بررسی اثر آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی پرمصرف ترین گونه های نعناع در نواحی دریای خزر، ایران

جبلی جوان، ا.[۱*]، احمدی همدانی، م.[۲]، بیانی، م .[۳]، کیخسروی، ک.[۳]، عبدالهی، ز.[۳]، کنعانی، م.[۱].

دریافت: ۱۳۹۳/۴/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۷/۰۵

خلاصه

نعناع سبز و خالواش دو گونه ی شناخته شده از خانواده نعناعیان (لابیاتا) جزو پرمصرف ترین گونه های این خانواده در نواحی دریای خزر هستند و به طور گسترده ای در غذا، طب سنتی و مواد داروئی مورد استفاده قرار می گیرند. این مطالعه به منظور ارزیابی اثر آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره های آبی برگ نعناع سبز و خالواش انجام شد. از روش جوشاندن گیاهان ذکر شده در آب برای تهیه عصاره های آبی استفاده شد. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) این دو عصاره در غلظت های مختلف (۱.۵_ ۱۶ mg/ml)، به روش ماکرودایلوشن تعیین گردید و اثر آنتی اکسیدانی این گیاهان با دو روش سنجش قدرت احیاکنندگی و تعیین ظرفیت فنولی تام سنجیده شد. نتایج نشان داد که عصاره آبی این گیاهان از نظر وجود ترکیبات فنولی غنی بوده و عصاره نعناع سبز با دارا بودن توتال فنول ۰٫۳۹± ۲٫۷۷ میلی گرم گالیک اسید به ازای هر گرم گیاه خشک و قدرت احیاکنندگی با ۰.۰۰۴ ±۰.۰۵ = IC_{50} میلی گرم در هر گرم گیاه خشک، اثر آنتی اکسیدانی بیشتری را نسبت به عصاره خالواش (با توتال فنول۰.۰۶ ± ۰.۲ میلی گرم گالیک اسید به ازای هر گرم گیاه خشک و قدرت احیاکنندگی با ۰.۰۰۹ ± ۰.۱۴ =IC۵۰ میلی گرم در هر گرم گیاه خشک) از خود نشان داد ($p<0.001$). همچنین این دو گیاه اثر ضد باکتریایی خوبی را بر روی دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلای* در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند بدین صورت که MIC نعناع سبز و خالواش در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱۰٫۵ و ۱۴ و در مقابل *اشرشیا کلای* ۱۲ و ۱۰٫۵mg/ml بود. با توجه به نتایج می توان بیان کرد که عصاره های آبی این دو گیاه دارای قدرت آنتی اکسیدانی در مقابل سیستم های اکسیداتیو هستند. علاوه بر این، می توان از آنها به عنوان منابع قابل دسترس و طبیعی آنتی بیوتیکی در مقابل باکتری های بیماریزا به خصوص با منشاء غذایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس واشرشیا کلای* استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: نعناع سبز، خالواش، اثر ضد میکروبی، قدرت آنتی اکسیدانی، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلای*.

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۲ .گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۳. دانشجوی دکترای دامپزشکی (D.V.M) ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

*نویسنده مسؤول: **jebellija@profs.semnan.ac.ir**

مقدمه

میکروارگانیسم ها نقش مهمی در ایجاد بیماری های انسان ایفا می کنند. مرگ و میر ناشی از این عوامل، همواره بشر را بر آن داشته تا به دنبال مقابله با میکروارگانیسم ها باشد و از مهمترین این روش ها استفاده از آنتی بیوتیک ها بوده است. با افزایش تعداد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های گوناگون، ظهور سویه های مقاوم در میان باسیل های گرم منفی و کوکسی های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس و همچنین عوارضی مانند تهوع، استفراغ، اسهال، آسیب کلیوی و واکنش‌های آلرژیک، تلاش های بسیاری برای استفاده از توان بالقوه ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی مانند گیاهان انجام گرفته است (Neu و همکاران، ;۱۹۹۲ زمان،۱۳۷۰)

از آنجایی که گیاهان به سبب سرشت خاص خود ناگزیر به داشتن مکانیسم های دفاعی خاص و ترکیبات ضدمیکروبی به صورت اندوژن می باشند، لذا می توانند منبع بالقوه و عظیمی از ترکیبات ضد میکروبی به حساب آیند. ترکیبات ضد میکروبی بدست آمده از گیاهان می توانند با مکانیسم های متفاوتی نسبت به آنتی بیوتیک ها، باکتری ها را حذف کنند. این مسئله از نظر بالینی در درمان عفونت های ناشی از سویه های مقاوم میکروبی بسیار حائز اهمیت می باشد (Klink و همکاران، ۱۹۹۷).

رادیکال های آزاد، مولکول هایی ناپایدار با واکنش پذیری بسیار بالا بوده که شامل انواع اکسیژن فعال (ROS) و نیتروژن فعال (RNS) می باشند. این مولکول ها با اشکال متفاوتی از جمله آنیون سوپر اکسید، هیدروکسیل، رادیکال های نیتریک اکساید و گونه های غیر رادیکالی مثل پراکسید هیدروژن و نیتروز اکسید دیده می شوند. اشکال مختلف اکسیژن فعال با ایجاد آسیب های سلولی می توانند منجر به جهش در مولکول DNA گردد. رادیکال های آزاد نیز برای پایداری خود به سایر مولکول های بدن حمله می کنند و در نهایت آسیب های سلولی و تشکیل رادیکال های آزاد دیگر به دلیل واکنش های زنجیره ای را به دنبال دارند (Nikkhah و همکاران، ۲۰۰۹). اعتقاد بر این است که اثر اکسیداتیو رادیکال های آزاد و سایر گونه های اکسیژن فعال بر روی ترکیبات سلولی مثل لیپیدها و غشاهای سلولی، می تواند موجب ایجاد تعداد زیادی از بیماری های دژنراتیو مانند بیماری های قلبی، سرطان، التهاب، آرتریت، تضعیف سیستم ایمنی، اشکال در عملکرد مغز و آب مروارید شود (Kay و همکاران، ; Morton۲۰۰۲ و همکاران، ; Parejo ۲۰۰۰ و همکاران،۲۰۰۲).

در مقابل این عوامل، آنتی اکسیدان ها وجود دارند که در غلظت های پایین به طور قابل توجهی اکسیداسیون سوبستراهای قابل اکسید را به تاخیر انداخته یا ممانعت می نمایند (سلمانیان و همکاران ۱۳۹۲). آنتی اکسیدان های سنتزی مانند بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT) و بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول (BHA) با اثر مهاری بر روی رادیکال های پراکسیل، روی زنجیره های کربنی اسیدهای چرب و همچنین رادیکال های آزاد آغازگر اکسیداسیون چربی ها، سال هاست که برای کنترل فساد موادغذایی مورد استفاده قرار می گیرند. با اثبات اثرات زیانبار این نگهدارنده های شیمیایی بر سلامت انسان، توجه محققان و همچنین مردم به سمت استفاده از افزودنی های طبیعی به خصوص با منشا گیاهی جلب شده است (Halliwell و همکاران، ۱۹۹۵).

از بین ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاهی، ترکیبات فنلی، توزیع گسترده ای در بسیاری گیاهان دارند. ویژگی های آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتاً ناشی از قدرت احیاکنندگی و ساختارشیمیایی آنها ست که آنها را قادر به خنثی کردن رادیکال های آزاد و تشکیل کمپلکس با یون های فلزی و خاموش کردن مولکول های اکسیژن یگانه و سه گانه می سازد. ترکیبات فنولی از طریق اهدای الکترون به رادیکال های آزاد، واکنش های اکسیداسیون چربی را مهار می کنند (قادری قهفرخی و همکاران، ۱۳۹۰)

از جمله این گیاهان می توان به خانواده نعناعیان (لابیاته آ) اشاره کرد که تیره بزرگی از گیاهان گل دار بوده و در این تیره طبق آخرین مطالعات انجام شده، در حدود ۴۰۰۰ گونه گیاه وجود دارد که در ۲۰۰ جنس جای داده شده اند. دو نوع نعناع شناخته شده در این خانواده، *M.pulegium* (خالواش) و *M.spicata* (نعناع سبز) می باشند (گلستان و همکاران، ۱۳۹۱). با توجه به بومی بودن گیاه نعناع و خالواش در نواحی دریای خزر، دسترسی آسان، ارزان و استفاده فراوان از این گیاهان از زمان های دور در کشور، این مطالعه به منظور مقایسه ظرفیت آنتی اکسیدانی و اثر ضد میکروبی عصاره های آبی این دو گونه انجام شد. نتایج این تحقیق ضمن مقایسه این دو گیاه می تواند مقدمه ای جهت استفاده عملی از عصاره های این گیاهان در صنایع غذایی باشد تا بدین طریق هم امکان استفاده از یک منبع سهل الوصول و مقرون به صرفه فراهم شود و هم از هدر رفتن محصول و خسارت های ناشی از آن جلوگیری شود و در نهایت گامی جهت اعتلا ی بهداشت و ایمنی غذایی جامعه برداشته شود (سهراب وندی و همکاران، ۱۳۹۱).

مواد و روش کار

گیاهان خالواش و نعناع سبز از استان های شمالی کشور در فصل بهار جمع آوری و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد خشک و به وسیله ی آسیاب برقی پودر شد. جهت تهیه عصاره آبی، ۱۰ گرم از برگ

های خشک و پودر شده گیاهان را همراه با ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر در بالن ریخته و به مدت ۳ ساعت جوشانده شد. پس ازصاف کردن با کاغذ واتمن شماره ۱، عصاره ها تحت شرایط خلاء، خشک و تا زمان استفاده در دمای یخچال (۴ درجه سانتی گراد) نگه داری شدند.

اثر ضدمیکروبی عصاره ها بر روی باکتری *Escherchia coli* PTCC۱۳۳۰ و *Staphylococcus.aureus*ptcc1113 با روش ماکرودایلوشن در محیط کشت BHI براث و مولرهینتون آگار ساخت کارخانه مرک آلمان بررسی شد . و از غلظت میکروبی معادل (۱۰^۵×۵) برای *E .coli* و *S. aureus* استفاده گردید.

تهیه میزان تلقیح باکتری

جهت تهیه میزان تلقیح باکتری از کشت استوک در داخل محیط BHI آگار کشت داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. پس از کشت اول، کشت مجددی در محیط BHI براث داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. از کشت دوم مقادیر مختلفی به داخل لوله کووتی که حاوی ۴cc BHI براث استریل بود منتقل گردید تا جذب نوری۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر بدست آید. سپس با انتقال ۱میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری داخل کووت به لوله ی حاوی ۹میلی لیتر آب پپتونه ۰/۱٪ ، رقت های متوالی تا منفی ۶ تهیه و سپس از طریق انتقال µ۱۰۰l از هر رقت به محیط هاینوترینت آگار، کشت انجام شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری و پس از این مدت، با شمارش تعداد باکتری ها، تعداد آنها در کووت حاوی سوسپانسیون باکتری با جذب نوری معادل ۰/۱ محاسبه شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده به روش ماکرودایلوشن (macrodilution)

جهت انجام آزمایش های کمی برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC=Minimal Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشنده (MBC=Minimal Bacteriocidal Concentration) عصاره ها، غلظت های ۱۵۰۰_۱۶۰۰۰پی پی ا م از عصاره ها در لوله های حاوی 3ml محیط کشت BHI براث استریل ساخته شد.

به کلیه ی لوله ها مقادیر مساوی و مشخص از سوسپانسیون باکتری استاندارد شده (غلظت میکروبی معادل ۵×۱۰^۵) به همراه ۵٪ دی متیل سولفوکساید به عنوان امولسیون کننده اضافه گردید و تمام لوله ها به مدت ۲۴ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد، سپس نتایج بر اساس میزان کدورت مورد بررسی قرار گرفت. آخرین لوله ای که در آن عدم رشد مشاهده شد به عنوان غلظت MIC تعیین شد. جهت تعیین غلظت MBC تمام لوله ها ی بدون کدورت روی محیط جامد مولرهینتون آگار کشت داده شدند و آخرین رقتی که در آن هیچ گونه نشانه ای از رشد باکتری نبود به عنوان MBC باکتری در نظر گرفته شد.

به ازای هر حالت ذکرشده ۳ لوله استفاده شد و کل آزمایش ۳ بار تکرار گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

اندازه گیری مقدار ترکیبات تام فنولی

روش فنول فولین سیوکالتیو از متداول ترین روش های اندازه گیری ترکیبات فنولی می باشد. اساس کار در این روش، احیا معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۲۵ نانومترنشان می دهد. میزان کل ترکیبات فنولی با روش فنول فولین سیوکالتیو اندازه گیری شد. در این روش میزان ۱ میلی لیتر از نمونه (غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) با ۱ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتیو ۱٪ مخلوط شد. بعد از گذشت ۳ دقیقه در دمای اتاق، ۱میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۷,۵ ٪ به آنها افزوده شد. سپس به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق در محل تاریک نگهداری شد و جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر (ساخت انگلستان ،pg instrument) در طول موج ۷۲۵ نانومتر در مقابل blank خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره با استفاده از معادله بدست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج برحسب میلی گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد. آزمایش ها در ۳ تکرار انجام و میانگین آنها گزارش شد (Barros و همکاران، ۲۰۰۷).

۲-۲-قدرت احیاکنندگی

توانایی عصاره ها برای احیا یون های آهن ۳ ظرفیتی با آزمون قدرت احیا کنندگی مورد ارزیابی قرار گرفت، بدین منظور محلول هایی با غلظت ۰,۱-۳,۲ میلی گرم بر میلی لیترتهیه گردید. ۴۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱ میلی لیتر بافر فسفات (PH=7) و ۱ میلی لیتر فروسیانید پتاسیم ۱٪ مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۵۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از افزودن ۱ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ ، نمونه ها ۱۰ دقیقه با دور ۲۲۰۰RPm سانتریفوژ شدند. سپس از محلول بالایی پس از

سانتریفوژ ۱ میلی لیتر برداشته و به لوله دیگری منتقل نموده و ۱ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و پس از اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر از $FeCl_3$، جذب نمونه ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید (عزیز خانی و همکاران ۱۳۹۱).

غلظتی از عصاره که دارای جذب نوری ۰/۵بود (IC_{50}) با استفاده از نمودار و نرم افزار EXCEL محاسبه شد.

تمامی آزمایش ها با سه بار تکرار انجام شده و داده های به دست آمده از تست های آنتی اکسیدانی با استفاده از نرم افزار Sigma Stat (ورژن ۲/۰۳) و تست t-Test با هم مقایسه شدند و سطح معناداری در $p<۰,۰۵$ تعیین شد.

نتایج

اثر ضد باکتریایی

نتایج مربوط به حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) در عصاره آبی نعناع سبز و خالواش در برابر دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که دیده می شود عصاره آبی خالواش به ترتیب با MIC و MBC ۱۰/۵ و ۱۲ mg/kg دارای قدرت ضد باکتریایی بیشتری بر روی باکتری *E. coli* نسبت به عصاره آبی نعناع بود (با MIC و MBC =۱۴ mg/kg)

در ارتباط با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نتایج برعکس بود و عصاره آبی خالواش با MIC ۱۲ mg/kg اثر ضعیف تری نسبت به عصاره ی آبی نعناع (MIC=۱۰/۵ mg/kg) نشان داد.

اثر آنتی اکسیدانی

جدول ۲ ظرفیت فنلی تام و قدرت احیاکنندگی دو عصاره آبی نعناع و خالواش را نشان می دهد. همانگونه که دیده می شود ظرفیت فنلی تام و قدرت احیاکنندگی عصاره آبی نعناع سبز به صورت معناداری ($p<۰/۰۰۱$) بیشتر از عصاره ی آبی خالواش می باشد که حاکی از قدرت آنتی اکسیدانی بالاتر این عصاره می باشد.

بحث

انسان از سال ها پیش از گیاهان دارویی در علم پزشکی و یا به عنوان ادویه در مواد غذایی استفاده می کرد اما از قرن نوزدهم میلادی به تدریج ترکیبات شیمیایی، جایگزین افزودنی و داروهای گیاهی شدند. با این وجود، امروزه با افزایش سطح آگاهی و نگرانی های موجود پیرامون عوارض جانبی این ترکیبات شیمیایی و ایجاد مقاومت های دارویی، نگرش جدیدی نسبت به استفاده از نگهدارنده های گیاهی در مواد غذایی ایجاد شده است و تمایل به مصرف محصولات فاقد نگهدارنده و یا با نگهدارنده های طبیعی رو به افزایش است. از جمله این نگهدارنده ها می توان به عصاره های گیاهی اشاره نمود (Alpsoy ، ; Mohammad Khanizadeh ۲۰۱۰ و همکاران، ۲۰۱۴). به طور کلی عصاره های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آن ها طیف وسیعی از فعالیت های زیستی مانند فعالیت های ضدمیکروبی، آنتی اکسیدانی و فعالیت های دیگر را از خود نشان می دهند. با توجه به نقش مهمی که گیاهان دارویی در درمان برخی بیماری های عفونی ایفا می کنند (حجتی بناب و نیکخواه، ۱۳۸۹) در این مطالعه خواص آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره آبی دو گیاه نعناع سبز و خالواش مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه اثر عصاره گیاه نعناع سبز و خالواش بر روی باکتری های اشریشیا کلی و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شد و میزان MIC و MBC دو عصاره به روش ماکرودایلوشن مورد مطالعه قرار گرفت.

همان گونه که نتایج مطالعه نشان می دهد عصاره گیاهان نعناع و خالواش دارای خاصیت ضدمیکروبی بوده که این خصوصیت بسته به نوع گیاه متفاوت است. نتایج به دست آمده از آزمون های MIC و MBC این گیاهان نشان داد که عصاره ی خالواش دارای اثر ضدمیکروبی قوی تری بر روی *E. coli* نسبت به استاف بود به

باکتری	MIC(mg/ml) نعناع سبز	MBC(mg/ml) نعناع سبز	MIC(mg/ml) خالواش	MIC(mg/ml) خالواش
E. coli	۱۴	۱۴	۱۰/۵	۱۲
S. aureus	۱۰/۵	۱۴	۱۲	۱۴

جدول ۱. بررسی MBC و MIC عصاره آبی دو گیاه نعناع سبز و خالواش بر باکتری استاف اورئوس و اشریشیاکلای

	ظرفیت فنلی تام (mg/ml)	درت احیا کنندگی (mg/ml)
Mentha spicata	[a]۲/۷۷±۰/۳۹	[a] ۰/۰۵ ± ۰/۰۰۴
Mentha pulegium	[b]۰/۲±۰/۰۶	[b] ۰/۱۴±۰/۰۰۹

جدول ۲ . ظرفیت فنولی تام وقدرت احیاکنندگی (IC_{50}) عصاره های آبی نعناع سبز و خالواش

داده ها به صورت میانگین ±انحراف معیارآمده است وداده های باحروف لاتین متفاوت در هر ستون با هم اختلاف معنی دار دارند (p<۰.۰۵).

طوری که در غلظت ۱۰/۵mg/ml از رشد *E. coli* و در غلظت ۱۲mg/ml از رشد باکتری استاف ممانعت به عمل آورد. نتایج در مورد نعناع سبز متفاوت و با MIC ۱۰/۵ و ۱۲ mg/ml به ترتیب در مورد *استاف و ای کولای* حاکی از اثر بیشتر این عصاره بر ضد باکتری استاف بود.

در ارتباط با اثر ضد میکروبی اسانس ها و عصاره های گونه های نعناع مطالعات زیادی تاکنون صورت گرفته است.

کاظم الوندی و همکاران (۱۳۸۹) در طی مطالعه ای اثرممانعت کننده اسانس نعناع فلفلی را بر باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا* به ترتیب ۱۵۰،۳۰۰ و ۲۵۰ پی پی ام بدست آوردند و همچنین بررسی های Ghafghazi و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که اسانس خالواش دارای اثرات آنتی باکتریال بهتری بر روی باکتری های گرم منفی بوده است.

Motamedi و همکاران (۲۰۱۴) اثر آنتی باکتریال عصاره های متانولی و اتانولی گیاهان خالواش را بر باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که عصاره های خالواش بر باکتریهای *E. coli* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر مهاری مشابهی دارند. همچنین نتایج کار ایشان نشان داد این عصاره های الکلی دارای اثرات باکتریوسیدال و باکتریواستات در غلظت ۸mg/ml بر روی باکتری *استاف اورئوس* هستند که حاکی از اثر بخشی بالاتر این عصاره ها نسبت به عصاره آبی خالواش در این تحقیق می باشد. بنظر می رسد ترکیبات فنلی بیشتر در عصاره الکلی خالواش نسبت به عصاره آبی آن سبب تفاوت در میزان MIC این تحقیق با مطالعه حاضر گردیده است.

در همین راستا Seladji و همکاران (۲۰۱۴) نتایج مشابهی را در مورد عصاره های آبی و متانولی گونه ای از نعناع (*Mentha. rotundifolia*) در برابر باکتری های *E. coli* و *استاف اورئوس* با روش انتشار دیسک بدست آوردند و به خصوص در مورد عصاره ی متانولی اثر بر روی باکتری *E. coli* قوی تر از استاف بود .

Ullah و همکاران، (۲۰۱۱) طی مطالعه ای بر روی اثر ضد باکتریایی عصاره الکلی نعناع سبز میزان MIC این عصاره را در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* ۵۰ درصد MIC علیه باکتری اشریشیا کلی به دست آوردند که از این نظر مشابه با نتایج حاصل از این مطالعه بود.

اختلاف در میزان MIC به دست آمده از تحقیق حاضر با اعداد حاصل از سایر منابع در مورد عصاره خالواش و نعناع سبز را می توان به اختلاف در ترکیب شیمیایی اسانس و عصاره، تفاوت در محل رویش گیاه و فصل برداشت آن، تفاوت در روش استخراج اسانس و عصاره و همچنین نوع و سویه میکرو ارگانیسم و روش تعیین اثر ضد میکروبی ربط داد.

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو عصاره نعناع سبز و خالواش اثر ضدباکتریایی بالایی دارند که این اثر را می توان به ترکیبات فنولی موجود در این عصاره ها نسبت داد.

فلاوونوئیدها گروه وسیعی از این ترکیبات فنلی هستند که در پاسخ به عفونت های میکروبی در گیاه ساخته می شوند و علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها فعال می باشند. اثر ضد میکروبی فلاوونوئیدها از طریق تشکیل کمپلکس با غشای خارجی باکتری ها و پروتئین های محلول که به غشا متصل هستند، می باشد (Shahidiو Wanasundara، ۱۹۹۲)

همچنین این ترکیبات با نفوذ در غشای سلولی و شکستن آن باعث اثر ضدمیکروبی می شوند (Deshpande و همکاران، ۲۰۰۲) علت حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت نسبت به عصاره ی نعناع سبز ممکن است ناشی از این باشد که این باکتری ها در دیواره سلولی یک لایه دارند در حالی که در باکتری های گرم منفی این دیواره ها از چند لایه تشکیل شده است. به عبارت دیگر باکتری های گرم منفی دارای یک غشای بیرونی و یک فضای پری پلاسمیک هستند که هیچ کدام از آن ها در باکتری ها ی گرم مثبت وجود ندارد. غشای خارجی باکتری های گرم منفی به عنوان یک سد برای نفوذ مولکول های آنتی بیوتیک متعدد شناخته شده است. از سوی دیگر این غشا از نفوذ هیدروفیل به داخل باکتری جلوگیری

می کند. فضای پری پلاسمیک هم شامل آنزیم های بسیاری است که قادر به تجزیه ی مولکول های خارجی که از فضای بیرون وارد می شوند، هستند (Elgayyar و همکاران، ۲۰۰۱).

Kamkar و همکاران (۲۰۱۲) ثابت کردند عصاره آبی خالواش دارای ترکیبات تریپنوئیدی مانند منتول است. با توجه به اثبات اثر قوی این ترکیبات بر باکتری های گرم منفی (Ghafghazi و همکاران ، ۲۰۱۳) اثر بیشتر این عصاره بر ضد باکتری های گرم منفی را می توان به وجود این ترکیبات نسبت داد. همچنین با توجه به نتایج اخذ شده در این آزمایش این گیاه دارای ترکیبات فنولی کمتری نسبت به نعناع وحشی است که موجب می شود در غلظت های بالاتر دارای اثر علیه باکتری های گرم مثبت باشد.

در کنار اثر ضد میکروبی، گیاهان دارویی به عنوان منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند، مورد توجه محققین برای استفاده در سامانه های غذایی و بیولوژیک قرار گرفته اند (شریعتی فر و همکاران ،۱۳۹۰).

از آنجایی که ظرفیت فنلی و فعالیت الکترون دهی از شاخص های مهم در عمل آنتی اکسیدانی اسانس ها و عصاره های گیاهی به کار می روند (کامکار و همکاران، ۱۳۸۸) در این تحقیق از دو روش آزمایشگاهی تعیین ظرفیت فنلی تام و قدرت احیاکنندگی برای سنجش ویژگی های آنتی اکسیدانی عصاره های آبی نعناع سبز و خالواش استفاده شد. نتایج نشان داد (جدول ۲) که عصاره های آبی نعناع وحشی (با ظرفیت فنلی 2/77 ±0/39mg/ml عصاره و IC50=0/05±0/0.4 در تست قدرت احیاکنندگی) به طور معنادار ($P < 0/001$) دارای قدرت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره های آبی خالواش (با ظرفیت فنلی /06 mg/.± 2/. ml عصاره و قدرت احیاکنندگی (IC50 = ./14 ±./03) می باشد. در ارتباط با قدرت آنتی اکسیدانی اسانس ها وعصاره های جنس نعناع مطالعاتی صورت گرفته است. Golluce و همکاران در سال ۲۰۱۳ خاصیت ضد رادیکال عصاره متانولی پونه را با تست DPPH مورد آزمایش قرار دادند و با ثبت IC50 = 4/74 µg/ml قدرت آنتی اکسیدانی بالایی را به این عصاره نسبت دادند.

کامکار و همکاران (۱۳۸۸) با دو تست DPPH و بتاکاروتن لینولئیک اسید قدرت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی نعناع را مورد ارزیابی قرار دادند و با اخذ IC50 معادل 12µg/ml در تست DPPH و ۶۱٪ قدرت آنتی اکسیدانی در تست بتا کاروتن لینولئیک عصاره ی نعناع را بعنوان یک منبع آنتی اکسیدانی خوب معرفی کردند.

Singh و همکاران (۲۰۱۱)، IC_{50} عصاره نعناع فلفلی را در تست قدرت احیاکنندگی 0/6mg/ml بدست آوردند که از هر دو عصاره کار شده در این تحقیق قدرت آنتی اکسیدانی کمتری را دارا بود.

Osman در سال ۲۰۱۳ ظرفیت فنلی عصاره متانولی خالواش را معادل ۱۵۷/۹۹mg گرم گالیک اسید در هر گرم از ماده خشک گزارش کرد که با توجه به اینکه در این تحقیق میزان ظرفیت فنلی بر حسب mg گالیک اسید در هر گرم عصاره بدست آمده است، ظرفیت فنلی عصاره متانولی خالواش از عصاره آبی کار شده در این تحقیق بالاتر بوده است.

مطالعات گسترده ای نشان داده است که خاصیت آنتی اکسیدانی گیاهان خانواده نعناع وابسته به حضور ترکیبات فنلی مانند فلاوونوئید های موجود در این گیاهان می باشد. این ترکیبات به عنوان جمع آوری کننده های رادیکال های آزاد و نیز مهار کننده پراکسیداسیون لیپیدی شناخته شده اند (Singh و همکاران ،۲۰۱۱)

بر این اساس خاکی و همکاران (۱۳۸۳) ارتباط خطی معناداری را بین میزان ظرفیت فنولی تام و قدرت آنتی اکسیدانی اسانس ها و عصاره های گیاهی ثابت کرده اند و به نظر می رسد قدرت احیاکنندگی بالاتر در عصاره آبی نعناع سبز نسبت به عصاره آبی خالواش به دلیل بیشتر بودن ظرفیت فنولی تام در این عصاره باشد.

Journal of Veterinary Laboratory Research 6 (2014) 93-102

Antioxidant and antimicrobial effects of different mints, the most widely used in Caspian Sea areas, Iran

Jebelli Javan, A.[1*], Ahmadi Hamedani, M.[2], Bayan, M.[3], Keykhosravy, K.[3], Abdollahi, Z.[3], Kanani, M.[1].

Received: 10.07.2014 Accepted: 27.09.2014

Abstract

Mentha spicata and *Mentha pulegium* are well known species which widely applied in Caspian Sea areas as food and medicine of various drugs. The aim of this study was to investigate antibacterial and antioxidant capacity of aqueous extract of *M. spicata* and *M. pulegium*. The Hot Water Extraction (HWE) method was used in this experimental study. Minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal bacteriocidal Concentration (MBC) of aqueous extract of *M. spicata* and *M. pulegium* were determined by macrodilution method with using different concentrations of the extracts (1.5_16 mg/ml), in addition, the antioxidant activity was determined by total phenol and reducing power assay.

The aqueous extract of *M. pulegium* and *M. spicata* were rich in phenols. In this regard, *M. spicata* extract showed a phenol content and reducing power ability, (2.77 ±0.39 mg GAE/g DW and IC50 = 0.05 ± 0.004 mg /g DW, respectively) more than *M. pulegium* aqueous extract (0.2 ± 0.06 mg GAE/g DW and IC50 = 0.14 ± 0.009 mg/g DW respectively) ($p<0.001$). In vitro investigation of both extracts of these plants showed the antibacterial properties against the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. MICs of *M. spicata* and *M. pulegium* extract against S. aureus were 10.5 and 14 mg/ml and against *E. coli* were 12 and 10.5 mg/ml, respectively. Based on these results, it is clearly indicated that aqueous extracts of *M. spicata* and M. puleguim have noticeable in vitro antioxidant ability against various oxidative systems; moreover, these extracts can be used as an accessible source of natural antibacterial, against bacterial pathogens especially food poisoning pathogens such as *S. aureus* and *E. coli*.

Key words: *Mentha spicata, Mentha pulegium*, Antimicrobial Activity, Antioxidant Ability, *Staphylococcus aureus, Escherichia coli*.

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

2. Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

3. Student of Veterinary Medicine (D.V.M), Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

*Corresponding author: **jebellija@profs.semnan.ac.ir**

منابع

حجتی بناب ، ز.; نیکخواه ،ا. ۱۳۸۹. بررسی فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی عصاره های متانولی پنیرک و حنا بر برخی از باکتری های روده ای . مجله دنیای میکروب ها. **۳(۳)** ، ۱۸۶-۱۹۳.

خاکی ، آ.; جمشیدی ، م.; احمدی آشتیانی ،ح.; رضا زاده،ش.; فتحی آزاد ، ف.; مازندرانی ، م.۱۳۸۳. بررسی و مقایسه ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی چند گونه گیاهی بومی مازندران . فصلنامه گیاهان دارویی. سال نهم،**۲ (۳٤)**، ۱۷۷-۱۸۳.

سلمانیان، ش.;صادقی ماهونک، ع.; جامسون، م .; طباطبایی عمید، ب. ۱۳۹۲.شناساییواندازه گیری اسیدهای فنولی،فعالیت مهارکنندگی رادیکال وقدرت احیاءکنندگی آهن عصاره های اتانولی ومتانولی زولنگ. **۲(۲)**، ۱۹۳-۲۰۴.

سهراب وندی، س.; گائینی، ز.; سبحانی، ر.; سلیمانی، م.۱۳۹۱. مروری بر ویژگیهای کاربردی روغنهای ضروری پونه. مجله علوم تغذیه وصنایع غذایی ایران. **۵(۷)**،۶۶۱-۶۶۸.

شریعتی فر، ن.; کامکار، ا.; جمشیدی، ا.;جبلی جوان، ا.; صادقی. ط.; ضیغم منفرد. م. ۱۳۹۰.مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس وعصاره پونه ایرانی در شرایط آزمایشگاهی. فصل نامه گیاهان دارویی. **۸(۱)**، ۱۸۵- ۱۹۴.

عزیزخانی، م.; عطایی، م. ۱۳۹۱. تعیین فعالیت ضد میکربی وآنتی اکسیدانی عصاره متانولی واسانس گیاه نعناع(*Mentha longifolia Hudson*). نشریه پژوهشهای صنایع غذایی. **۱ (۲۲)** ،۲۹-۳۸.

قادری قهفرخی، م.;ممشلو،س.;صادقی ماهونک،ع.;اعلمی، م.۱۳۹۰.بررسی اثر آنتی اکسیدانی،ضدرادیکالی و قدرت احیاءکنندگی عصاره های مختلف گیاهان داروئی موره *Artemisia annua L.*. فصلنامه پژوهش های گیاهان دارویی. **۱(٦)**، ۴۶-۵۷.

کاظم الوندی، ر . ; شریفان،ا. ; آقازاده مشگی، م. ۱۳۸۹. بررسی ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*). پاتوبیولوژی مقایسه ای. **۷(٤)**، ۳۵۵-۳۶۴.

کامکار، ا.; اسدی، ف.;جبلی جوان،ا.;جمشیدی، ر. ۱۳۸۸ . ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی اسانس وعصاره نعناع ایرانی.مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی سمنان . **۱(۱)** ،۶۴-۷۲.

گلستان، ل.; سیدیوسفی، ل.;کابوسی، ح. ۱۳۹۱. اثربازدارندگی اسانس سرسم (*Mentha spicata*) بر قابلیت بقای باکتریهای پروبیوتیک درکشک مایع صنعتی. مجلّه نوآوری درعلوم وفنّاوری غذایی. **۳(۵)**،۱۴-۲۲.

زمان، س. ۱۳۷۰. گیاهان دارویی . تالیف: ولاگ ژان، چاپ پنجم، انتشارات ققنوس، تهران. ۱۴۳ .

Alpsoy , L. 2010 . Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. Afr J Biotechnol . 2474-2481.

Barros, L., Ferreira, M., Queiro´ s, B., Ferreir, I., Baptista, P. 2007. Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. **1172**: 5301-855

Deshpande , S.S. 2002 . Handbook of food toxicology, Toxicants and Antinutrient in Plant foods, Marcel Dkkel, New York. 920.

Elgayyar , M., Draughon , F.A., Golden , D.A. 2001. Antimicrobiol activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms, J Food Protect . **64**:1019-1024

Ghafghazi , H., Chedia , A., Weslati , M., Trakhna , F., Houssine , S., Abderrazak , M., Brahim , H. 2013. Chemical composition and in vitro antimicrobial activities of menthe pulegium leaves extraction against foodborn pathogens . journal of food safety. **33**: 239-246 .

Golluce ,M., Sahin ,F., Sokmen , M., Ozer , H., Daferera ,D., Sokmen , A., Polissiou ,M., Adiguzel ,A., Ozken , H. 2007 . Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia. Food Chem. **103**: 1449-1456.

Halliwell ,B., Aeschbach ,R., Loliger , J.and Aruoma, O.I. 1995, The characterization of antioxidants, Food Chem, Toxicol. **33**: 601-617.

Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Nemati, G., Falahpour, F., Partovi , R., 2012 . Effects of *Mentha pulegium* water extract dipping on quality and shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during superchilled storage. Iranian Journal of Fisheries Sciences. **13(2)**: 341_353

Kay ,C.D., Holub , B.J . 2002 .The effect of wild blueberry (*Vacciniun angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. Br. J. Nutr. **88**: 389 - 97.

Klink B. 1997 . Alternative medicine: is natural really better?. Drug Top. **141**: 99-100.

Mohamad khani zadeh , A., Zaringhalam moghadam ,J., Sonboli , A., Ayari ,M., Mirjafari ,S. 2014 . Effects of hydroalcholic and chloroformic extracts of Salvia Candidissima on hyperalgesia and edema during adjuvant-induced arthritis. Koomesh. **16 (2)**: 239-245

Morton , LW., Caccetta ,RA., Puddey , IB., Croft ,K . D . 2000.Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds:Relevance to cardiovascular disease. Clinical and Experimental Pharmacol. 27: 152-159.

Motamedi H, Seyyednejad SM, Dehghani F, Hasannejad Z. 2014. The study on the antibacterial activity of ethanolic and methanolic extracts of *Mentha pulegium* L. Zahedan J Res Med Sci.; 16(10): 55-59.

Neu, H.C. 1992. The crisis of antibiotic resistance. Science. **257**: 1061-9.

Nikkhah ,E., Khayami ,M., Heidari , R. 2009 .Evaluation of nitric oxide scavenging activity of anthocyanins fromblackberry (*Morus nigra*), strawberry (*Fragaria vesca*) and berry (*Morus alba Var*, *Nigra*) extracts. Iran J Med Arom Plants. **25(1)**: 120-128.

Osman, I.H. 2013. In Vitro Antioxidant activity of *Mentha pulegium* from Saudi Arabia. Bioscience Research.;10:33–37.

Parejo, I., Viladoma ,F., Jaume , B., Rosas-Romero ,A.,Flerlage ,N., Burillo ,JS., Codina ,A. . 2002 . Comparison between the Radical Scavenging Activity andAntioxidant Activity of Six Distilled and Nondistilled Mediterranean Herbs and Aromatic Plants. J. Agric. Food Chem. **50**: 6882 - 90.

Seladji, M., Belmekki, N., Bekhechi, C., Bendimerad, N. 2014. Antioxidant and antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts of *Mentha rotundifolia* L. from Algeria. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. **26(1)**: 228-234.

Shahidi ,F., Wanasundara , P.K.J.P.D. 1992. Phenolic antioxidant, Critical Reviews in Food Science and Nutritions. **32**:67-103

Singh , R., Shushni , M., Belkheir , A. 2011 . antibacterial and antioxidant activities of menthe piperita L. Arabian journal of chemistry. **3(8)**: 322-328.

Ullah, N., Khurram, M., Amin, M. U., Afridi, H.H., Khan, F.A., Khayam, S.M.U.,Ullah, S., Najeeb, U., Hussain, J., Khan, M.A. 2011. Comparison of Phytochemical constituents andantimicrobial activities of Menthaspicatafrom four northern districts of Khyber pakhtunkhwa. Journal of Applied Pharmaceutical Science. **1(7)**: 72-76.