

# اثر ضد میکروبی اسانس بهار نارنج بر تعدادی از ریزاندامگان بیماری‌زا با منشاء غذایی و تعیین ترکیبات شیمیایی، فنل کل، فلاونوئید و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن

بهروز عزیزاده بهبهانی<sup>۱</sup>، فرشته فلاح<sup>۲</sup>، علیرضا وسیعی<sup>۳</sup>، فریده طباطبایی یزدی<sup>۴\*</sup>،  
سیدعلی مرتضوی<sup>۴</sup>

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی،  
ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۱/۱۸)

## چکیده

در این پژوهش، فعالیت ضد میکروبی اسانس بهار نارنج بر ریزاندامگان بیماری‌زای باسیلوس سرئوس، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، سودوموناسائروژینوزا، سالمونلا تیفی و کاندیدا آلبیکنس بررسی شد. ترکیبات شیمیایی، فنل، فلاونوئید کل و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج نیز تعیین گردید. نتایج آزمون‌های فیتوشیمیایی Ferric chloride و Shinoda وجود ترکیبات فنلی، فلاونوئید و فلاونی در اسانس بهار نارنج را تایید نمود. براساس نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی ۱۴ ترکیب در اسانس بهار نارنج شناسایی شد. Linalool با ۲۱/۲۹ درصد ترکیب اصلی اسانس بهار نارنج بود. میزان فنل و فلاونوئید کل در اسانس بهار نارنج به ترتیب برابر با  $0.46 \pm 1.35$  میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک و  $0.50 \pm 2.98$  میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج با روش کاهش ظرفیت رادیکالی و بتاکاروتنلینوئیک اسید به ترتیب برابر با  $0.60 \pm 1.02$  میکروگرم بر میلی‌لیتر و  $0.60/65$  بود. بیشترین و کم‌ترین هاله عدم رشد در غلظت ۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای باکتری‌های لیستریا اینوکوا و سالمونلا تیفی با قطر  $0.66 \pm 1.65$  و  $0.43 \pm 0.98$  میلی‌متر مشاهده شد. رنج غلظت بازدارندگی از رشد اسانس بهار نارنج برای ریزاندامگان بیماری‌زا ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. رنج حداقل غلظت کشندگی اسانس بهار نارنج ۳/۱۲۵ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. براساس نتایج این پژوهش مشخص گردید که اسانس بهار نارنج دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی مناسبی در برابر ریزاندامگان بیماری‌زا بوده، لذا می‌توان از آن در محصولات غذایی بهره برد.

کلید واژگان: بهار نارنج، ریزاندامگان بیماری‌زا، میکروداپلوشن برانث، آزمون‌های فیتوشیمیایی.

## ۱- مقدمه

با وجود پیشرفت‌های اخیر در حوزه صنعت غذا و استفاده از روش‌های جدید و نوین جهت افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی، همچنان امنیت و بهداشتی بودن محصولات غذایی از نظر آلودگی‌های میکروبی (ریزاندامگان عامل عفونت و مسمومیت غذایی) مشکل مهم و حائز اهمیتی است که توجه سازمان‌های نظارتی و استاندارد، تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان مواد غذایی را به خود معطوف کرده است [۱ و ۲].

بیماری‌های ناشی از عفونت و مسمومیت غذایی در اثر مصرف غذاهای آلوده به ریزاندامگان بیماری‌زا چنان وسیع می‌باشد که طبق گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی<sup>۱</sup> (WHO) سالانه حدود ۳۰ درصد مردم را در کشورهای پیشرفته درگیر کرده است. علاوه بر پیامدهای نامطلوب حاصل از فساد میکروبی محصولات غذایی بر سلامت انسان‌ها، زیان‌های اقتصادی ناشی از آن را نیز نمی‌توان از نظر دور داشت. با افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان مواد غذایی از عوارض استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی بر سلامت انسان‌ها (باقی ماندن برخی از مواد شیمیایی با به وجود آمدن سرطان ارتباط مستقیمی دارد)، علاقمندی مصرف‌کنندگان در استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی به ویژه اسانس‌های گیاهی روز به روز در حال افزایش است [۳ و ۴].

از نظر تعداد، پوشش و تنوع گیاهی کشور ایران از محدود کشورهای در سطح جهان می‌باشد که دارای منابع گسترده و بی- نظیری است. استفاده از گیاهان دارویی جهت پیشگیری و درمان بیماری‌ها قدمتی به اندازه طول عمر بشر دارد. استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی ایران نیز یکی از غنی‌ترین و پر سابقه‌ترین طب‌های سنتی در جهان به حساب می‌آید. با وجود تاریخی پر افتخار و درخشان در کشور ایران در زمینه طب سنتی و حضور دانشمندان پرآوازه نام‌آشنایی هم چون ابن سینا، اسماعیل جرجانی و زکریای رازی که خدمات فراوانی به طب سنتی کرده‌اند، امروزه توجه کمی در زمینه استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی وجود دارد. بنابراین مطالعه روی گیاهان دارویی که در مناطق مختلف جهت درمان بیماری‌ها استفاده می‌گردد و

بررسی‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی و بالینی یکی از راه کارهای مناسبی است که می‌توان در این راستا انجام داد [۵ و ۶]. پژوهش‌های متعددی نشان می‌دهد که استفاده از گیاهان و مشتقات آن‌ها با سازوکارهای مختلفی همانند توقف در سنتز پپتیدوگلیکان، آسیب به ساختمان غشایی و یا تغییر در هیدروفوبیسیته غشا سبب آسیب رساندن به ریزاندامگان بیماری‌زا و در نهایت از بین رفتن آن‌ها می‌گردند. از آنجایی که ریزاندامگان بیماری‌زا به دلیل استفاده بیش از حد و بدون تجویز پزشک روز به روز در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی مقاوم می‌گردند یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید و طبیعی لازم و ضروری به نظر می‌رسد [۷].

بهار نارنج با نام علمی *Citrus aurantium* از خانواده مرکبات و بومی ایران است. بهار نارنج از جمله گیاهان دارویی که در طب سنتی ایران به عنوان ضد عفونی کننده، ضد سرفه، ضد نفخ، التیام زخم، محرک سیستم ایمنی، تقویت کننده معده، درمان فراموشی، درمان اضطراب و ضد التهاب استفاده می‌شود. این گیاه عمدتاً در استان‌های گیلان، مازندران، گلستان، کرمان، فارس و خوزستان یافت می‌شود. گیاه نارنج حاوی اسانس روغنی است که سرشار از ترکیبات فنلی است [۸ و ۹]. با توجه به معطر بودن گیاه بهار نارنج از بخش‌های مختلف گیاه می‌توان اسانس استخراج نمود.

به طور کلی اهداف این پژوهش شامل:

- ✓ شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج با دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنجی جرمی؛
- ✓ اندازه‌گیری پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج با روش‌های بتاکاروتنلینوئیک اسید و کاهش ظرفیت رادیکالی؛
- ✓ سنجش فنل کل و فلاونوئید اسانس بهار نارنج با روش‌های رنگ سنجی؛
- ✓ ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس بهار نارنج با روش‌های چاهک آگار، میکرودایلوشن برات (حداقل غلظت بازدارندگی از رشد) و حداقل غلظت کشندگی بر تعدادی از ریزاندامگان بیماری‌زا با منشاء غذایی (باسیلوس سرئوس، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، سودوموناساثرورژینوزا، سالمونلا تیفی و کاندیدا آلبیکنس) بود.

1. World Health Organization

## ۲- مواد و روش ها

## ۲-۱- تهیه مواد شیمیایی و میکروبی

این پژوهش تجربی در ۲ فاز، شامل آنالیزهای شیمیایی و میکروبیولوژیکی اسانس بهار نارنج در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. بخش مربوط به آنالیزهای شیمیایی شامل شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج در آزمایشگاه بیوپالایش زیست محیطی (دانشکده علوم) و سایر آزمون‌های شیمیایی و میکروبیولوژی در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی صنعتی و فناوری‌های نوین (دانشکده کشاورزی)، انجام پذیرفت. مواد شیمیایی و محیط‌های کشت میکروبی شامل: استات پتاسیم، معرف فولین سیوالتو، کلرید آلومینیوم، الکل ۹۶ درصد، بتاکاروتن، سولفات سدیم، توئین ۸۰، معرف تری فنیل تترازیولوم کلراید، کلروفرم، ۲ و ۲ دی فنیل - ۱- پیکریل هیدرازیل، دی متیل سولفوکساید، اسید سولفوریک، لینوتیک اسید، کلرید باریم، نوترینت برات، مولر هیتون برات، مولر هیتون آگار، پوتیتو دکستروز برات و پوتیتو دکستروز آگار با گرید آزمایشگاهی (مرک آلمان و سیگما آلدردیج آمریکا) از شرکت نوآوران زیستی پارسه مشهد خریداری شدند.

## ۲-۲- تهیه و مراحل استخراج اسانس از گیاه

## بهار نارنج

پس از تهیه گیاه و تایید اسم علمی، گیاه بهار نارنج با استفاده از کلونجر و روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد (۳ ساعت عمل اسانس‌گیری). اسانس تهیه شده با سولفات سدیم آبگیری گردید. در نهایت اسانس بهار نارنج در شیشه تیره رنگ استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی منتقل گردید. اسانس بهار نارنج تا زمان انجام آزمون‌های میکروبیولوژی و شیمیایی، در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد [۱۰].

## ۲-۳- آنالیزهای شیمیایی

## ۲-۳-۱- تعیین ترکیبات فیتوشیمیایی (فنل، فلاون و

## فلاونوئید) اسانس بهار نارنج با روش‌های کیفی

ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس بهار نارنج با روش‌های کیفی Ferric chloride (فنل) و Shinoda (فلاون و فلاونوئید)

تعیین گردید. به طور خلاصه در آزمون Ferric chloride ۲ میلی‌لیتر از محلول ۵ درصد کلرید آهن به اسانس بهار نارنج اضافه شد. تشکیل رنگ آبی و سبز نشان دهنده حضور ترکیبات فنلی بود. جهت انجام آزمون Shinoda برای تایید حضور فلاون و فلاونوئید در اسانس بهار نارنج، ۴ میلی‌لیتر متانول ۵۰ درصد به همراه ۲ قطره از اسید کلریدریک اسید به اسانس بهار نارنج اضافه شد. رنگ قرمز نشان دهنده ترکیبات فلاونوئیدی و رنگ نارنجی تایید کننده ترکیباتی فلاونی در اسانس می‌باشد [۱۱].

## ۲-۳-۲- تعیین فنل کل اسانس بهار نارنج

فنل کل اسانس بهار نارنج با استفاده از معرف فولین-سیوالتو و مطابق با روش تاجیک و همکاران (۱۳۹۶)، با اندکی تغییر انجام شد. در این روش ۰/۵ از اسانس بهار نارنج با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف ۱۰ درصد فولین اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. ۲ میلی‌لیتر کرینات سدیم به مخلوط اضافه شد و پس از طی زمان ۹۰ دقیقه جذب نمونه اسانس در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. مقدار فنل کل اسانس بهار نارنج براساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم گزارش گردید [۱۲].

## ۲-۳-۳- تعیین فلاونوئید اسانس بهار نارنج

تعیین فلاونوئید کل اسانس بهار نارنج از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم مطابق با روش چانگ و همکاران (۲۰۰۲)، انجام گردید. به طور خلاصه در این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از اسانس بهار نارنج با ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم مخلوط شده و پس از گذشت ۵ دقیقه به آن ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه شد. در انتها ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به محلول اضافه گردیده و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. مقدار فلاونوئید اسانس ترنج بر حسب میلی‌گرم روتین بر گرم وزن خشک گزارش گردید [۱۳].

## ۲-۳-۴- تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج

برای اندازه‌گیری پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج از ۲ روش ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد با ۲ و ۲ دی فنیل - ۱- پیکریل هیدرازیل و سنجش بتاکاروتنلینوتیک اسید استفاده شد. ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج به روش میزان

گردید. فعال‌سازی و تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد از ریزاندامگان بیماری‌زا با منشاء غذایی، مطابق با روش طالبیورنوسفادرانی و همکاران (۱۳۹۶)، انجام پذیرفت [۱۷]. سوسپانسیون میکروبی مطابق با استاندارد نیم مک فارلند ( $10^4 \times 1/5$  Colony Forming Unit/mL) از ریزاندامگان بیماری‌زا با منشاء غذایی تهیه شد.

#### ۲-۴-۲- چاهک آگار

در روش چاهک آگار، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر با فاصله ۲۰ میلی‌متر توسط انتهای پی‌پیت پاستور بر سطح محیط‌های کشت مولر هیتون آگار و پوتیتو دکستروز آگار ایجاد شد. ته چاهک‌ها به وسیله محیط کشت آگار بسته شد. درون هر یک از چاهک میزان ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس بهار نارنج که توسط فیلتر سرسرنگی (۰/۲۲ میکرونی) استریل شده بود به آرامی ریخته شد. برای هر یک از ریزاندامگان بیماری‌زا با منشاء غذایی مطابق با سوسپانسیون نیم مک فارلند کشت چمنی انجام پذیرفت. پلیت‌ها برای رشد به گرمخانه با دمای ۳۷ (برای باکتری‌ها) و ۲۵ (برای قارچ) درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از طی زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب برای سویه‌های باکتریایی و قارچی، قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر توسط خط‌کش اندازه‌گیری و گزارش شد [۱۸].

#### ۲-۴-۳- میکرودایلوشن برات (حداقل غلظت

#### بازدارندگی از رشد)

در این روش ابتدا یک استوک مادر با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۲ گرم اسانس بهار نارنج در ۱۰ میلی‌لیتر) تهیه گردید. از استوک تهیه شده غلظت‌های متوالی ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های اسانس به درون میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. به هریک از چاهک‌های میکروپلیت ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استاندارد تلقیح شد. میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای برای رشد به گرمخانه با دمای ۳۷ (برای باکتری‌ها) و ۲۵

مهار رادیکال مطابق با روش کارتال و همکاران (۲۰۰۷)، انجام شد. در این روش ۱ میلی‌لیتر از اسانس بهار نارنج با ۱ میلی‌لیتر از محلول رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل  $0.2 \text{ mM}$  در اتانول ۹۵ درصد مخلوط شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب آن در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تهیه نمونه کنترل، به جای اسانس بهار نارنج از آب مقطر استفاده شد. درصد مهارکنندگی رادیکال نمونه اسانس بهار نارنج با توجه به معادله ۱، محاسبه شد:

$$\text{DPPH-RS activity (\%)} = [1 - A_s/A_c] \times 100 \quad (1)$$

در این فرمول  $A_s$  جذب نمونه و  $A_c$  جذب نمونه‌ی کنترل می‌باشد. از محلول اتانول ۹۵ درصد به عنوان شاهد جهت صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد [۱۴]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج به روش بتاکاروتنیلینولیک اسید مطابق با مطالعه داپکیویکوس (۱۹۹۸)، انجام شد. در این روش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان مهار اکسیداسیون لینولیک اسید و جلوگیری از ایجاد ترکیبات فرار و هیدروپراکسیدهای کونژوگه مورد ارزیابی قرار می‌گیرد [۱۵].

#### ۲-۳-۵- شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج

از دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنجی جرمی مدل Finnigan Trace Ms (شرکت سازنده: Thermo) موجود در آزمایشگاه بیوپالایش زیست محیطی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد برای شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج استفاده شد. شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج طبق روش الوزه و همکاران (۲۰۱۲)، انجام گردید [۱۶].

#### ۲-۴-۲- آزمون‌های میکروبی

#### ۲-۴-۱- فعال‌سازی ریزاندامگان بیماری‌زا با منشاء

#### غذایی و تهیه استاندارد مک فارلند

از ۷ سویه میکروبی استاندارد شامل باسیلوس سرئوس، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، سودوموناسائروژینوزا، سالمونلا تیفی و کاندیدا آلبیکنس موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی (دانشکده کشاورزی) استفاده

استخراج شده برابر با ۰/۶۵ درصد وزنی/وزنی بود. نتایج آزمون شناسایی کیفی ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس بهار نارنج در جدول ۱، نشان داده شده است. نتایج آزمون‌های فیتوشیمیایی Ferric chloride و Shinoda وجود ترکیبات فنلی، فلاونوئید و فلاونی در اسانس بهار نارنج را تایید کرد. نتایج اندازه‌گیری ترکیبات فنل کل و فلاونوئید اسانس بهار نارنج در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که، براساس آزمون فولین-سیوکالتو میزان فنل شناسایی شده در اسانس بهار نارنج برابر با  $0.135 \pm 0.046$  میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک بود. میزان فلاونوئید کل شناسایی شده اسانس بهار نارنج با روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم برابر با  $0.50 \pm 0.098$  میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک بود. نتایج اندازه‌گیری پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج به روش‌های بتاکاروتنلینوئیک اسید و کاهش ظرفیت رادیکالی در جدول ۱، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج با روش‌کاهش ظرفیت رادیکالیبر حسب IC<sub>50</sub> برابر با  $0.60 \pm 0.0285$  میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج به روش بتاکاروتنلینوئیک اسید و بر حسب میزان درصد مهار اکسیداسیون برابر با ۶۵/۶۰٪ بود. نتایج آزمون شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس بهار نارنج با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد که، ۱۴ ترکیب در اسانس گیاه بهار نارنج وجود دارد و این ترکیبات در مجموع، ۱۰۰ درصد کل اجزای اسانس را تشکیل داد. در شکل ۱، کروماتوگرام شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس بهار نارنج نشان داده شده است. نتایج نشان داد که، ترکیب اصلی اسانس بهار نارنج، Linalool با مقدار ۲۱/۲۹ درصد بود. سایر ترکیبات اصلی شامل Linalyl anthranilate (۲۰٪)، D-limonene (۱۲/۴۸٪)، E-nerolidol (۱۰/۳۱٪)، Famesol (۸/۶۱٪)، Geranyl acetate (۶/۴۴٪) و  $\beta$ -pinene (۵/۳۵٪) بود.

(برای قارچ) درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از طی زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب برای سویه‌های باکتریایی و قارچی، ۲۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد، به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. چنانچه اسانس بهار نارنج توانسته باشد از رشد سویه میکروبی جلوگیری کند رنگ قرمز ارغوانی یا صورتی تشکیل نمی‌شود. اولین غلظتی که در آن تغییر رنگ مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد تعیین شد [۱۰].

### ۲-۴-۴- حد اقل غلظت کشندگی

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس بهار نارنجاز چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای که در آن تغییر رنگی مشاهده نشد، ۱۰ میکرولیتر در شرایط استریل برداشته و بر سطح محیط کشت مولر هیتون آگار (برای باکتری‌ها) و پوتیتو دکستروز آگار (برای قارچ) کشت انجام گردید. پلیت‌ها برای رشد به گرمخانه با دمای ۳۷ (برای باکتری‌ها) و ۲۵ (برای قارچ) درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از طی زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب برای سویه‌های باکتریایی و قارچی، پلیت‌های میکروبی از نظر رشد مورد بررسی قرار گرفت. اولین پلیتی از غلظت‌های کشت شده از اسانس بهار نارنج که در آن کلنی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد [۱۰].

### ۲-۵- طرح آماری

داده‌های حاصل، به روش آنالیز واریانس یک طرفه، با استفاده از SPSS (Version 18.0, SPSS Inc., Chicago, USA) مورد آنالیز قرار گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از روش چند دامنه‌ای دانکندر سطح احتمال ۵٪ استفاده شد. تمامی آزمون‌ها در ۳ مرتبه یا بیشتر تکرار گردید.

### ۳- نتایج و بحث

نتایج استخراج اسانس روغنی از گیاه بهار نارنج نشان داد که پس از ۳ ساعت تقطیر با آب در دستگاه کلونجر میزان اسانس

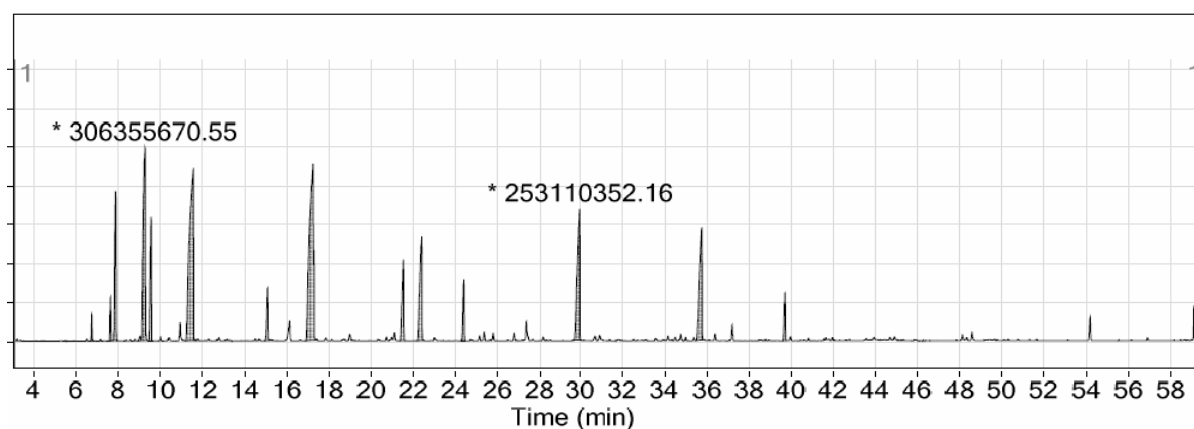
**Table 1** Phytochemical analysis, total phenolic content, total flavonoids content and antioxidant activity of the *Citrus aurantium* essential oil

Chemical	Verification method	Observation	Occurrence
Flavonols	Shinoda test	Orange color	+
Flavonoids	Shinoda test	Red solution	+
Phenolics	Ferric chloride	Green-bluish	++
IC <sub>50</sub>	-	-	102.85 ± 0.60 µg/ml
β-CL	-	-	65.60%
TPC	-	-	41.35 ± 0.46mg GAE/g DM
TFC	-	-	2.98 ± 0.50mg QE/g DM
BHT	-	-	14.45 ± 0.35 µg/ml
Control	-	-	0

+present in small concentrations; ++present in moderately high concentrations; IC<sub>50</sub>, the half maximal inhibitory concentration; β-CL, β-carotene linoleic acid; TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoids content; BHT, butylated hydroxyl toluene; GAE, gallic acid equivalents; QE, Qercetin equivalents; DM, dry matter.

**Table 2.** Chemical compositions of the *Citrus aurantium* essential oil

NO	Compound	Retention time (min)	%
1	1R-α-pinene	6.74	0.55
2	Sabinen	7.62	1.11
3	β-pinene	7.87	5.35
4	D-limonene	9.26	12.48
5	β-ocimene	9.56	4.32
6	Linalool	11.55	21.29
7	α-terpineol	15.09	2.01
8	Linalyl anthranilate	17.22	20
9	Nerol acetate	21.54	3.66
10	Geranyl acetate	22.41	6.44
11	Caryophyllene	24.40	2.21
12	E-nerolidol	29.92	10.31
13	Famesol	35.71	8.61
14	Famesol acetate	39.67	1.66
	Total		100



**Fig 1** The chromatogram of the *Citrus aurantium* essential oil.

اشرشیا کلی، باسیلوس سرئوس و کاندیدا آلبیکنس اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس بهار نارنج بر سویه‌های بیماری‌زا با منشاء غذایی در جدول ۴، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس بهار نارنج برای سویه‌های باسیلوس سرئوس، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، سودوموناسائروژینوزا، سالمونلا تیفی و کاندیدا آلبیکنس به ترتیب ۲۵، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۵۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در شکل ۳، نمایی از حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس بهار نارنج به روش میکروداپلوشن برات بر سویه‌های بیماری‌زا مورد بررسی در پژوهش حاضر نشان داده شده است. نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس بهار نارنج بر سویه‌های بیماری‌زا در جدول ۴، آورده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت کشندگی اسانس بهار نارنج برابر یا بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس بهار نارنج بود، به طوریکه حداقل غلظت کشندگی اسانس بهار نارنج برای سویه‌های باسیلوس سرئوس، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، سودوموناسائروژینوزا، سالمونلا تیفی و کاندیدا آلبیکنس به ترتیب ۵۰، ۳/۱۲۵، ۱۲/۵، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

نتایج ارزیابی اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی اسانس بهار نارنج به روش چاهک آگار بر سویه‌های بیماری‌زا با منشاء غذایی در جدول ۳، آورده شده است. همانگونه که در جدول ۳، مشخص است اثر ضدمیکروبی اسانس بهار نارنج بر سویه‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس، لیستریا اینوکوا و استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با سویه‌های گرم منفی اشرشیا کلی، سودوموناسائروژینوزا و سالمونلا تیفی بیشتر بود. نتایج نشان داد قطر هاله بازدارندگی اسانس بهار نارنج با افزایش غلظت از ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تا ۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش یافت. بیشترین قطر عدم رشد در غلظت ۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری لیستریا اینوکوا با قطر هاله  $16/50 \pm 0/66$  میلی‌متر مشاهده شد. کم‌ترین قطر هاله عدم رشد نیز در غلظت ۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به باکتری سالمونلا تیفی  $9/80 \pm 0/43$  مشاهده گردید. در شکل ۲، نمایی از قطر هاله بازدارندگی اسانس بهار نارنج بر سویه‌های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده شده است. نتایج آماری آزمون چاهک آگار نشان داد که، میان تمامی غلظت‌های مورد بررسی برای سویه‌های سودوموناسائروژینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری وجود دارد. نتایج نشان داد که میان غلظت‌های ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و همچنین غلظت‌های ۳۵ و ۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای

**Table 3** Mean inhibition zone diameters (mm) of *Citrus aurantium* essential oil on some food-borne pathogens by well diffusion agar (WDA) method

Concentration Microorganism	15 mg/ml	25 mg/ml	35 mg/ml	45 mg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	7.00 ± 0.59 <sup>a</sup>	10.20 ± 0.25 <sup>b</sup>
<i>Escherichia coli</i>	-	7.00 ± 0.59 <sup>a</sup>	8.10 ± 0.43 <sup>a</sup>	11.00 ± 0.64 <sup>b</sup>
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	7.10 ± 0.58 <sup>a</sup>	9.80 ± 0.43 <sup>b</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	7.60 ± 0.70 <sup>a</sup>	8.80 ± 0.66 <sup>a</sup>	12.00 ± 0.50 <sup>b</sup>	14.10 ± 0.85 <sup>c</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.00 ± 0.50 <sup>a</sup>	8.90 ± 0.50 <sup>b</sup>	13.20 ± 0.35 <sup>c</sup>	15.90 ± 0.50 <sup>d</sup>
<i>Listeria innocua</i>	8.80 ± 0.55 <sup>a</sup>	11.50 ± 0.50 <sup>b</sup>	14.40 ± 0.65 <sup>c</sup>	16.80 ± 0.85 <sup>d</sup>
<i>Candida albicans</i>	7.00 ± 0.50 <sup>a</sup>	9.20 ± 0.50 <sup>b</sup>	11.60 ± 0.50 <sup>c</sup>	12.10 ± 0.50 <sup>c</sup>

Values are expressed as mean ± standard deviations,  $n = 3$ ; different letters (a, b, c and d) in each row show significant difference at  $P \leq 0.05$



Fig 2 Inhibition zone diameters of *Citrus aurantium* essential oil on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* at concentration of 25 mg/ml.

Table 4 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) of the *Citrus aurantium* essential oil on some food-borne pathogens

Microorganism	MIC (mg/ml)	MBC/MFC (mg/ml)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	100
<i>Escherichia coli</i>	50	100
<i>Salmonella typhi</i>	100	200
<i>Bacillus cereus</i>	25	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.25	12.5
<i>Listeria innocua</i>	3.125	3.125
<i>Candida albicans</i>	25	50



Fig 3 MIC of the *Citrus aurantium* essential by microdilution broth method.

linalyl acetate (۰/۷۷ تا ۲۴/۷۷٪) و  $\alpha$ -terpineol (۹/۲۹ تا ۱۲/۱۲٪) اجزای اصلی اسانس بهار نارنج می‌باشد. این محققین تفاوت میان میزان ترکیبات شناسایی شده در اسانس بهار نارنج را به تفاوت‌های اکولوژیکی، زمان برداشت، آب و هوا، دمای رشد و ... نسبت دادند [۱۶]. سارو و همکاران (۲۰۱۳)، ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج را مورد شناسایی

هاشمی و همکاران (۱۳۹۳)، ترکیبات شیمیایی برگ گیاه بهار نارنج را شناسایی کردند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که ترکیب Linalool با مقدار ۳۲/۴۱ درصد بیشترین ترکیب اسانس بهار نارنج بود [۱۹]. الوزه و همکاران (۲۰۱۲)، ترکیبات شیمیایی بهار نارنج را در فصل‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران گزارش دادند که، ۳ ترکیب Linalool (۴۳/۲ تا



گزارش کردند [۱۹]. در مطالعه ای که کوپر و واشبورن (۱۹۹۸)، انجام دادند وجود فلاونوئید در عصاره تهیه شده از بهار نارنج تایید شد [۲۵]. الوزه و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتی اکسیدانی بهار نارنج را در فصل‌های مختلف با روش‌های کاهش ظرفیت رادیکالی و رادیکال ABTS اندازه‌گیری کردند. این پژوهشگران گزارش کردند که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج در تمام فصول سال به جز فصل تابستان ضعیف بود. این محققین مقدار پایین ترکیبات فنلی را دلیل اصلی کاهش فعالیت آنتی-اکسیدانی بهار نارنج ذکر نمودند [۱۶]. عمار و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهار نارنج را مورد بررسی قرار دادند. این محققان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهار نارنج را به روش رادیکال ABTS برحسب IC<sub>۵۰</sub> برابر با ۶۷۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند. کریمی و همکاران (۲۰۱۲)، میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره متانولی بهار نارنج را به ترتیب ۴/۵۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک و ۳/۸۳ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک گزارش کردند [۲۳]. مجنون و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج را در مقایسه با بوتیل هیدروکسی آنیزول مورد پژوهش قرار دادند. این پژوهشگران گزارش کردند که قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج کمتر از بوتیل هیدروکسی آنیزول بود. در پژوهش حاضر نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج کمتر از بوتیل هیدروکسی تولون بود [۲۶]. بنامروچه و همکاران (۲۰۱۳)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بهار نارنج به روش بتاکاروتنلینوئیک اسید را ۷۷٪ گزارش کردند. نتایج این پژوهشگران با مطالعه حاضر مطابقت داشت [۲۷]. مولهی و همکاران (۲۰۱۳)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بهار نارنج را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران بهار نارنج منبع خوبی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌باشد، و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بر حسب IC<sub>۵۰</sub> برابر با ۳۰۳/۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. کاروی و مازوئیک (۲۰۱۳)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهار نارنج را در مقایسه با بوتیل هیدروکسی تولون، بوتیل هیدروکسی آنیزیدین و آسکوربیک اسید مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهار نارنج در مقایسه با آنتی-اکسیدانی‌های سنتزی مناسب بوده، در نتیجه این پژوهشگران بهار

قرار دادند. این پژوهشگران ترکیب Linalool را جز اصلی اسانس بهار نارنج گزارش کردند. نتایج این محققان با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت داشت [۲۰]. اژدرزادهو حجتی (۲۰۱۶)، ترکیبات شیمیایی برگ، پوست رسیده و نارس بهار نارنج را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که به ترتیب ۳۹، ۲۱ و ۳۴ ترکیب در اسانس برگ، پوست رسیده و نارس بهار نارنج وجود دارد. ترکیب اصلی در تمامی اسانس‌ها Linalool و Limonene بود [۲۱]. کاروی و مازوئیک (۲۰۱۳)، ترکیبات شیمیایی اسانس بهار نارنج را با دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد شناسایی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که ترکیب Limonene جز اصلی تشکیل دهنده اسانس بود. این محققان وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را در اسانس بهار نارنج تایید کردند [۲۲]. عمار و همکاران (۲۰۱۲)، ترکیبات شیمیایی بهار نارنج را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که Limonene با ۲۷/۵٪ ترکیب اصلی اسانس بهار نارنج بود [۲۳]. دهکوردی و همکاران (۲۰۱۶)، گزارش داد که ترکیب Limonene جز اصلی اسانس بهار نارنج بود [۲۴]. مقایسه نتایج پژوهش حاضر با سایر پژوهش‌های مشابه تا حدود زیادی مشابه بود. در پژوهش حاضر ترکیب Linalool جز اصلی اسانس بهار نارنج بود. این ترکیب مونوترپن اکسیژن دار چه در حالت خالص و چه در زمانی که به صورت ترکیبی باشد دارای فعالیت ضد میکروبی بالایی است. علاوه بر این ترکیباتی مانند  $\alpha$ -pinene، Caryophyllene و  $\beta$ -pinene با وجود اینکه در اسانس بهار نارنج به میزان اندک وجود داشت، اما پژوهش‌های گوناگون نشان می‌دهد که این ترکیبات نیز نقش عمده‌ای در فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های مختلف گیاهان دارد. علت این امر را پژوهشگران مختلف به گروه‌های هیدروکسیل و همچنین اثر سینرژیستی که این ترکیبات با سایر اجزای موجود در اسانس ایجاد می‌کند مرتبط دانسته‌اند [۱۶].

هاشمی و همکاران (۱۳۹۳)، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه بهار نارنج را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که میزان فنل کل اسانس بهار نارنج ۷/۱ میلی‌گرم بر مبنای اسید گالیک بر حسب وزن خشک بود. همچنین این پژوهشگران میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس نارنج را بر حسب EC<sub>۵۰</sub> برابر با ۰/۹۶۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

بودند [۳۰]. اژدرزادهو حجتی (۲۰۱۶)، فعالیت ضد میکروبی برگ، پوست رسیده و نارس بهار نارنج را بر ریزاندامگان بیماری زای باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، شیگلا دیسانتری، سالمونلا تیفی و ساکارومایسس سرویزیه مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که تمامی اسانس های بهار نارنج دارای اثر ضد میکروبی بوده و فعالیت ضد میکروبی بر سویه های گرم مثبت بیشتر از سویه های گرم منفی بود. این محققان استفاده از اسانس بهار نارنج را به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا پیشنهاد کردند [۲۱]. اکثر پژوهشگران دلیل حساس تر بودن باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی را ناشی از اختلاف دیواره سلولی ذکر کرده اند. باکتری های گرم منفی دارای غشا دو لایه بوده، به طوری که لایه پپتیدوگلیکانی باکتری های گرم منفی در فضای پری پلاسمی واقع شده است (حداصل غشای داخلی و غشای خارجی فضایی وجود دارد که به آن فضای پری پلاسمی گفته می شود). آنزیم های مختلفی از جمله فسفاتاز، پروتئازها، پنی سیلیناز و آنزیم های فسفوریله کننده آمینوگلیکوزید قادر هستند ترکیبات و مولکول های وارد شده به فضای پری پلاسمی را تجزیه کنند. در حالی که در باکتری های گرم مثبت چنین فضایی وجود ندارد و مواد ضد میکروبی به راحتی به راحتی می توانند وارد دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی شده و باعث از بین رفتن آن ها گردند. قسمت اعظم ساختمان دیواره سلولی در باکتری های گرم منفی بر خلاف باکتری های گرم مثبت از لیپوپروتئین و لیپوپلی ساکارید تشکیل شده است، در نتیجه می توان مقاومت بالاتر باکتری های گرم منفی نسبت به اسانس ها و عصاره های گیاهی به دلیل غشای فسفولیپیدی خارجی تقریباً غیر قابل نفوذ به ترکیبات چربی دوست نسبت داد [۷ و ۳۱].

#### ۴ - نتیجه گیری

در یک جمع بندی کلی می توان بیان کرد که اسانس بهار نارنج دارای فعالیت ضد میکروبی به مراتب بالاتری بر باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی داشت. وجود ترکیبات فنلی، فلاون و فلاونوئیدی در اسانس بهار نارنج تایید شد. اسانس بهار نارنج دارای ترکیبات متعددی بود که جز اصلی اسانس

نارنج را به عنوان یک منبع جدید آنتی اکسیدانی پیشنهاد دادند [۲۸].

حیدرزاده و همکاران (۱۳۹۶)، فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره عصاره بهار نارنج را بر باکتری های اشرشیا کلی، سودوموناس اثرورینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس به روش های حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که حداقل غلظت کشندگی نانو ذرات نقره عصاره بهار نارنج بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود [۸]. نتایج این مطالعه با پژوهش حاضر همخوانی داشت. الوزه و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت ضد میکروبی اسانس بهار نارنج را با روش های دیسک دیفیوژن و میکرو دیلوشن براث بر تعدادی از سویه های بیماری زا در شرایط برون تنی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی حساس تر بوده و همچنین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کمترین مقاومت را در برابر اسانس بهار نارنج از خود نشان داد. این محققین همچنین گزارش دادند که با توجه به فعالیت ضد میکروبی مناسب بهار نارنج، می توان از این اسانس به عنوان نگهدارنده در صنعت غذا بهره جست [۱۶]. گوپال (۲۰۱۲)، اثر ضد میکروبی عصاره های بهار نارنج را بر تعدادی ریزاندامگان بیماری زا مورد تایید قرار داد [۲۹]. عمار و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت ضد میکروبی اسانس بهار نارنج را به روش چاهک آگار بر تعدادی از ریزاندامگان بیماری زا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران قطر هاله عدم رشد میکروبی اسانس بهار نارنج بر سویه گرم منفی سودوموناس اثرورینوزا را ۱۹ میلی متر ذکر کردند [۲۳]. در پژوهش حاضر قطر مشاهده شده برای باکتری سودوموناس اثرورینوزا ۱۰/۲۰ میلی متر بود. هاشمی و همکاران (۲۰۱۶)، فعالیت ضد میکروبی عصاره بهار نارنج را بر سویه های اشرشیا کلی، سودوموناس اثرورینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که باکتری های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس) نسبت به باکتری های گرم منفی (اشرشیا کلی و سودوموناس اثرورینوزا) حساس تر بودند و در غلظت یکسان از عصاره بهار نارنج دارای قطر هاله عدم رشد بزرگتری

- [5] Haghroalsadat, B.F., Vahidi, A.R., Azimzadeh, M., Kalantar, S.M., Bernard, F., Hokmollahi, F. 2012. Chemical Assessment of Active Ingredients and Anti-oxidant Effects of *Trachyspermum Copticum's* Seeds harvested In Yazd Province. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 11(3): 197-206.
- [6] TabatabaeiYazdi, F., Alizadeh Behbahani, B., HeidariSureshjani, M. 2014. The Comparison of Antimicrobial Effects of Chevil (*Ferulago Angulata*) Extract with a Variety of Common Therapeutic Antibiotics In Vitro. *journal of Arak University of Medical Sciences*, 17 (3): 35-46.
- [7] Alizadeh Behbahani B. 2016. Production of an antimicrobial edible coating based on *Plantago major* seed mucilage in combination with dill and tarragon essential oils: its properties and application in beef. PhD Thesis, Ferdowsi University of Mashhad. 1-176.
- [8] Heydarzadeh, S., and Yaghoubi, H. 2017. Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles by using extract of *Citrus aurantium*. *Razi Journal of Medical Sciences*, 24(4): 9-24.
- [9] Kalani, Z., Emtiazy, M., Lotfi, M., and Dehghan, K. 2015. Comparison of citrus aurantium and oxazepam tablets efficacy on preoperative anxiety in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *The Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 23(3): 1968-1975.
- [10] Alizadeh Behbahani, B., and Shahidi, F. 2019. *Melissa officinalis* essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. *Nutrition and Food Sciences Research*, 6(1): 17-25.
- [11] Vimalkumar, C., Hosagaudar, V., Suja, S., Vilash, V., Krishnakumar, N., and Latha, P. 2014. Comparative preliminary phytochemical analysis of ethanolic extracts of leaves of *oleadioicarb.*, infected with the rust fungus *zaghouaniaoleae* (ej butler) cummins and non-infected plants. *Journal of Pharmacognosy and phytochemistry*, 3(4): 69-72.
- [12] Tajik, S., and Zarinkamar, F. 2017. Evaluation of antioxidant activity and phenolic content from saffron organs (*Crocus sativus*

Linalool با مقدار ۲۱/۲۹٪ بود. نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس بهار نارنج دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کم‌تری نسبت به بوتیل هیدروکسی تولوئنداشت. حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ریزاندامگان بیماری‌زا نسبت به اسانس بهار نارنج به ترتیب لیستریا اینوکوا و سالمونلا تیفی بود. پیشنهاد می‌گردد اثر اسانس بهار نارنج بر سایر ریزاندامگان بیماری‌زا و همچنین آزمون‌های بالینی به صورت گسترده‌تر انجام گیرد تا بتوان از پتانسیل بالقوه اسانس بهار نارنج در صنایع غذایی و داروسازی بهره‌مند شد.

## ۵- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی مصوب با کد ۲/۴۷۳۶۳ در دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

## ۶- منابع

- [1] Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., and Cardinali, A. 2009. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 1(2):131-144.
- [2] Negi, P. S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1): 7-17.
- [3] Lacuna, M. L., Carmona, M. L., Amparado, B. B., Daclan, M. A., and Ranido, L. A. 2013. Antimicrobial activity of supercritical fluid extracts of two Philippine medicinal plants, *Psidium guajava* and *Euphorbia hirta*: Implications to community health. *Advances in Agriculture and Botany*, 5(1): 1-13.
- [4] TabatabaeiYazdi, F., Alizadeh Behbahani, B., Vasiee, A. R., Mortazavi, S. A., Shahidi, F. 2018. Evaluation antioxidant activity, phytochemical constituents and antimicrobial of *Mentha Piperita* essential oil on some infectious and poisonous microorganisms. *Journal of Food Science and Technology*, 15(76):67-76.

- Nutrition and Food Sciences Research, 3(1): 43-50.
- [22] Karoui, I.J., and Marzouk, B. 2013. Characterization of bioactive compounds in tunisian bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMed Research International*, 2013: 1-12.
- [23] Ammar, A. H., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Romdhane, M., and Zagrouba, F. 2012. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus aurantium* L. Flowers essential oil (neroli oil). *Pakistan Journal of Biological Science*, 15(21): 1034-1040.
- [24] Dehkordi, A., Sedaghat, M. M., Vatandoost, H., and Abai, M. R. 2016. Chemical compositions of the peel essential oil of *Citrus aurantium* and its natural larvicidal activity against the malaria vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in comparison with *Citrus paradisi*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 10(4): 577-585.
- [25] Cooper, M., and Washburn, K. 1998. The relationships of body temperature to weight gain, feed consumption, and feed utilization in broilers under heat stress. *Poultry Science*, 77(2): 237-242.
- [26] Majnooni, M.-B., Mansouri, K., Gholivand, M. B., Mostafaie, A., Mohammadi-Motlagh, H.-R., Afnanzade, N.-S., and Piriyaee, M. 2012. Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of *Citrus aurantium*. *African Journal of Biotechnology*, 11(2): 498-503.
- [27] Benamrouche, S., and Madani, K. 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50: 723-730.
- [28] Moulehi, I., Bourgo, S., Ourghemmi, I., and Tounsi, M. S. 2012. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 39: 74-80.
- [29] Gopal, P. V. 2012. Evaluation of antimicrobial activity of *Citrus aurantium* against L.). *Biotechnology Tarbiat Modares University*, 8(3): 127-138.
- [13] Chang C., Yang M., Wen H., Chern J. 2002. Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary calorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10: 178-182.
- [14] Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., and Sokmen, A. 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100(2): 584-589.
- [15] Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., Linssen P. H. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77: 146-140.
- [16] Ellouze, I., Abderrabba, M., Sabaou, N., Mathieu, F., Lebrihi, A., and Bouajila, J. 2012. Season's variation impact on *Citrus aurantium* leaves essential oil: Chemical composition and biological activities. *Journal of Food Science*, 77(9): T173-T180.
- [17] Talebi Varnosfaderani, F., Mohammadi Sichani, M., and Amjad .2017. Antibacterial activity of essential oil and extracts of *Achillea tenuifolia* against pathogenic bacteria. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 11(7): 30-37.
- [18] Attarpouryazdi, M., Kamalinejad, M., and Falvaeikouchak, N. S. 2010. Comparison of antimicrobial effects of *Cucuma longa* extract and selective antibiotics against bacteria isolated from infected burn wounds. *Daneshvar Medicine*, 17(84): 1-10.
- [19] Hashemi, Z., Hojjati, M., and Tahanejad, M. 2015. Evaluation of antioxidant activity of essential oil from *Citrus aurantium* leaf compared with TBHQ in edible oil. *Innovative Food Technologies*, 2(2): 43-57.
- [20] Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K., and Therios, I. 2013. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. Growing in Greece. *Molecules*, 18(9): 10639-10647.
- [21] Azhdarzadeh, F., and Hojjati, M. 2016. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils.

- yoghurt stew during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 36(2):153-161.
- [31] Duffy, C. F., and Power, R. F. 2001. Antioxidant and antimicrobial properties of some chinese plant extracts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(6): 527-529.
- some gram positive and negative bacterial strains. *Pharmacia*, 1(3):107-109.
- [30] Hashemi, S. M. B., Amininezhad, R., Shirzadinezhad, E., Farahani, M., &Yousefabad, S. H. A. 2016. The antimicrobial and antioxidant effects of *Citrus aurantium* flowers extract in traditional

## Antimicrobial effect of *Citrus aurantium* essential oil on some food-borne pathogens and determination of its chemical compounds, total phenolcontent, total flavonoids content and antioxidant potential

Alizadeh Behbahani, B.<sup>1</sup>, Falah, F.<sup>2</sup>, Vasiee, A.<sup>3</sup>, Tabatabaei Yazdi, F.<sup>4\*</sup>, Mortazavi, S. A.<sup>4</sup>

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2. M. Sc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Ph. D Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 2019/02/16 Accepted:2019/04/07)

In this study, the antimicrobial effect of *Citrus aurantium* essential oil was evaluated on *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and *Candida albicans*. The chemical compounds, total phenolcontent, total flavonoids content and antioxidant potential of the essential oil were determined. The results of the phytochemical analyses (Ferric chloride and Shinoda) showed that phenol, flavonoids and flavone existed in the essential oil. Based on gas chromatography–mass spectrometry results, 19 compounds were identified in *Citrus aurantium* essential oil and Linalool (21.29 %) was the major one. The total phenolic content and total flavonoids content of the essential oil were equal to  $41.35 \pm 0.46$  mg GAE/g DM and  $2.98 \pm 0.50$  mg QE/g DM respectively. Based on radical Scavenging and  $\beta$ -carotene linoleic acid, the antioxidant potential of the essential oil was equal to  $102.85 \pm 0.60$   $\mu$ g/ml and 65.60% respectively. The longest and shortest diameters of the inhibition zone at a concentration of 45 mg/ml pertained to *Listeria innocua* ( $16.50 \pm 0.66$  mm) and *Salmonella typhi* ( $9.80 \pm 0.43$  mm) respectively. The minimum inhibitory concentration of the essential oil ranged from 3.125 mg/ml to 100 mg/ml, while its minimum bactericidal/fungicidal concentration ranged from 3.125 mg/ml to 200 mg/ml. Based on the present research, the antioxidant potential and antimicrobial activity of *Citrus aurantium* essential oil were tested on several food-borne pathogens; thus, it can be used in food products.

**Keywords:** *Citrus aurantium*, Pathogenic microorganisms, Microdilution broth, Phytochemical analysis.

\* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir