

Original Article

Identification of Chemical Compounds, Antioxidant Activity, and Antimicrobial Effect of *Elettaria cardamomum* Essential Oil on a Number of Pathogenic Microorganisms in Vitro

Mohammad Noshad^{*1} , Behrooz Alizadeh Behbahani¹ 

¹Department of Food Science & Technology, School of Animal Science & Food Technology, Agricultural Sciences & Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Green cardamom with scientific name of *Elettaria cardamomum* belongs to Zingiberaceae family. The purpose of this study was to determine the chemical composition and antioxidant activity and antibacterial effects of *Elettaria cardamomum* essential oil on some pathogenic microorganisms *in vitro*.

Methods: In this experimental study, first, *Elettaria cardamomum* essential oil was extracted using hydrodistillation method by cleverger. Then, its chemical composition, were identified by gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. Antioxidant activity of the essential oil, was evaluated based on the percentage of free radical inhibitory activity. The antimicrobial activity of *Elettaria cardamomum* essential oil was tested by disc diffusion, well diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) methods. Data analysis was carried out using analysis of variance (ANOVA) test.

Results: In this research, 23 compounds, were identified in *Elettaria cardamomum* essential oil. The major compound of the essential oil was Eucalyptol (31.51%) and the Antioxidant activity of *Elettaria cardamomum* essential oil, was obtained to be 43%±0.67. The MIC of *Elettaria cardamomum* essential oil ranged from 4 to 32mg/ml, depending on the type of bacteria (Gram positive or Gram negative). The results of the disc diffusion and well diffusion tests showed that the maximum inhibition zone diameter (IZD) of *Elettaria cardamomum* essential oil was for the *Streptococcus pyogenes* and the minimum IZD was for *Enterobacter aerogenes*.

Conclusion: Based on the results of this research, the essential oil of *Elettaria cardamomum* has antioxidant activity and antimicrobial activity against several pathogenic strains. Therefore, further researches are required for clinical application of *Elettaria cardamomum* essential oil.

Keywords: *Elettaria cardamomum*; Essential oil; Chemical compounds; Antioxidants; Anti-infective agents.

DOI: 10.29252/qums.13.2.57

*Corresponding Author:

Mohammad Noshad;
Department of Food Science & Technology, School of Animal Science & Food Technology, Agricultural Sciences & Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

Email:
noshad@ramin.ac.ir

Received: 4 Nov, 2018
Accepted : 21 Jan, 2019

شناسایی ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی اکسیدانی و تأثیر ضد میکروبی اسانس هل سبز بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماریزا در شرایط آزمایشگاهی

محمد نوشاد^{۱*}، بهروز عزیزاده بهبهانی^۱

چکیده

زمینه و هدف: هل سبز با نام علمی *Elettaria cardamomum* متعلق به تیره زنجبیلیان است. این مطالعه با هدف شناسایی ترکیبات شیمیایی، فعالیت و ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی اسانس هل سبز بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماریزا در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ابتدا اسانس هل سبز با روش تقطیر با آب، به وسیله کلونجر اسانس‌گیری شد. ترکیبات شیمیایی اسانس هل سبز با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی شناسایی شد. فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس هل سبز بر اساس درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد تعیین گردید. فعالیت ضد میکروبی اسانس به روش‌های دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر سویه‌های بیماری‌زا تعیین شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در این پژوهش، ۲۳ ترکیب در اسانس هل سبز شناسایی شد. Eucalyptol با ۳۱/۵۳٪ بیشترین ترکیب بود و فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس هل سبز بر اساس درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد برابر با $43 \pm 0/67$ به دست آمد. محدوده حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس هل سبز بین ۳۲-۴ میلی گرم بر میلی لیتر بسته به نوع باکتری (گرم مثبت یا گرم منفی) متفاوت بود. بر اساس نتایج حاصل از آزمون دیسک دیفیوژن و چاهک آگار، بیشترین قطر هاله عدم رشد اسانس هل سبز مربوط به باکتری *استرپتوکوکوس پیورنز* و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری *انتروباکترائورژنز* بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد اسانس هل سبز دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی در برابر سویه‌های بیماری‌زا می‌باشد؛ بنابراین به منظور کاربرد بالینی اسانس هل سبز، انجام مطالعات بیشتر ضروری است.

کلیدواژه‌ها: هل سبز؛ اسانس؛ ترکیبات شیمیایی؛ آنتی اکسیدان‌ها؛ عوامل ضد عفونی.

گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی،
دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی،
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی
خوزستان، ملاتانی، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

محمد نوشاد؛ گروه علوم و مهندسی
صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و
صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و
منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

noshad@ramin.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Noshad M, Alizadeh Behbahani B. Identification of chemical compounds, antioxidant activity, and antimicrobial effect of *elettaria cardamomum* essential oil on a number of pathogenic microorganisms in vitro. *Qom Univ Med Sci J* 2019;13(2):57-69. [Full Text in Persian]

مقدمه

هل سبز با نام علمی *Elettaria cardamomum* متعلق به تیره زنجبیلیان است. هل می تواند به صورت طبیعی و پرورش یافته در مناطق سرد و کوهستانی در زیر سایه درختان رشد کند. از نظر گیاه شناسی، درخت هل دارای ارتفاع ۳۰-۵۰ سانتی متر است. انواع هل شامل: هل سبز، هل سیاه و هل سفید می باشد که نوع سبز آن عطر تندتری دارد. در ایران هل سبز به دلیل دارا بودن عطر تندتر، بیشتر از سایر هل ها مصرف می شود. هل یکی از پرکاربردترین چاشنی های معطر مورد استفاده در بعضی از غذاها، نان ها، شیرینی ها، به خصوص مرباها بوده و از نظر طب سنتی، گرم و خشک است. در طب سنتی ایران استفاده از دانه های هل پس از مصرف وعده های غذایی علاوه بر اینکه موجب هضم و گوارش بهتر غذا می شود می تواند بوی نامطبوع دهان را نیز برطرف کند. مصرف دم کرده هل؛ مفرح، تقویت کننده معده و بادشکن است. استفاده از دمنوش هل در تسکین کولیت، نفخ، سوء هاضمه، حالت تهوع، خستگی و ترشح زیاد اسید معده مؤثر است. از جمله مهم ترین ویژگی ارزشمند هل، جلوگیری از تشکیل خلط در گلو بوده که از نظر مقایسه با داروهای شیمیایی، مصرف دانه های آن اثری همانند داروی اکسپکتورانت دارد و در پاک کردن ترشحات اضافی و خلط از سینوس ها، بینی و سینه مؤثر است. از سایر خواص درمانی هل می توان به کاهش اضطراب و نگرانی، درمان افسردگی، درمان شب ادراری در کودکان و تقویت کلیه ها اشاره کرد (۱-۵). اثر ضد میکروبی هل در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. Kubo و همکاران در سال ۱۹۹۱، با بررسی اثر ضد میکروبی ۱۰ ترکیب هل بر میکروارگانیسم های بیماریزا، اثر ضد میکروبی آن را تأیید کردند (۶). El Malti و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷، در مطالعه ای نشان دادند اسانس هل سبز دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی سویه های بیماریزا می باشد (۷). Kaushik و همکاران در سال ۲۰۱۰، اثر ضد میکروبی عصاره های مختلف هل سبز را بر تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی تأیید کردند (۸). همچنین Husain و همکاران (سال ۲۰۱۴) در مطالعه خود، اثر ضد میکروبی اسانس هل سبز را بر تعدادی از سویه های باکتریایی و قارچی نشان دادند (۱).

اکثر عفونت ها و مسمومیت ها به وسیله باکتری های سودوموناس *Aeromonas*، *Enterobacter*، *Shigella*، *Staphylococcus*، *Listeria*، *Monosaccharomyces* و *Streptococcus* پیورنر ایجاد می شود. سودوموناس *Aeromonas*، باکتری گرم منفی فرصت طلبی است که می تواند باعث عفونت های مجاری ادراری، سیستم تنفسی، التهاب و آماس پوست، عفونت بافت های نرم، عفونت های معده، روده و ... گردد. *Enterobacter*، باکتری گرم منفی از خانواده *Enterobacteriaceae* بوده که می تواند باعث عفونت های رحمی و ادراری شود. *Shigella*، باکتری گرم منفی از خانواده *Enterobacteriaceae* بوده که شایع ترین عامل عفونت دستگاه ادراری است. *Staphylococcus*، *Enterobacter*، باکتری گرم مثبتی است که در ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها؛ از جمله اندوکارتیت، استئومیلت، پنومونی، سندرم شوک توکسیک، کورک و ... نقش دارد. *Streptococcus*، *Enterobacter*، کوکسی گرم مثبت است که می تواند باعث ایجاد بیماری هایی همانند فارنژیت، باد سرخ، سلولیت، زرد زخم و قانقاریا شود (۹-۱۲).

Listeria، *Monosaccharomyces*، باکتری گرم مثبت و عامل بیماری لیستریوز می باشد. این باکتری در موارد اپیدمیک عفونت در افراد مستعد تا ۷۵٪ عامل مرگ و میر است. از آنجایی که باکتری لیستریا *Listeria*، *Monosaccharomyces* از نظر فیزیولوژیکی شبیه به لیستریا *Listeria* بوده و تنها تفاوت در مورد بیماریزا بودن آن ها می باشد؛ لذا در این پژوهش از باکتری لیستریا *Listeria* استفاده شد.

پژوهش حاضر با هدف شناسایی ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی اکسیدانی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس هل سبز بر سویه های سودوموناس *Aeromonas*، *Enterobacter*، *Shigella*، *Staphylococcus*، *Listeria*، *Monosaccharomyces* و *Streptococcus* پیورنر با روش های متنوع کیفی و کمی ضد میکروبی و در نهایت، مقایسه قدرت ضد میکروبی اسانس هل سبز با تعدادی از آنتی بیوتیک های رایج درمانی صورت گرفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی (سال ۱۳۹۷) در آزمایشگاه میکروب شناسی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و

صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. هل سبز بعد از خریداری از بازار، با استفاده از آب سرد به صورت سطحی، شست و شو داده شد و بعد از خشک شدن در دمای اتاق، به وسیله آسیاب آزمایشگاهی پودر گردید.

از روش تقطیر با آب، جهت اسانس گیری هل سبز به وسیله دستگاه کلونجر استفاده شد. مطابق با این روش، هل سبز پودر شده با ترازوی دیجیتالی به میزان ۵۰ گرم به دقت توزین و ۷۵۰ میلی لیتر آب مقطر به دستگاه کلونجر شیشه‌ای (آداک) اضافه شد تا عمل استخراج اسانس انجام گیرد. مدت زمان استخراج اسانس از هل سبز، ۴ ساعت به طول انجامید، لازم به ذکر است بیشترین حجم اسانس استخراجی در همان یک ساعت اول بود. بعد از اتمام اسانس گیری از هل سبز، جداسازی اسانس از سطح آب انجام و به وسیله سولفات سدیم آبیگری و تا انجام آزمون‌های شیمیایی و میکروبیولوژیکی، اسانس استخراج شده در ظروف تمیزی که اطراف آن پوشش فویل آلومینیومی (کاملاً تاریک) پیچیده شده بود در دمای یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شد (۱۳).

جهت شناسایی ترکیبات موجود در اسانس هل سبز، از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنجی جرمی موجود در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد استفاده گردید. میزان ۰/۱ میکرولیتر از اسانس هل سبز به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و برنامه ریزی دمایی ستون (۸۰-۲۲۵ درجه سانتیگراد) برای جداسازی مطابق با روش Husain و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت (۱). در ادامه، درصد ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس هل سبز محاسبه گردید. آلکان‌های نرمال $C_{28} - C_{38}$ ، تحت شرایط یکسان براساس برنامه دمایی اسانس هل سبز، برای محاسبه شاخص بازداری اجزای اسانس به دستگاه تزریق شد. اسانس هل سبز به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنجی جرمی تزریق و طیف جرمی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس به دست آمد. از گاز هلیوم با سرعت ۱/۱ میلی لیتر در دقیقه و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون استفاده شد. در نهایت، اجزای اسانس هل سبز در مقایسه با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه الکترونیک ویلی موجود در نرم افزار و مقایسه با اعداد استاندارد موجود در مراجع شناسایی گردید (۱۴، ۱۵).

اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس هل سبز مطابق با روش نوشاد و همکاران (سال ۱۳۹۷) انجام گرفت (۱۶). در این روش به طور خلاصه، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر حاصل از واکنش رادیکال چربی دوست DPPH با آنتی اکسیدان‌های دهنده هیدروژن، تعیین گردید. سپس براساس معادله ۱، درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد محاسبه شد.

$$\text{DPPH-RS activity (\%)} = [1 - \text{AS/AC}] \times 100$$

در این معادله: As جذب نمونه و Ac جذب نمونه کنترل است. از محلول اتانول ۹۵٪ به عنوان شاهد جهت صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد.

جهت بررسی اثر ضد میکروبی اسانس هل سبز، از سه عدد سویه گرم منفی استاندارد سودوموناس آئروژینوزا، ائروباکتر ائروژنز و اشرشیاکلی، همچنین سه عدد سویه گرم مثبت استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا و استرپتوکوکوس پیوژنز موجود در مجموعه آزمایشگاه میکروب شناسی استفاده شد. جهت فعال سازی هریک از سویه‌ها، قبل از آزمون‌های ضد میکروبی، کشت ۲۴ ساعته تهیه گردید، سپس جهت تهیه استاندارد میکروبی، طبق استاندارد ۰/۵ مک فارلند در طول موج ۶۲۰ نانومتر (با جذب بین ۰/۱۳-۰/۰۸) اقدام شد. در این حالت استاندارد ۰/۵ مک فارلند، کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی حاوی $1 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ ایجاد می کند (۱۷).

در این مطالعه از چهار روش متنوع ضد میکروبی جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس هل سبز استفاده شد. روش‌های به کاررفته جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس هل سبز به طور خلاصه در زیر آورده شده است:

اولین روش مورد بررسی، روش دیسک دیفیوژن یا انتشار در آگار به کمک دیسک بود. در این روش مطابق با روش انجام شده توسط علیزاده بهبهانی و همکاران در سال ۱۳۹۶ (۱۸)، ابتدا اسانس هل سبز از فیلتر سر سرنگی با قطر منفذ ۰/۲۲ میکروبی عبور داده شد و در ظرف استریل ریخته شد، سپس ۱۰ میکرولیتر از اسانس هل سبز به دیسک‌های بلانک استریل (با قطر ۶ میلی متر) اضافه گردید.

در ادامه، دیسک‌های آغشته به اسانس هل سبز با دقت بر روی پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک آلمان) و باکتری‌های بیماریزا (مطابق با استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند) قرار گرفتند. فاصله دیسک‌ها از دیواره پتری‌دیش، حداقل ۲۰ میلی‌متر و از یکدیگر حداقل ۲۵ میلی‌متر تعیین گردید. در نهایت، هریک از پتری‌دیش‌ها در دمای بهینه رشد باکتری (۳۷ درجه سانتیگراد) به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند، سپس قطر هاله عدم رشد توسط خط‌کش به‌طور دقیق اندازه‌گیری و ثبت گردید. همچنین از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک و نکوماکسین و جنتامایسین به‌منظور مقایسه اثر ضد میکروبی اسانس هل سبز با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی استفاده شد. اصول کلی روش چاهک آگار، مطابق با روش دیسک دیفیوژن بود، با این تفاوت که در این روش اسانس هل سبز درون چاهک‌هایی که به‌وسیله پیت پاستور بر سطح محیط کشت ایجاد شده بودند (با عمق ۶ میلی‌متر) ریخته شد. در نهایت، پتری‌دیش‌های حاوی اسانس هل سبز و باکتری‌های بیماریزا در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری و پس از آن، میزان هاله عدم رشد به‌وسیله خط‌کش اندازه‌گیری و ثبت گردید (۱۹).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد اسانس هل سبز مطابق با روش انجام‌شده توسط کلاهی‌موند در سال ۱۳۹۵ (۲۰) و علیزاده بهبهانی و همکاران در سال ۱۳۹۶ (۱۸) صورت گرفت. در این روش از چاهک ۹۶ خانه‌ای استریل و معرف تری فیل ترازولیوم ۵٪ جهت بررسی رشد میکروارگانیسم‌ها استفاده شد. به‌طور خلاصه، در این مرحله ابتدا یک محلول مادر با غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس هل سبز تهیه گردید، سپس از این محلول، غلظت‌های متوالی با نصف هریک از غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ به دست آمد. در ادامه، به هریک از چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای، ۲۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه‌شده از اسانس هل سبز و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (معادل ۰/۵ مک‌فارلند) اضافه شد. یک خانه به‌عنوان کنترل مثبت (حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی فاقد اسانس) و یک خانه به‌عنوان کنترل منفی (حاوی اسانس و محیط کشت) در نظر گرفته شد. در نهایت، چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای در ب‌گذاری شده و در دمای بهینه، رشد باکتری به مدت

۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از مدت زمان ۲۴ ساعت از گرمخانه‌گذاری، به هریک از خانه‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۲۰ میکرولیتر معرف ۵٪ تری فیل ترازولیوم کلراید اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. اولین خانه‌ای که در آن تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی ایجاد نشد؛ به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس هل سبز یادداشت گردید.

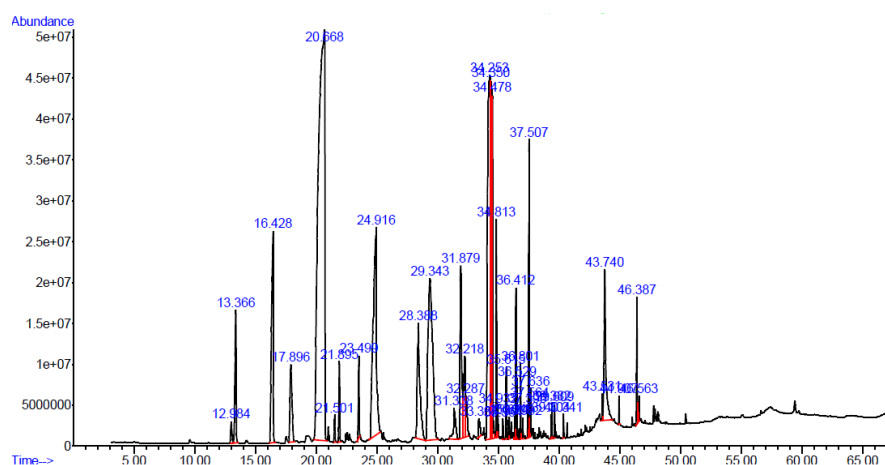
برای تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس هل سبز با توجه به نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (میکروداپلوشن برات و معرف تری فیل ترازولیوم کلراید)، از خانه‌هایی که فاقد رنگ قرمز یا ارغوانی بودند (حداقل غلظت مهارکنندگی به غلظت‌های بالاتر)، ۱۰۰ میکرولیتر بر پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد، سپس محیط‌های کشت گرمخانه‌گذاری شدند. غلظت‌هایی که فاقد رشد میکروارگانیسم بودند به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی برای سویه‌های بیماریزا در نظر گرفته شدند (۱۸، ۲۰). تمامی آزمایش‌ها در سه بار یا بیشتر تکرار شد و از میانگین‌های به‌دست‌آمده برای آنالیزهای آماری استفاده گردید. داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸، آزمون واریانس و دانکن (جهت مقایسه میانگین‌ها)، در سطح معنی‌داری ۵٪ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس هل سبز با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. اعداد مندرج در ستون عمودی کروماتوگرام، فراوانی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس هل سبز و ستون افقی، زمان جداسازی و شناسایی هریک از ترکیبات اسانس را در ستون نشان می‌دهد (نمودار). در این مطالعه، ۲۳ ترکیب از اسانس هل سبز شناسایی گردید که در مجموع، ۹۴/۸۶٪ ترکیبات اسانس را تشکیل می‌داد. ترکیب عمده اسانس هل سبز، Eucalyptol (۳۱/۵۳٪) بود. علاوه بر این، ترکیبات اصلی دیگر شامل: α -Terpinenylacetate (19٪)، α -Terpineol (8/93٪)، Linalool (8/31٪)، Sabinene (4/22٪)، Octadecadienoic acid (3/2٪) و Linalyl acetate (3/08٪) ترکیبات غالب بودند.

جدول شماره ۱: ترکیبات شناسایی شده اسانس هل سبز

ردیف	ترکیب شناسایی شده	درصد
۱	α -Pinene	۱/۹۱
۲	Sabinene	۴/۲۲
۳	β -Myrcene	۱/۸۲
۴	Eucalyptol	۳۱/۵۳
۵	Ocimene	۰/۲۲
۶	γ -Terpinene	۰/۷
۷	α -Terpinolene	۰/۷۲
۸	Linalool	۸/۳۱
۹	α -Terpineol	۸/۹۳
۱۰	Linalyl acetate	۳/۰۸
۱۱	Geraniol	۱/۵۹
۱۲	Citral	۰/۷۴
۱۳	α -Terpinenylacetate	۱۹
۱۴	Camphene	۲/۴۲
۱۵	Geranyl acetate	۱/۱۵
۱۶	Caryophyllene	۱/۰۷
۱۷	Germacrene-D	۰/۳
۱۸	Eudesma	۰/۶۹
۱۹	α -Selinene	۰/۲۶
۲۰	γ -Cadinene	۰/۳
۲۱	Nerolidol	۱/۸۳
۲۲	Octadecadienoic acid	۳/۲
۲۳	Octadecenal	۰/۸۷



نمودار: کروماتوگرام اسانس هل سبز

فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس هل سبز بر اساس درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد برابر با 43 ± 0.67 به دست آمد. نتایج فعالیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن اسانس هل سبز بر باکتری های سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر ائروژنز، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوآ و استرپتوکوکوس پیوژنز در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

جدول شماره ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر) اسانس هل سبز بر سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر ائروژنز، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوآ و استرپتوکوکوس پیوژنز (دیسک دیفیوژن)

ماده ضد میکروبی / باکتری	سودوموناس آئروژینوزا	انتروباکتر ائروژنز	اشرشیاکلی	استافیلوکوکوس اورئوس	لیستریا اینوکوآ	استرپتوکوکوس پیوژنز
اسانس هل سبز	$8/90 \pm 0/45^a$	$8/00 \pm 0/65^a$	$9/30 \pm 0/50^a$	$13/30 \pm 0/52^a$	$14/00 \pm 0/74^a$	$16/70 \pm 0/50^a$
ونکومايسين	-	-	-	$12/50 \pm 0/50^a$	$12/80 \pm 0/55^a$	$18/90 \pm 0/50^b$
جنتامایسین	$15/20 \pm 0/57^b$	$12/00 \pm 0/50^b$	$14/60 \pm 0/50^b$	-	-	-

- حروف غیر مشابه، نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح معنی داری ۰/۵ می باشد.
- حروف مشابه، نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح معنی داری ۰/۵ می باشد.
- (-) آزمون انجام نشد.

باکتری گرم منفی انتروباکتر ائروژنز، بالاترین مقاومت را در برابر اسانس هل سبز از خود نشان داد. همچنین حساس ترین سویه در برابر اسانس هل سبز، باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پیوژنز بود. نتایج فعالیت ضد میکروبی به روش چاهک آگار در جدول شماره ۳ آمده است.

جدول شماره ۳: میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر) اسانس هل سبز بر سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر ائروژنز، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوآ و استرپتوکوکوس پیوژنز (چاهک آگار)

ماده ضد میکروبی / باکتری	سودوموناس آئروژینوزا	انتروباکتر ائروژنز	اشرشیاکلی	استافیلوکوکوس اورئوس	لیستریا اینوکوآ	استرپتوکوکوس پیوژنز
اسانس هل سبز	$10/00 \pm 0/50^a$	$9/10 \pm 0/50^a$	$10/40 \pm 0/35^a$	$15/10 \pm 0/45^a$	$14/70 \pm 0/55^a$	$18/20 \pm 0/50^a$
وانکومايسين	-	-	-	$12/50 \pm 0/50^b$	$12/80 \pm 0/55^b$	$18/90 \pm 0/50^a$
جنتامایسین	$15/20 \pm 0/57^b$	$12/00 \pm 0/50^b$	$14/60 \pm 0/50^b$	-	-	-

- حروف غیر مشابه، نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح معنی داری ۰/۵ می باشد.
- حروف مشابه، نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح معنی داری ۰/۵ می باشد.
- (-) آزمون انجام نشد.

نتایج فعالیت ضد میکروبی به روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی در جدول شماره ۴ آورده شده است. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس سبز برای سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر ائروژنز، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوآ و استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب برابر با 16 ، 32 ، 16 ، 8 و 4 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس هل سبز بر باکتری های مذکور نشان داد به طور کلی حداقل غلظت کشندگی برابر و یا بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی می باشد. همچنین حداقل غلظت کشندگی برای سویه های سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر ائروژنز، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوآ و استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب 32 ، 32 ، 32 ، 16 ، 8 و 4 بود.

جدول شماره ۴: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس هل سبز بر *سودوموناس آنروژینوزا*، *انتروباکتر آنروژنز*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا اینوکوا* و *استرپتوکوکوس پیوژنز*

سویه های باکتریایی	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت کشندگی
<i>سودوموناس آنروژینوزا</i>	۱۶	۳۲
<i>انتروباکتر آنروژنز</i>	۳۲	۳۲
<i>اشرشیا کلی</i>	۱۶	۳۲
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۸	۱۶
<i>لیستریا اینوکوا</i>	۸	۸
<i>استرپتوکوکوس پیوژنز</i>	۴	۴

با میزان ۴۲/۳ و ۲۱/۴٪ می باشد (۲۱).

بحث

با توجه به استفاده از هل سبز در طب سنتی ایران جهت درمان، همچنین مصرف خوراکی این گیاه به عنوان دمنوش و چاشنی غذایی از روزگاران قدیم در بین مردم و پتانسیل دارویی این گیاه، مطالعات بسیار اندکی در زمینه شناسایی ترکیبات اسانس هل سبز، اثر ضد میکروبی و فعالیت آنتی اکسیدانی آن انجام شده است (۵). لذا با توجه به پتانسیل بالای هل سبز جهت درمان بیماری ها، در این پژوهش آزمایشگاهی علاوه بر شناسایی ترکیبات شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی هل سبز، فعالیت ضد میکروبی آن بر شش سویه بیماریزا در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش های متنوع کیفی و کمی صورت گرفت، تا بتوان از نتایج این بررسی تجربی جهت جایگزینی داروهای با منشأ طبیعی برای کنترل و درمان عفونت های باکتریایی که متعاقباً باعث کاهش مصرف داروهای شیمیایی و عوارض ناشی از آن می گردد در صنعت داروسازی و غذایی استفاده کرد.

در مطالعه حاضر نتایج شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس هل سبز با نتایج سایر پژوهش ها تا حدود زیادی همخوانی داشت؛ هر چند میزان ترکیبات شناسایی شده در پژوهش حاضر با سایر مطالعات مشابه دارای تفاوت هایی نیز بود. در مطالعه حاضر ترکیب عمده اسانس هل سبز شامل Eucalyptol (۳۱/۵۳٪) و α -Terpinenylacetate (۱۹٪) بود. در مطالعه ای که توسط Husain و همکاران (سال ۲۰۱۴)، انجام گرفت مشخص گردید از ۲۳ ترکیب شناسایی شده در اسانس هل سبز، Eucalyptol با ۸۵/۲٪، عمده ترین ترکیب شناسایی شده در اسانس هل سبز می باشد (۱). Marongiu و همکاران در سال ۲۰۰۴، گزارش دادند ترکیبات اصلی تشکیل دهنده هل سبز Eucalyptol و R-terpinyl acetate به ترتیب

نتایج مطالعه Abbasipour و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ نشان داد Eucalyptol و α -terpineol، دو ترکیب تشکیل دهنده اسانس هل سبز هستند (۲۲). Olivero-Verbel و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۲۳) و Korikanthimath و همکاران در سال ۱۹۹۹ نیز در مطالعاتی مشابه گزارش دادند Eucalyptol، ترکیب عمده اسانس هل سبز است (۲۴). Kumar و همکاران در سال ۲۰۰۵، ترکیبات شیمیایی دانه هل سبز را شناسایی کردند. این پژوهشگران عنوان کردند Eucalyptol با ۵۶/۸۷ و α -terpinyl acetate با ۱۵/۱۳٪، ترکیبات اصلی اسانس دانه هل سبز را تشکیل می دهند (۲۵). در تمامی این مطالعات، Eucalyptol ماده اصلی تشکیل دهنده اسانس هل سبز بوده است. ترکیبات موجود در اسانس هل سبز نیز مانند سایر اسانس های گیاهی ناشی از تفاوت های اکولوژیکی همانند طول و عرض جغرافیایی، دما، رطوبت، ارتفاع، اقلیم و خاک، مسیرهای متابولیسمی و بیوسنتز مواد مؤثره در این گیاهان بوده که در نتیجه متابولیت های ثانویه متنوعی تحت شرایط محیطی متفاوت، بیوسنتز می شود؛ لذا تفاوت در نوع و درصد ترکیبات تشکیل دهنده در نقاط مختلف دنیا قابل توجه خواهد بود (۱۵).

در نتایج، فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس هل سبز براساس درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد برابر با 43 ± 0.67 به دست آمد. آریانفر و همکاران در سال ۱۳۹۶، فعالیت آنتی اکسیدانی هل سبز و چای سبز را به روش های مهار رادیکال آزاد اندازه گیری کردند و با بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی براساس توانایی احیاکنندگی آهن، آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن و توانایی جلوگیری از اکسیداسیون روغن سویا نشان دادند فعالیت آنتی اکسیدانی چای سبز، بیشتر از هل سبز بوده و در حالت ترکیبی چای سبز و هل سبز فعالیت آنتی اکسیدانی در آزمون مهارکنندگی رادیکال آزاد، اثر هم افزایی دارد (۲۶).

Hinneburg و همکاران در سال ۲۰۰۵، فعالیت آنتی اکسیدانی هل را به همراه تعدادی از گیاهان پختنی و چاشنی غذایی مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد ترکیبات فنلی موجود در هل می تواند نقش به سزایی در فعالیت آنتی اکسیدانی هل داشته باشد (۲۷). Nair و همکاران (سال ۱۹۹۸)، در هندوستان با تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی هل، گزارش کردند سطوح متوسطی از ظرفیت آنتی اکسیدانی در هل وجود دارد. نتایج این مطالعه با یافته های پژوهش حاضر همخوانی داشت (۲۸). Khalaf و همکاران در سال ۲۰۰۸، با بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی هل سبز و تعدادی از گیاهان دارویی، فعالیت آنتی اکسیدانی هل سبز را براساس IC₅₀ (مقداری از آنتی اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به ۵۰٪ مقدار اولیه برسد) گزارش کردند. براساس این پارامتر، فعالیت آنتی اکسیدانی هل سبز برابر با ۶۸۱/۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد که در مقایسه با اسیداسکوربیک (نمونه کنترل) دارای فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری بود (۲۹). Souri و همکاران در سال ۲۰۰۳، فعالیت آنتی اکسیدانی ۲۵ دانه گیاهی مورد استفاده در طب سنتی ایران از جمله هل را براساس درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران گزارش دادند کوئرستین موجود در هل می تواند در فعالیت آنتی اکسیدانی مؤثر باشد. کوئرستین به دلیل داشتن دو گروه هیدروکسیل مجاور باعث افزایش قدرت احیاکنندگی و در نتیجه، افزایش قدرت آنتی اکسیدانی هل می شود (۳۰).

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی اسانس هل سبز نشان داد به طور کلی اسانس هل سبز دارای اثر ضد میکروبی بیشتری بر باکتری های گرم مثبت بوده و در غلظت یکسان، هاله بازدارندگی بزرگتری نسبت به باکتری های گرم منفی از خود نشان می دهد. در مقایسه دو به دو نتایج اثر ضد میکروبی اسانس هل سبز به روش دیسک دیفیوژن با آنتی بیوتیک های ونکومايسين و جنتامایسین، مشخص گردید میان باکتری های گرم منفی (سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر ائروژنز و اشرشیاکلی) با آنتی بیوتیک جنتامایسین اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ وجود دارد. همچنین مقایسه دوتایی اسانس هل سبز بر باکتری های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا و استرپتوکوکوس پیوژنز) با آنتی بیوتیک ونکومايسين نشان داد میان باکتری های

استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا با آنتی بیوتیک ونکومايسين در سطح ۵٪، اختلاف معنی داری وجود ندارد، اما بین باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز و آنتی بیوتیک ونکومايسين در سطح ۵٪، اختلاف معنی داری مشاهده گردید که در نتیجه باکتری گرم منفی انتروباکتر ائروژنز بیشترین مقاومت را در برابر اسانس هل سبز از خود نشان داد و قطر هاله بازدارندگی برای این باکتری در روش دیسک دیفیوژن، ۸ میلی متر بود؛ درحالی که میزان هاله عدم رشد برای باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز (حساس ترین سویه در برابر اسانس هل سبز) ۱۶/۷۰ میلی متر بود.

نتایج اثر ضد میکروبی به روش چاهک آگار نشان داد قطر هاله عدم رشد مشاهده شده برای سویه های مورد بررسی در این پژوهش نسبت به روش دیسک دیفیوژن افزایش یافته است. به طور کلی، کمترین قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار مربوط به باکتری گرم منفی انتروباکتر ائروژنز با قطر ۹/۱۰ میلی متر بوده است. بیشترین هاله عدم رشد برای باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پیوژنز با قطر ۱۸/۲۰ میلی متر به دست آمد. مقایسه آماری نتایج ضد میکروبی اسانس هل سبز به روش چاهک آگار برای باکتری های گرم منفی در مقایسه با آنتی بیوتیک جنتامایسین نشان داد اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ وجود دارد. همچنین براساس آنالیزهای آماری، میان قطر هاله عدم رشد مشاهده شده در روش چاهک آگار در مقایسه با آنتی بیوتیک ونکومايسين برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا، اختلاف معنی داری وجود داشت؛ درحالی که اختلاف معنی داری برای سویه استرپتوکوکوس پیوژنز مشاهده نشد. به طور کلی باکتری های گرم مثبت نسبت به اسانس ها و عصاره های گیاهی حساس تر از باکتری های گرم منفی بوده و در غلظت یکسان از اسانس یا عصاره گیاهی، دارای هاله بازدارندگی بیشتری هستند. محققین فروانی دلیل این امر را به تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتری های گرم منفی نسبت به باکتری های گرم مثبت دانسته اند. شاید بتوان مقاومت بیشتر باکتری های گرم منفی را به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی که تقریباً نسبت به ترکیبات چربی دوست غیر قابل نفوذ است نسبت داد. یافته های به دست آمده از پژوهش حاضر با نتایج مطالعات نوشاد و همکاران (سال ۱۳۹۷) (۱۶)، علیزاده بهبهانی و ایمانی فولادی (سال ۱۳۹۷) (۳۱)،

یگانگی و همکاران (سال ۱۳۹۷) (۳۲) و عزیزاده بهبهانی و همکاران (سال ۱۳۹۶) (۱۵) همخوانی داشت.

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس هل سبز برای باکتری‌های گرم منفی، بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت به دست آمد؛ به طوری که کمترین غلظت مهارکنندگی و کشندگی برای باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* با غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود، درحالی که برای باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژنز* (به عنوان مقاوم ترین سویه نسبت به اسانس هل سبز) حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی، ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. تاکنون مطالعات محدودی در زمینه بررسی اثر ضد میکروبی اسانس هل سبز انجام شده و در پژوهش‌های صورت گرفته نیز از یک یا دو روش ضد میکروبی برای بررسی اثر ضد میکروبی اسانس هل سبز استفاده شده است؛ درحالی که در مطالعه حاضر چهار روش (دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی (میکرو دیلوشن براث) و حداقل غلظت کشندگی) به کار برده شد. در مطالعه‌ای Islam و همکاران (سال ۲۰۱۰)، با بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی هل نشان دادند عصاره هل اثر ضد میکروبی بر سویه‌های بیماری‌زای انسانی دارد (۳۳). Husain و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴، در بررسی اثر ضد میکروبی اسانس هل سبز بر تعدادی از سویه‌های باکتریایی و قارچی، نشان دادند اسانس هل سبز اثر ضد میکروبی بالایی بر تمامی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی داشته است (۱). El Malti و همکاران در سال ۲۰۰۷، با بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس هل سبز بر باکتری‌های باسیلوس سرئوس، لیستریا مونوسیتوزنز، استافیلوکوکوس اورئوس، لاکتوباسیلوس دلبروکی، اشرشیا کلی، شیگلا سونی، سودوموناس ائروژینوزا، سالمونلا انتریتیدیس، کلبسیلا پنومونیه، انتروباکتر کلوآکه، یرسینیا انتروکولیتیکا و گونه‌های پروتئوس به روش حداقل غلظت مهارکنندگی، نشان دادند رنج حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس هل سبز برای سویه‌های بیماری‌زا بین ۲/۳۴-۱۸/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر می‌باشد (۷). مقایسه نتایج این پژوهش با مطالعه حاضر نشان داد حداقل غلظت مهارکنندگی در پژوهش حاضر نسبت به مطالعه El Malti و همکاران (۷)، برای سویه‌های سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیا کلی، انتروباکتر بیشتر بوده است؛

درحالی که میزان حداقل غلظت بازدارندگی برای سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا کمتر بود. دلیل این امر را می‌توان به عواملی همچون شرایط رشد گیاه، طول و عرض جغرافیایی، نحوه استحصال و اسانس گیری و ... نسبت داد (۱۵). Kaushik و همکاران در سال ۲۰۱۰، در بررسی تأثیر ضد میکروبی عصاره‌های مختلف هل سبز بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی مشخص کردند عصاره‌های هل سبز اثر ضد میکروبی بر سویه‌های مورد بررسی دارند و اثر ضد میکروبی عصاره‌های هل سبز در مقایسه با آنتی‌بیوتیک تراسایکلین کمتر بوده است (۸). Kubo و همکاران در سال ۱۹۹۱، اثر ضد میکروبی ۱۰ ترکیب هل را بر ۱۴ میکروارگانیسم بیماری‌زا مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد تمامی این ترکیبات حداقل بر یک میکروارگانیسم اثر بازدارندگی داشته‌اند (۶). براساس نتایج آنالیز شیمیایی اسانس هل سبز مشخص گردید ترکیبات Eucalyptol، α -Terpinenylacetate، α -Terpineol، Linalool و Sabinene، ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس هستند و این ترکیبات به همراه دیگر ترکیبات با ماهیت فنولیک یا گروه هیدروکسیل آزاد همگی به عنوان عوامل ضد میکروبی شناخته شده‌اند. ترکیبات فنلی اسانس در لایه فسفولپید غشای سلول گیاه ساخته شده و هر چقدر میزان مواد این ترکیبات فنلی در اسانس بیشتر باشد اثر ضد میکروبی اسانس نیز بیشتر خواهد بود (۳۴، ۳۵).

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد اسانس هل سبز اثر ضد میکروبی بیشتری بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا و استرپتوکوکوس پیوژنز دارد و هاله عدم رشد ایجاد شده توسط اسانس هل سبز برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا، بیشتر از آنتی‌بیوتیک ونکومايسين می‌باشد؛ درحالی که برای باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز کمتر است. مقایسه نتایج هاله عدم رشد اسانس هل سبز برای باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نشان داد میزان هاله عدم رشد در همه باکتری‌ها کمتر از آنتی‌بیوتیک است؛ لذا پیشنهاد می‌گردد تحقیقات بیشتری بر سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی، همچنین حیوانات آزمایشگاهی

کد ارکید نویسندگان:

Orcid Code: Mohammad Noshad; 0000-0002-4060-9254.

Orcid Code: Behrooz Alizadeh Behbahani; 0000-0002-1447-5088.

انجام گیرد تا دوز مؤثر اسانس جهت کاربرد بالینی و استفاده در صنعت داروسازی مشخص شود تا بتوان از اسانس هل سبز جهت کنترل و درمان بیماری‌های عفونی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تشکر و قدردانی نمایند.

References:

- Husain SS, Ali M. Analysis of volatile oil of the fruits of *Elettaria cardamomum* (L.) Maton and its antimicrobial activity. *World J Pharm Pharm Sci* 2014;3(2):1798-808. Link
- Naghavi M, Sayyed-Alangi Z. Effect of cardamom and dried red pomegranate (*punica granatum*) peel powder on organoleptic and rheological characteristics of cupcake. *Iranian J Nutr Sci Food Technol* 2018;12(4):83-94. [Full Text in Persian] Link
- Ağaoğlu S, Dostbil N, Alemdar S. Antimicrobial effect of seed extract of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). *YÜ Vet Fak Derg* 2006;16(2):99-101. Link
- Rezaei E, Vazini H, Pirestani M. Protective effects of *Elettaria cardamomum* L. hydroalcoholic extract on serum levels of gonadotropins and testosterone in adult male wistar rats induced with Lead acetate. *Jorjani Biomed J* 2017;4(2):21-33. [Full Text in Persian]. Link
- Ghane Z, Vazini H, Pirestani M. Protective effect of hydroalcoholic extract of *Elettaria cardamomum* L. Fruits on serum levels of liver enzymes and morphological changes in lead induced male rats. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2016;26(142):1-13. [Full Text in Persian] Link
- Kubo I, Himejima M, Muroi H. Antimicrobial activity of flavor components of cardamom *Elettaria cardamomum* (Zingiberaceae) seed. *J Agr Food Chem* 1991;39(11):1984-6. Link
- El Malti J, Mountassif D, Amarouch H. Antimicrobial activity of *Elettaria cardamomum*: Toxicity, biochemical and histological studies. *Food Chem* 2007;104(4):1560-8. Link
- Kaushik P, Goyal P, Chauhan A, Chauhan G. In vitro evaluation of antibacterial potential of dry fruit extracts of *Elettaria cardamomum* Maton (Chhoti Elaichi). *Iran J Pharm Res* 2010;9(3):287-92. PubMed
- Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Avicennia marina* extracts on *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* "in vitro". *Iran South Med J* 2014;17(5):879-888. [Full Text in Persian] Link
- Doyle MP, Beuchat LR, Montville T, editors. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. Washington: ASM Press; 2001. Link
- Aguado V, Vitas A, García-Jalón I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *Int J Food Microbiol* 2004;90(3):341-7. PubMed
- Banada PP, Guo S, Bayraktar B, Bae E, Rajwa B, Robinson JP, et al. Optical forward-scattering for detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. *Biosens Bioelectron* 2007;22(8):1664-71. PubMed
- Alizadeh Behbahani B, Imani Fooladi AA. Development of a novel edible coating made by Balangu seed mucilage and Feverfew essential oil and investigation of its effect on the shelf life of beef slices during refrigerated storage through intelligent modeling. *J Food Safe* 2018;38(3):1-16. Link

14. Alizadeh Behbahani B, Imani Fooladi AA. Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities Allium essential oil against the growth of some microbial pathogens. Microb Pathog 2018;114:299-303. PubMed
15. Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with Anethum graveolens essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. Int J Biological Macromol 2017;94(Pt A):515-26. PubMed
16. Noshad M, Hojjati M, Alizadeh Behbahani B. Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. Microb Pathog 2018;116:53-7. PubMed
17. Alizadeh Behbahani B, Yazdi FT, Vasiee A, Mortazavi SA. Oliveria decumbens essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. Microbial Pathog 2018;114:449-52. PubMed
18. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Fakhri S, Mortazavi SA, Mohebbi M. Investigation of chemical compounds and antibacterial activity of tarragon (*Artemisia dracunculus*) essential oil on some pathogenic bacteria in vitro. Qom Univ Med Sci J 2017;11(9):42-51. [Full Text in Persian] Link
19. Alizadeh Behbahani B, Yazdi FT, Shahidi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Principle component analysis (PCA) for investigation of relationship between population dynamics of microbial pathogenesis, chemical and sensory characteristics in beef slices containing Tarragon essential oil. Microb Pathog 2017;105:37-50. PubMed
20. Kolahi Marand S, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Beig Babaei A. Inhibitory and bactericidal effects of artichoke (*Cynara scolymus*) on pathogenic strains and their comparison with antibiotics in vitro. Qom Univ Med Sci J 2016;10(2):32-42. [Full Text in Persian] Link
21. Marongiu B, Piras A, Porcedda S. Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Elettaria cardamomum* (L.) Maton. J Agric Food Chem 2004;52(20):6278-82. PubMed
22. Abbasipour H, Mahmoudvand M, Rastegar F, Hosseinpour MH. Fumigant toxicity and oviposition deterrence of the essential oil from cardamom, *Elettaria cardamomum*, against three stored-product insects. J Insect Sci 2011;11:165. PubMed
23. Olivero-Verbel J, González-Cervera T, Güette-Fernandez J, Jaramillo-Colorado B, Stashenko E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. Revista Brasileira de Farmacognosia 2010;20(4):568-74. Link
24. Korikanthimath V, Mulge R, Zachariah J. Variation in essential oil constituents in high yielding selections of cardamom. J Plant Crops 1999;27(3):230-2. Link
25. Kumar A, Tandon S, Ahmad J, Yadav A, Kahol A. Essential oil composition of seed and fruit coat of *Elettaria cardamomum* from South India. J Essential Oil-Bearing Plants 2005;8(2):204-7. Link
26. Arianfar A, Sardarodiyani M. Investigation of the synergistic and antagonistic properties of green tea and *Elettaria cardamomum* extracts. J Food Sci Technol 2018;17(82):25-36. [Full Text in Persian] Link
27. Hinneburg I, Dorman HD, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food Chem 2006;97(1):122-9. Link
28. Nair S, Nagar R, Gupta R. Antioxidant phenolics and flavonoids in common Indian foods. The J Assoc Physicians India 1998;46(8):708-10. PubMed
29. Khalaf NA, Shakya AK, Al-Othman A, El-Agbar Z, Farah H. Antioxidant activity of some common plants. Turkish J Biol 2008;32(1):51-5. Link
30. Soury E, Farsam H, Hasani M, Azimi Kheirabadi Z. Evaluation of antioxidant activity of 25 plant seeds used in Iranian folk medicine. J Med Plants 2003;4(8):27-34. [Full Text in Persian] Link

31. Alizadeh Behbahani B, Fooladi AAI. Antibacterial activities, phytochemical analysis and chemical composition Makhleseh extracts against the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. Microb Pathog 2018; 114:204-8. PubMed
32. Yeganegi M, Yazdi FT, Mortazavi SA, Asili J, Alizadeh Behbahani B, Beigbabaei A. Equisetum telmateia extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. Microb Pathog 2018;116:62-7. PubMed
33. Islam S, Rahman A, Sheikh MI, Rahman M, Jamal AHM, Alam F. In vitro antibacterial activity of methanol seed extract of elettaria cardamomum (L.) maton. Agr Conspectus Sci 2010;75(3):113-7. Link
34. Singh N, Singh R, Bhunia A, Stroshine R. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing Escherichia coli O157: H7 on lettuce and baby carrots. LWT-Food Sci Technol 2002;35(8):720-9. Link
35. Moreira M, Ponce A, Del Valle C, Roura S. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT-Food Sci Technol 2005;38(5):565-70. Link