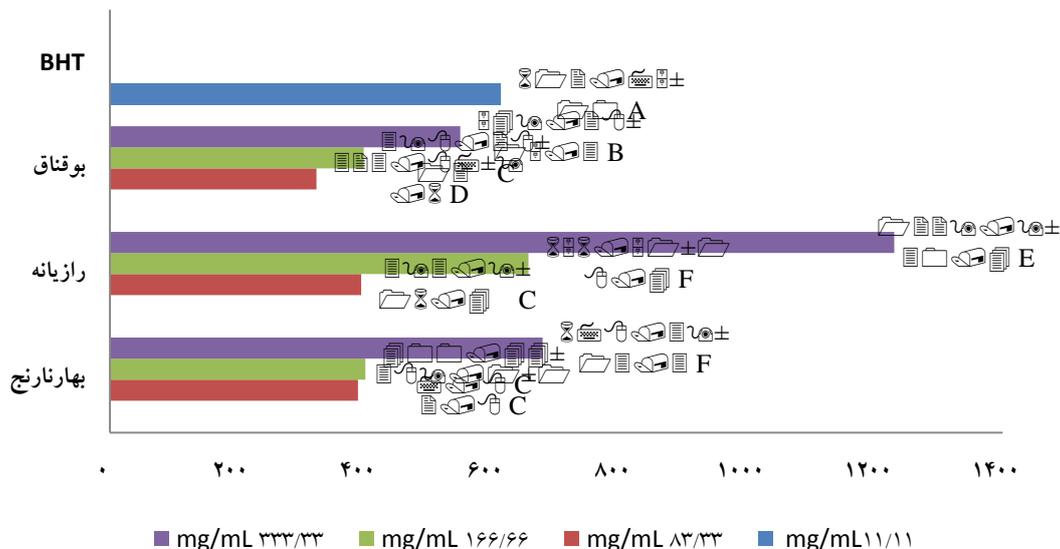
روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج سه بار تکرار آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار ۱۶



نمودار شماره ۱- میزان ترکیبات فنولی کل (برحسب میلی‌گرم در گرم معادل اسید گالیک) و ترکیبات فلاونوئیدی (برحسب میلی‌گرم در گرم معادل کوئرستین) پسماند عرقیات گیاهی

\*حروف نامتشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0/05$  می‌باشد.



نمودار شماره ۲- میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی پسماند عرقیات گیاهی به روش احیای آهن (FRAP) برحسب میلی‌مول  $Fe^{+2}$  در گرم \* حروف نامتشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  می‌باشد.

جدول شماره ۱- اثر ضد میکروبی پسماند عرقیات گیاهی علیه باکتری‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلی

نام ماده ضد میکروبی	استافیلوکوکوس اورئوس		اشیریشیا کلی	
	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)
بهارنارنج	فاقد اثر	فاقد اثر	> ۳۳۳/۳۳	۳۳۳/۳۳
بوقناق	فاقد اثر	فاقد اثر	۳۳۳/۳۳	۱۶۶/۶۶
رازیانه	فاقد اثر	فاقد اثر	۳۳۳/۳۳	۱۶۶/۶۶
کوتریموکسازول (۱۰ میکروگرم)	-	-	-	۱±۲۲ <sup>B</sup>

\* هاله عدم رشد در غلظت ۳۳۳/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. \*\* حروف نامتشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  می‌باشد.

## بحث

میزان‌های کمتری در این پسماندها وجود داشت. به علاوه بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی براساس روش‌های ABTS و DPPH به ترتیب برای پسماند مریم‌گلی، ریحان و رزماری بود [۵]. Pagano و همکاران در سال ۲۰۱۸، اثر انواع استخراج ترکیبات فنولی از پسماندهای تقطیر گیاه ریحان را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها میزان استخراج ترکیبات فنولی را از پسماند ریحان (با محتوای ۲/۰۶ میلی‌گرم در گرم عصاره رزمارینیک اسید) با استفاده از حلال ۷۵ درصد اتانول در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به میزان ۷۵/۸۹ درصد گزارش کردند. همچنین آن‌ها پسماند ریحان را به‌عنوان یک منبع جدید افزودنی به فراورده‌های غذایی، آرایشی و بهداشتی معرفی کردند [۷]. Moisa و همکاران (۲۰۱۸) محتوای ترکیبات فنولیک و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آویشن و پونه را بررسی کردند. آن‌ها میزان ترکیبات فنولی را بین ۲۶۲ تا ۶۹۲۶ میلی‌گرم گالیک اسید در لیتر و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را به روش DPPH برابر ۱/۴ تا ۴ میلی‌مول معادل ترولاکس در لیتر گزارش دادند [۶]. در دو مطالعه مذکور پس از خشک کردن پسماند تقطیراسیون گیاهان با استفاده از حلال‌ها و روش‌های استخراجی متفاوت

با توجه به حجم بالای تولید پسماندهای عرقیات گیاهی در کارخانجات صنعتی و نیمه‌صنعتی و همچنین کارگاه‌های سنتی در سرتاسر ایران، امکان‌سنجی استفاده از این پسماندها ضروری است. این ترکیبات به‌عنوان منابع بالقوه ترکیبات فنولی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی جهت سایر مصارف صنعتی مانند ترکیبات افزودنی در صنایع غذایی و دارویی می‌توانند کاربرد فراوانی داشته باشند. بنابراین بررسی حاضر برای اولین بار در ایران جهت بررسی فعالیت‌های بیولوژیک پسماندهای عرقیات گیاهی صورت گرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده سه نمونه پسماند عرقیات رازیانه، بوقناق و بهارنارنج دارای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نسبتاً بالایی بودند که بیشترین میزان این ترکیبات به ترتیب در پسماند عرق رازیانه، بهارنارنج و بوقناق بودند. در بررسی نشان داده شد که ترکیبات محلول در آب (اسیدهای فنولیک و گلیکوزیدهای فلاونوئیدی) قسمت اعظم ترکیبات مؤثره در پسماند تقطیر گیاهان ریحان، مریم‌گلی و رزماری را تشکیل داده است. همچنین ترکیبات کم‌قطبی مانند دی‌ترین‌های فنولیک به

ترکیبات فنولی شناسایی شدند. در بررسی حاضر آزمایش‌ها به‌طور مستقیم بر روی خشک‌شده پسماندها انجام گرفت. در مطالعه‌ای میزان ترکیبات فنولی دانه رازیانه ۳/۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره هیدروآتانولی بود. همچنین بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH برابر ۹۸/۸۸ درصد گزارش شد [۳۴]. در مطالعه تیموری و همکاران (۲۰۱۸) میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی قسمت‌های مختلف گیاه رازیانه در مراحل مختلف برداشت بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنولی در قسمت گل گیاه با غلظت ۵۳/۵۵ میلی‌گرم در گرم و برگ با غلظت ۳۰/۷۳ میلی‌گرم در گرم در زمان گل‌دهی بود. همچنین در زمان میوه‌دهی بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۲۴/۱۸ میلی‌گرم در گرم) در میوه رازیانه بود. بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی به‌ترتیب در گل (۷/۷۱ میلی‌گرم در گرم) و برگ (۵/۵۵ میلی‌گرم در گرم) رازیانه در زمان‌های میوه‌دهی و رویشی گیاه بود. همچنین بیشترین ترکیب شناسایی‌شده توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) کلروژنیک اسید در برگ رازیانه بود [۳۵]. نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده مقدار بسیار بالاتر ترکیبات فنولی (۱۰۹/۴۶ میلی‌گرم در گرم) و فلاونوئیدی (۱۳/۶ میلی‌گرم در گرم) در پسماندهای عرق رازیانه بود. باقی ماندن این میزان ترکیبات می‌تواند به‌دلیل نوع عصاره‌گیری و روش عرق‌گیری صنعتی باشد. همچنین آن‌ها نشان دادند که در روش آنتی‌اکسیدانی احیای آهن (FRAP) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بین ۰/۰۱ تا ۰/۰۴ میلی‌مول  $Fe^{+2}$  در گرم در زمان‌های مختلف رشد گیاه بود [۳۵]. تفاوت‌هایی که در مطالعات گذشته با نتایج مطالعه حاضر مشاهده می‌شود، می‌تواند ناشی از شرایط متفاوت جغرافیایی، زمان کشت، آب و هوا، قسمت‌های مختلف گیاه، نوع آزمون‌ها و روش‌های استخراج باشد. به‌علاوه یکی از محدودیت‌های بررسی حاضر عدم پایش زمان‌های رویشی گیاهان بود. در مطالعه دیگری بیشترین ترکیبات فنولی را کلروژنیک اسید، کافنیک اسید و 1,5-dicaffeoylquinic acid و ترکیبات فلاونوئیدی را کوئرستین، روتین و آپیجنین گزارش کردند. همچنین عصاره متانولی رازیانه علیه باکتری‌های بیماری‌زای منتقل‌شده از غذا اثر مهاری (MIC بین ۶۲/۵ تا ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) نشان داد [۳۶]. در مطالعه دیگری اثر مهارکنندگی رشد علیه هلیکوباکتر پیلوری عصاره متانولی دانه رازیانه برابر ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داده شد [۳۷]. نتایج مطالعه ما اثرات ضد میکروبی بسیار کمتر پسماند عرق را نشان داد. در مطالعه‌ای ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس گیاه *E. billardieri* شامل  $\alpha$ -muurolene (۴۲ درصد)،  $\beta$ -gurjunene (۱۷ درصد)،  $\delta$ -

cadinene (۶/۲ درصد) و valencene (۵/۶ درصد) بود [۳۸]. در بررسی حاجی مهدی‌پور و همکاران (۲۰۱۶) خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی بوقناق بررسی شد و در روش FRAP برابر ۴۰ میلی‌مول  $Fe^{+2}$  در ۱۰۰ گرم عصاره و در روش DPPH،  $IC_{50}$  برابر ۸۶/۵ گزارش شد [۳۹]. در مطالعه‌ای اثر عصاره هیدرومتانولی *E. maritimum* علیه باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، میکروکوکوس لوتسه اوس، لیستریا مونوسیتوژنز، باسیلوس سرئوس و باکتری‌های گرم منفی سالمونلا، ای. کلای و سودوموناس بررسی شد و اثر ضد میکروبی به‌جز در مورد لیستریا مونوسیتوژنز نشان داده شد. حساس‌ترین باکتری‌ها سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس فلورسنس با MIC به ترتیب برابر ۱ و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند [۴۰]. در مطالعه حاضر نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی پسماند عرق بوقناق و حساسیت بالاتر باکتری گرم منفی ای. کلای نسبت به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده شد. در مطالعه Al Namani و همکاران محتوای فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌های اتانولی بهارنارنج مناطق مختلف عمان به‌ترتیب برابر ۹۶/۵۵ تا ۳۲۲/۵۷ میکروگرم معادل اسید گالیک در گرم عصاره و ۴۱/۳۸ تا ۶۴/۲ میکروگرم معادل کوئرستین در گرم عصاره گزارش شد. همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH برابر ۱۰/۱۱ تا ۵۶/۸۹ درصد در مناطق مختلف متفاوت بود [۴۱]. کریسمی و همکاران (۲۰۱۲) بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی (۴/۵۵ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم عصاره) و فلاونوئیدی (۳/۸۳ میلی‌گرم معادل روتین در گرم عصاره) را در عصاره‌گیری بهارنارنج با حلال متانولی نسبت به عصاره‌گیری با اتانول و آب جوش گزارش کردند [۴۲]. در مطالعه دیگری اثر عصاره استونی بهارنارنج علیه باکتری‌های جداشده از عفونت‌های ادراری بررسی شد. اتروکوکوس فکالیزها ۱۰۰ درصد حساس به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و عصاره بود. ای. کلای‌ها ۱۰۰ درصد حساس به کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید و کاملاً مقاوم به عصاره بودند. همچنین استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین، ۱۰۰ درصد حساس به کوتریموکسازول و ۷۰ درصد حساس به عصاره بودند [۴۳]. در تحقیق حاضر دو باکتری مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک، هر دو به کوتریموکسازول حساس بودند، ولی استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی به‌ترتیب به عصاره مقاوم و حساس بودند. در مطالعات گذشته اثرات ضدباکتریایی و قارچی انواع عصاره‌ها و اسانس‌ها را مربوط به حضور ترکیبات فنولی موجود در آن‌ها می‌دانند [۳۱، ۲۸].

ترکیبات در مدل‌های غذایی و حیوانی صورت پذیرد. به‌علاوه با توجه به تغلیظ پسماند عرقیات لازم می‌باشد که در مطالعات آینده نسبت به سنجش فلزات سنگین در این فرآورده‌ها اقدام گردد.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاری معاونت غذا و دارو و مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک دانشگاه علوم پزشکی کاشان کمال تشکر را دارند.

#### References:

- [1] Mazroui Arani N, Sharafati Chaleshtori R, Rafieian Kopaei M. Microbial quality of some medicinal herbal products in Kashan Iran. *J Herb Med Pharmacol* 2014; 3(2): 113-7.
- [2] Babaeian M, Naseri M, Kamalinejad M, Ghaffari F, Emadi F, Feizi A, et al. Herbal remedies for functional dyspepsia and traditional Iranian medicine perspective. *Iran Red Crescent Med J* 2015; 17(11): e20741.
- [3] Jankowsky L, Brito JO, Jankowsky IP, Nolasco AM, Carvalho J. Use of solid timber waste as potential raw material for novel herbal drugs: multidisciplinary research, development, and innovation. *Mod Appl Pharm Pharmacol* 2017; 1(1): 1-5.
- [4] Soltan Dallal MM, Faraje M, Mirahmadi F. Antibacterial effects of essence of Bene tree fruit on *Clostridium perfringens* in laboratory environment and on meat product. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci* 2019; 24(1): 112-21. [in Persian]
- [5] Celano R, Piccinelli AL, Pagano I, Roscigno G, Campone L, De Falco E, et al. Oil distillation wastewaters from aromatic herbs as new natural source of antioxidant compounds. *Food Res Int* 2017; 99: 298-307.
- [6] Moisa C, Copolovici L, Bungau S, Pop G, Imbrea IL, Lupitu AI, et al. Wastes resulting from aromatic plants distillation-bio-sources of antioxidants and phenolic compounds with biological active principles. *Farmacia* 2018; 66: 289-95.
- [7] Pagano I, Sánchez-Camargo AD, Mendiola JA, Campone L, Cifuentes A, Rastrelli L, et al. Selective extraction of high-value phenolic compounds from distillation wastewater of basil (*Ocimum basilicum* L.) by pressurized liquid extraction. *Electrophoresis* 2018; 39(15): 1884-91.
- [8] Hamedi A, Afifi M, Etemadfard H. Investigating chemical composition and indications of hydrosol soft drinks (aromatic waters) used in Persian folk medicine for women's hormonal and reproductive health conditions. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2017; 22(4): 824-39.
- [9] Hamedi A, Moheimani SM, Sakhteman A, Etemadfard H, Moein M. An overview on

#### نتیجه‌گیری

بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده برای اولسین‌بار در ایران، به‌دلیل محتوی بالای ترکیبات فنولی و اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی پسماندهای عرقیات رازیانه، بوقناق و بهارنارنج می‌توان آن‌ها را به‌عنوان یک منبع بالقوه با فعالیت‌های بیولوژیکی معرفی نمود. بنابراین پیشنهاد می‌گردد مطالعات بیشتری در مورد تعیین مکانیسم و اثرات ضدباکتریایی این ترکیبات و سایر پسماندهای عرقیات دیگر و همچنین اثرات بیولوژیکی دیگر این

indications and chemical composition of aromatic waters (hydrosols) as functional beverages in Persian nutrition culture and folk medicine for hyperlipidemia and cardiovascular conditions. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2017; 22(4): 544-61.

[10] Farzadkia M, Fallah Jokandan S, Yegane Badi M. Compost management in Iran: opportunities and challenges. *J Environ Health Sci Eng* 2015; 2(3): 211-23.

[11] Solimine J, Garo E, Wedler J, Rusanov K, Fertig O, Hamburger M, et al. Tyrosinase inhibitory constituents from a polyphenol enriched fraction of rose oil distillation wastewater. *Fitoterapia* 2016; 108: 13-9.

[12] Wollinger A, Perrin É, Chahboun J, Jeannot V, Touraud D, Kunz W. Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie* 2016; 19(6): 754-65.

[13] Roshanravan N, Asgharian P, Dariushnejad H, Alamdari NM, Mansoori B, Mohammadi A, et al. *Eryngium billardieri* induces apoptosis via bax gene expression in pancreatic cancer cells. *Adv Pharm Bull* 2018; 8(4): 667.

[14] Nabavi SM, Nabavi NS, Ebrahimzadeh MA, Eslami B. In vitro antioxidant activity of *Pyrus Boissieriana*, *Diospyros Lotus*, *Eryngium Caucasicum* and *Froriepia Subpinnata*. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2009; 8(2): 139-50. [in Persian]

[15] Yesilada E, Tanaka S, Tabata M, Sezik E. The anti-inflammatory activity of the fractions from *Eryngium billardieri* in mice. *Phytother Res* 1989; 3(1): 38-40.

[16] Küpeli E, Kartal M, Aslan S, Yesilada E. Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. *J Ethnopharmacol* 2006; 107(1): 32-7.

[17] Suntar I, Khan H, Patel S, Celano R, Rastrelli L. An overview on *Citrus aurantium* L.: Its functions as food ingredient and therapeutic agent. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: doi: 10.1155/2018/7864269.

- [18] Namazi M, Amir Ali Akbari S, Mojab F, Talebi A, Alavi Majd H, Jannesari S. Effects of *Citrus aurantium* (bitter orange) on the severity of first-stage labor pain. *Iran J Pharm Res* 2014; 13(3): 1011-8.
- [19] Mazaheri Kalahrodi M, Bassiri A, Jalali H. Evaluation of antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extract in soybean oil in comparison with synthetic antioxidants BHA and BHT. *Innovative Food Technologies* 2014; 1(3): 15-28. [in Persian]
- [20] Siasi E, Sharifnia F, Yahyayi S. Study and evaluation of Zangaber extract antimicrobial effect on common urinary tract infection bacteria from patients isolated. *New Cell Mol Biotech* 2017; 7(26): 93-100. [in Persian]
- [21] Sharafati-Chaleshtori R, Mardani G, Rafieian-Kopaei M, Sharafati-Chaleshtori A, Drees F. Residues of oxytetracycline in cultured rainbow trout. *Pak J Biol Sci* 2013; 16(21): 1419-22.
- [22] Sharafati Chaleshtori R, Sharafati Chaleshtori F, Karimi A. Antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus strains* isolated from orange and apple juices in Shahre-kord, Iran. *Pak J Med Sci* 2010; 26(3): 615-8.
- [23] Najim Z, Kakako SL, Ochei J, Alkali BR, Mohammed K, Opaluwa SA. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp isolated from diarrhoeic children in selected health centres in Sokoto, Nigeria. *Asian J Infect Dis* 2019; 2(1): 1-8.
- [24] Ramanjeneya S, Sahoo SC, Pathak R, Kumar M, Vergis J, Malik SVS, et al. Virulence potential, biofilm formation, and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from cattle housed in a particular gaushala (cattle shelter) and organized farm. *Foodborne Pathog Dis* 2019; 16(3): 214-20.
- [25] Amini A, Namvar AE. Antimicrobial resistance pattern and presence of beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients, Babol-Iran. *J Med Bacteriol* 2019; 8(1, 2): 45-50.
- [26] Torres-Martínez R, García-Rodríguez YM, Ríos-Chávez P, Saavedra-Molina A, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A, et al. Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacogn Mag* 2018; 13(Suppl 4): S875-S80.
- [27] Saleh EIMM, Sultana N, Rahim MM, Ahsan MA, Bhuiyan MN, Hossain MN, et al. Chemical composition and pharmacological significance of *Anethum Sowa* L. root. *BMC Complement Altern Med*. 2017; 17(1): doi: 10.1186/s12906-017-1601-y.
- [28] Sharafati Chaleshtori F, Saholi M, Sharafati Chaleshtori R. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of *Bunium persicum*, *Eucalyptus globulus*, and Rose water on multidrug-resistant *Listeria* Species. *J Evid Based Integr Med* 2018; 23(10).
- [29] Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M. Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharm Biol* 2011; 49(9): 893-9.
- [30] Sharafati Chaleshtori R, Rafieian Kopaei M, Salehi E. Bioactivity of *Apium petroselinum* and *Portulaca oleracea* essential oils as natural preservatives. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(3): e20128.
- [31] Babolsar I. Antioxidant activity, total flavonoid and total phenolic contents of extracts taken from aerial parts of *Ballota platyloma* using three different methods: percolation, ultrasonic and polyphenolic fraction. *Feyz* 2016; 20(2): 147-56. [in Persian]
- [32] Kamali M, Khosroyar S, Jalilvand MR. Evaluation of phenolic, flavonoids, anthocyanin contents and antioxidant capacities of different extracts of aerial parts of *Dracocephalum kotschyi*. *J North Khorasan Uni Med Sci* 2014; 6(3): 627-34. [in Persian]
- [33] Mortazavi SH, Azadmard Damirchi S, Sowti M, Mahmudi R, Safaeian F, Moradi Azad S. Antimicrobial effects of ethanolic extract of the hull and the core of *Pistacia Khinjuk* stocks. *Innovative Food Technologies* 2014; 1(4): 81-8. [in Persian]
- [34] Ghorbani M, Aboonajmi M, Ghorbani Javid M, Arabhosseini A. Effect of ultrasound extraction conditions on yield and antioxidant properties of the Fennel seed (*Foeniculum Vulgare*) extract. *Food Sci Technol* 2016; 14(67): 73-63. [in Persian]
- [35] Teimoori-Boghsani Y, Bagherieh-Najjar MB, Mianabadi M. Investigation of phytochemical and antioxidant capacity of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) against gout. *J Med Plants By-product* 2018; 7(1): 59-65.
- [36] Salami M, Rahimmalek M, Ehtemam MH. Inhibitory effect of different fennel (*Foeniculum vulgare*) samples and their phenolic compounds on formation of advanced glycation products and comparison of antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem* 2016; 213: 196-205.
- [37] Mahady GB, Pendland SL, Stoia A, Hamill FA, Fabricant D, Dietz BM, et al. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytother Res* 2005; 19(11): 988-91.
- [38] Sefidkon F, Dabiri M, Alamshahi A. Chemical composition of the essential oil of *Eryngium billardieri* F. Delaroche from Iran. *J Essent Oil Res* 2004; 16(1): 42-3.
- [39] Hajimehdipoor H, Ara L, Moazzeni H, Esmaeili S. Evaluating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of some plants from Kohgiluyeh va Boyerahmad province, Iran. *Res J Pharmacognosy* 2016; 3(4): 1-7.
- [40] Meot-Duros L, Le Floch G, Magné C. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities

of Halophytic species. *J Ethnopharmacol* 2008; 116(2): 258-62.  
[41] Al Namani J, Baqir E, Al Abri A, Al Hubaishi T, Husain A, KHAN SA. Phytochemical screening, phenolic content and antioxidant activity of *Citrus aurantifolia* L. leaves grown in two regions of Oman. *Iran J Pharm Res* 2018; 14(1): 27-34.  
[42] Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Oskoueian

A, Jaafar HZ. Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom. *Molecules* 2012; 17(2): 1203-18.

[43] Dadashi M, Eslami G, Goudarzi H, Fallah F, Hashemi A, Dabiri H, et al. Antibacterial effects of *Citrus aurantium* on bacteria isolated from urinary tract infection. *Res Mol Med* 2015; 3(4): 47-50.