فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۳، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۵۰۳-٤۹۲ (۱۳۸٦)

رابطه فعالیتهای ضد میکروبی روغنهای اسانسی *Mentha spicata* L. و *Chenopodium ambrosioides* L. با خواص آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌زدایی آنها

ایرج رسولی[۱*]، لطیف گچکار[۲]، داود یادگاری‌نیا[۲]، محمدباقر رضایی[۳]، مسعود تقی‌زاده[۱]، محمدهادی فکور[٤] و عبدالامیر علامه[۵]

۱- عضو هیئت علمی دانشگاه شاهد، پست الکترونیک: rasooli@shahed.ac.ir
۲- عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
٤- کارشناس ارشد میکروبیولوژی
۵- عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس
* نویسنده مسئول مقاله

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸٦ تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۳۸٦ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸٦

چکیده

اسانس گیاهان پونه (*Mentha spicata* **L.**) و سلمک معطر (*Chenopodium ambrosioides* L.)، با روش تقطیر با بخار آب استخراج و ترکیبهای آنها با دستگاههای گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) شناسایی شد. سپس فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌زدایی اسانسها مورد سنجش قرار گرفته و تأثیر ضد میکروبی آنها ارزیابی شد. میکروارگانیسمهای مورد پژوهش، *E. coli*، *S. aureus*، *S. enteritidis* و *L. monocytogenes* بودند. نمای حساسیتی میکروارگانیسمها و حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی (MIC, MBC) روغنهای اسانسی تعیین گردید. سینتیک مرگ میکروبی نیز بر اساس مدت زمان تأثیر کشندگی اسانسها مورد بررسی قرار گرفت. خواص آنتی‌اکسیدانی روغنهای اسانسی تعیین و رابطه آنها با خواص ضد میکروبی اسانسها بررسی گردید. در اسانسهای *Mentha spicata* و *Chenopodium ambrosioides* به‌ترتیب ۱٤ و ۱۳ ترکیب شناسایی شد. *E. coli*، *L. monocytogenes*، *S. aureus* و *S. enteritidis* به‌ترتیب نسبت به اسانسها حساسیت نشان دادند. تأثیر ضد میکروبی برگ پونه قویتر از سلمک معطر بود. ارزش D باکتریهای *E. coli*، *S. aureus*، *S. enteritidis* و *L. monocytogenes* در برابر اسانسهای پونه و سلمک معطر به‌ترتیب (٤/۲۸ و ۵)، (۲/۸ و ۵)، (٦/٤۲ و ٦/٤۲) و (۵ و ٤/۲۸) بود. اندازه قطر هاله عدم رشد ارتباط چندانی با سینتیک میکرب‌کشی آن نداشت. اسانسهای تحت مطالعه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی مساوی یا برتر در مقایسه با آنتی‌اکسیدان شیمیایی BHA هستند. ارتباط مستقیم بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی با قدرت ضد میکروبی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: *Mentha spicata* L.، *Chenopodium ambrosioides* L.، روغنهای اسانسی، آنتی‌اکسیدان، *E. coli*، *S. aureus*، *S. enteritidis*، *L. monocytogenes*

مقدمه

خواص درمانی عصاره‌ها و روغنهای اسانسی در مقابل بیماریهای میکروبی (Ciani *et al.*, 2000, Arrieta *et al.*, 2001) و غیرمیکروبی (Vikrant *et al.*, 2001, Ngo *et al.*, 2001) از زمانهای قدیم شناخته شده و مطالعات زیادی روی گونه‌های مختلف گیاهی و تأثیر اسانس یا عصاره‌های آنها روی میکروارگانیسمها انجام شده است. خواص ضد میکروبی عصاره‌های گیاهان مختلف نیز مطالعه و گزارش شده است (Khan *et al.*, 2001a, 2001b). تأثیر کشندگی یا بازدارندگی روغنهای اسانسی بیشتر روی باکتریها و مخمرها مؤثر گزارش شده است (Khan *et al.*, 2001a and 2001b). قارچها نیز از تأثیر ضد میکروبی روغنهای اسانسی مصون نمانده‌اند (Bishop & Thornton, 1997, Pandey *et al.*, 1996). رادیکالهای آزاد، مولکولهای فعال شده‌ای هستند که ممکن است منشأ داخلی یا خارجی داشته باشند. یکی از مهمترین اثرات تخریبی رادیکالهای آزاد شروع پراکسیداسیون لیپید می‌باشد که به تخریب غشاء سلول منجر می‌شود. پراکسیداسیون لیپید باعث اختلال در سازمان‌بندی غشاء و تغییر فعالیت آنزیمهای وابسته به آن و پروتئینهای دیگر می‌شود که همراه با آزاد کردن رادیکالهای هیدروپراکسیل و آلکوپراکسیل به‌صورت بالقوه برای سلول مضر می‌باشد. آنتی‌اکسیدانهایی مانند Butylated hydroxytoluene (BHT) و Butylated hydroxyanisol (BHA) که به‌طور وسیع مورد مصرف قرار می‌گیرند، دارای نقش بسیار مؤثری هستند، ولی مصرف آنها در محصولات غذایی به دلیل عدم پایداری و نقش احتمالی سرطان‌زایی آنها با شکست منجر می‌شود (Namiki, 1990, Pokorny, 1991) و بدین دلیل تمایل زیادی به استفاده از عوامل و افزودنیهای طبیعی به‌عنوان مواد آنتی‌اکسیدان بالقوه مؤثر وجود دارد. اخیراً استراتژی تجربی مطلوب‌سازی تغذیه انسانی با آنتی‌اکسیدانهای طبیعی گزارش شده و خواص آنتی‌اکسیدانی برخی از گیاهان نشان داده شده است (Aruoma, 1994). در کشور ایران به‌رغم فراوانی منابع طبیعی، به جوانب علمی گیاهان دارویی کمتر پرداخته شده است. بنابراین لزوم توجه علمی به این موضوع حائز اهمیت بوده و تحقیق حاضر به بخشی از آن می‌پردازد. در این مطالعه اسانس دو گونه گیاه دارویی ایران، با روشهای علمی استخراج و ترکیبهای آنها شناسایی خواهد شد. سپس فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌زدایی اسانسها مورد سنجش قرار گرفته و تأثیر ضد میکروبی آنها ارزیابی می‌شوند.

مواد و روشها

سویه‌های میکروبی

E. coli (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. enteritidis* (Clinical isolate), *L. monocytogenes* (PTCC 1298).

منابع گیاهی مورد استفاده

گیاهان مورد استفاده، پونه (*Mentha spicata*) و سلمک معطر (*Chenopodium ambrosioides* L.) بود که از رویشگاههای این گیاهان در باغ ملی گیاه‌شناسی ایران جمع‌آوری و شناسایی آنها در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور تأیید شد.

آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی و روش استخراج اسانس

نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده پس از انتقال به آزمایشگاه، ابتدا از خار و خاشاک جدا شده سپس برای مدتی در محیط آزمایشگاه (دور از نور مستقیم خورشید) قرار داده شدند تا خشک شوند. قبل از اسانس‌گیری، گیاه

کاملاً خرد شده و به روش تقطیر با بخار آب (Steam Distillation) اسانس‌گیری شد. اسانسهای حاصل به دقت وزن شده و در یخچال با درجه حرارت ٤+ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آنالیز اسانسها

برای شناسایی ترکیبهای اسانسها از دستگاههای گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد (Davies, 1990). شناسایی ترکیبها با استفاده از شاخصهای بازداری آنها که با تزریق هیدروکربنهای نرمال (C_7–C_{25}) تحت شرایط یکسان با تزریق اسانسها و توسط برنامه رایانه‌ای محاسبه شدند و با استفاده از طیفهای جرمی ترکیبهای استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه ترپنوییدها در رایانه دستگاه GC/MS انجام شد. محاسبه‌های تعیین درصد هر ترکیب به کمک داده‌پرداز Euro Chrom 2000 به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ مربوط به طیفها انجام شد.

روشهای میکروبیولوژیکی

برای روشهای میکروبیولوژی روشهای استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند (Rasooli & Mirmostafa, 2003) و نتیجه ثبت شده هر کدام، میانگین سه بار آزمایش می‌باشد. برای مطالعه اثرات ضد میکروبی از دو روش انتشار (Diffusion test) و رقت (Dilution test) استفاده شد که از میان روشهای انتشار از روش دیسک پلیت (Disc - plate method) و از میان روشهای رقت از روش رقت لوله‌ای استفاده شد. در روش دیسک از دیسکهای بلانک به قطر ٦ میلی‌متر استفاده شد. از محیط کشت مولرهینتون آگار جهت این روش استفاده گردید که با روش استاندارد و به مقدار مناسب در پلیتها تهیه گردیده بود. غلظت سوسپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و بر همان اساس رقتهای مختلف تهیه گردیدند. بعد از کشت میکروب مورد نظر به صورت چمنی در سطح پلیت حاوی محیط کشت مولرهینتون آگار دیسکهای استریل تهیه شده را توسط پنس استریل روی سطح پلیت آلوده به میکروب قرار داده و بعد از تماس کامل با محیط کشت، با فاصله مناسب از یکدیگر و از لبه پلیت با میکروپیپت استریل مقدار مشخص اسانس (٥µl) گیاهی روی دیسکها ریخته شد. بعد از انجام مراحل فوق، پلیتها را در داخل انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از ۱۸ تا ٢٤ ساعت، قطر هاله عدم رشد توسط کولیس اندازه‌گیری شدند (Rasooli & Mirmostafa, 2003).

روش رقت لوله‌ای

با کمک این روش حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimal Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Minimal Bactericidal Concentration)، ماده ضد میکروبی تعیین گردید. مقادیر ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرولیتر اسانس در ٥ml سوسپانسیون میکروبی ریخته و پس از هم زدن در انکوباتور به مدت ٢٤–١٨ ساعت قرار داده شد و سپس به‌وسیله اسپکتروفتومتر جمعیت میکروبی تعیین و در نتیجه MIC مشخص گردید، سپس از هر کدام از لوله‌ها که رشد جمعیت نشان نداده بودند ۰/۱ml روی پلیت حاوی نوترینت آگار کشت داده شد تا MBC مشخص گردد (Rasooli & Mirmostafa, 2003).

مطالعه سینتیک میکروب‌کشی اسانسها

پس از تعیین MBC سوسپانسیونهای میکروبی محتوی 10^7 باکتری تهیه و مقدار ٥٠µl اسانس برابر MBC در

۵ml سوسپانسیون ریخته و در فواصل زمانی معین، مقدار ۱۰µl از هر لوله برداشته، پس از رقیق سازی به نسبتهای ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ روی سطح محیط نوترینت آگار قرار داده و با میله شیشه‌ای استریل به طور یکنواخت گسترده شدند. پلیتها را به مدت ۲٤ ساعت داخل انکوباتور گذاشته و سپس تعداد کلنیها با کلنی‌کانتر شمارش شده با ضرب عکس رقت در تعداد کلنیها تعداد باکتریهای زنده در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون تعیین گردید.

آزمایش تأثیر حلالها بر میکروارگانیسمهای مورد مطالعه

حلالهای مختلف که در اسانس‌گیری یا رقیق‌سازی اسانسها مورد استفاده قرار می‌گیرند قبلاً در رقتهای مختلف تهیه و تأثیر آنها روی میکروبهای مورد مطالعه با روشهای انتشار و رقت آزمایش شد.

تهیه رقتهای مختلف اسانسها

کلیه اسانسها در صورت لزوم با حلالی که در آزمایشهای تأثیر حلالها بر میکروارگانیسمها، تأثیر ضد میکروبی نداشت (Dimethyl sulfoxide=DMSO) رقیق شدند. در کلیه مراحل آزمایشها از DMSO به عنوان شاهد مواد ضد میکروبی استفاده شد.

تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی اسانسها

فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌زدایی با استفاده از روش یاد شده در تحقیق Yadegarinia و همکاران (۲۰۰٦) به شرح زیر انجام گرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدان با روش ß-Carotene Bleaching Method به‌ترتیب زیر سنجیده شد:

تهیه امولسیون A- ۱۰ میلی‌گرم بتاکاروتین در ۱۰ml کلروفرم حل گردید. سپس ۲۰۰µl از محلول بتاکاروتین- کلروفرم در ارلن محتوی ۲۰ میلی‌گرم لینولئیک اسید و ۲۰۰ میلی‌گرم TWEEN 40 قرار گرفته و به مدت ۵ دقیقه توسط دستگاه تقطیر در خلأ گردشی (روتاری) در دمای ٤۰ درجه قرار گرفت تا کلروفرم تبخیر شد. سپس ۵۰ml آب مقطر به آرامی به آن اضافه و به‌شدت هم زده‌شد.

تهیه امولسیون B- امولسیون B مرکب از ۲۰ میلی‌گرم لینولئیک اسید، ۲۰۰ میلی‌گرم TWEEN 40 و ۵۰ml آب است. ۱۰µl آب مقطر به ۵ml امولسیون B اضافه کرده و به عنوان شاهد (صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر) مورد استفاده قرار گرفت. ۵ml از امولسیون A در کووت محتوی ۲۰۰ میکرولیتر اسانس ریخته و جذب در طول موج ٤۷۰nm یادداشت گردید. کووتهای شاهد و تست را در بن ماری ۵۰ درجه قرار داده و پس از ۱۲۰ دقیقه مجدداً جذب با طول موج ٤۷۰nm یادداشت گردید.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی به طریق زیر محاسبه شد:

$$AAC= [(A_{A(120)} - A_{C(120)}/(A_{C(0)} - A_{C(120)}] \times 1000$$

(AAC=Antioxidant Activity Coefficient)

$A_{A(120)}$= جذب آنتی‌اکسیدان در زمان ۱۲۰ دقیقه t=120

$A_{C(120)}$= جذب شاهد در زمان ۱۲۰ دقیقه t=120

$A_{C(0)}$= جذب شاهد در زمان ۰ دقیقه t=0

فعالیت رادیکال زدایی با تست DPPH

۱۰ میکرولیتر اسانس را با ۹۰۰ میکرولیتر (pH 7.4) 100mM Tris-HCl، ٤۰ میکرولیتر اتانول و ۵۰ میکرولیتر TWEEN 20 (0.5% w/w) مخلوط کرده و مخلوط فوق به ۱ میکرولیتر DPPH (0.5 mM=0.2 mg/ml) در اتانول اضافه گردید. مخلوط را به شدت هم زده و جذب فوراً بلافاصله جذب در طول موج ۵۱۷nm ثبت گردید. ثبت

تا ۷۰ دقیقه ادامه یافت و نوسانها یادداشت گردید تا جایی‌که دیگر نوسانی دیده نشد. برای شاهد به جای اسانس از آب مقطر استفاده شد و Trolox (1mM) به عنوان آنتی‌اکسیدان پایدار استفاده شد.

فعالیت رادیکال‌زدایی اسانس با فرمول زیر و بر اساس درصد ممانعت DPPH حساب گردید:

Inhibition percentage (IP)= $[(A_B - A_A)/A_B] \times 100$
A_B= Absorbance value of blank checked after 70 minutes
A_A= Absorbance value of sample checked after 70 minutes

نتایج

اسانسهای پونه (*Mentha spicata*) و سلمک معطر (*Chenopodium ambrosioides* L.)، با روش تقطیر با بخار آب استخراج و تأثیر ضد میکروبی اسانس آنها با روش دیسک پلیت بر روی *E. coli*، *S. aureus*، *S. enteritidis* و *L. monocytogenes* مطالعه (جدولهای ۱ و ۲ و شکلهای ٤-۱) و خواص آنتی‌اکسیدانی اسانسها (شکلهای ۷-۵) بررسی شد. ترکیبهای اسانسها با دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) آنالیز شد که در نتیجه آن در اسانس پونه ١٤ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات اصلی آن را پیپریتون (٦٧٪)، لیمونن (١٧/٢٪) و کاریوفیلن (٥/٧٪) تشکیل می‌دادند. در اسانس سلمک معطر ۱۳ ترکیب شناسایی گردید که مهمترین آنها عبارت بودند از: ٨،١-سینئول (٢٣/٦٪)، بتا-اوسیمن (٢١/٢٪)، سیس-کارویل پروپانوات (١٩/٦٪) و پیپریتنون (١٣/٢٪).

جدول ۱- تأثیر اسانس نعنا بر میکروارگانیسمها

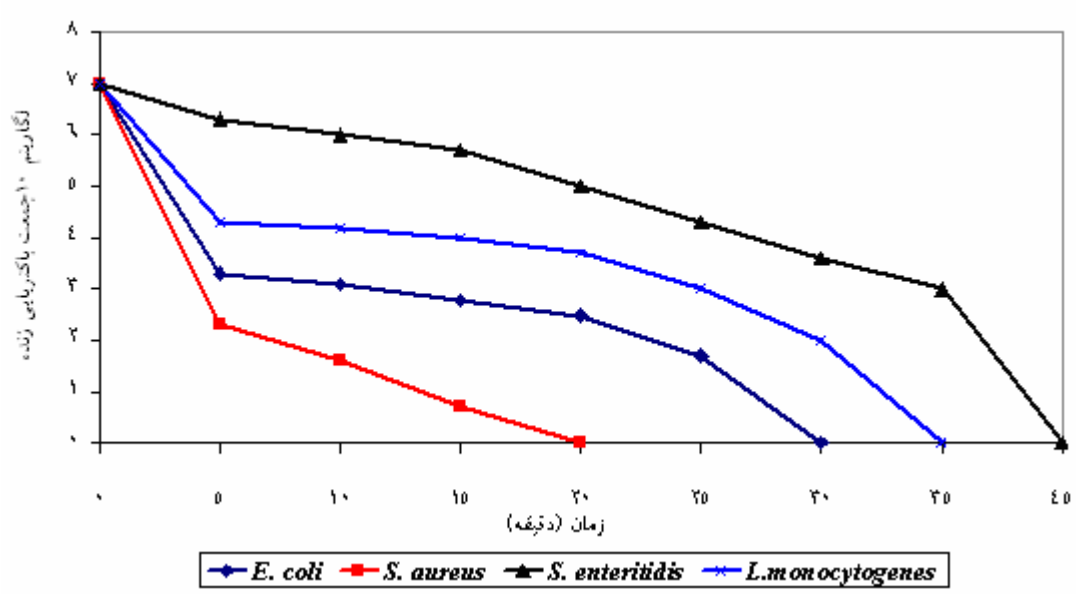
نام میکروارگانیسم	قطر هاله عدم رشد (mm)	اسانس نعنا (µl) در ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی			
		۵	۱۰	۲۰	۳۰
E. coli	۱۳/٦٧±۱/۵۳	++	+	–	–
S. aureus	۱۱/٦٧±۱/۱۵	++	+	–	–
S. enetritidis	۹±۰	+++	++	+	–
L. monocytogenes	۱۱/٦٧±۱/۵۳	+++	++	+	–

رشد بسیار خوب = ++++ رشدخوب = +++ رشد متوسط = ++ += MIC - = MBC

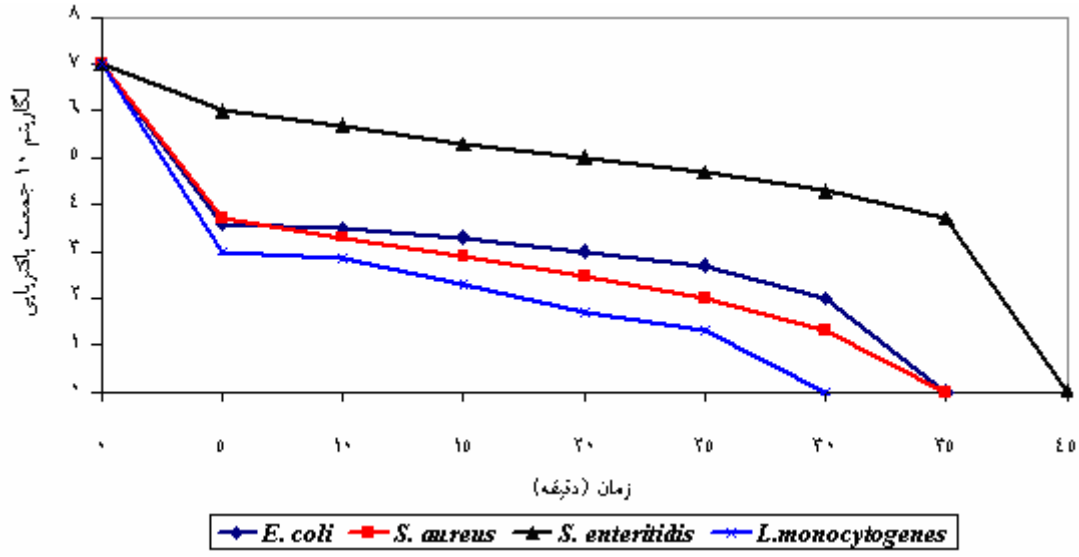
جدول ۲- تأثیر اسانس سلمک معطر بر میکروارگانیسمها

نام میکروارگانیسم	قطر هاله عدم رشد (mm)	اسانس سلمک معطر (µl) در ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی			
		۵	۱۰	۲۰	۳۰
E. coli	۱۱/٦٧±۰/۵۸	++	+	–	–
S. aureus	١٤/٣٣±١/۵٣	++	+	–	–
S. enetritidis	۹/٣٣±۰/۵۸	+++	++	+	–
L. monocytogenes	٢٨/٦٧±٢/٣١	+	+	–	–

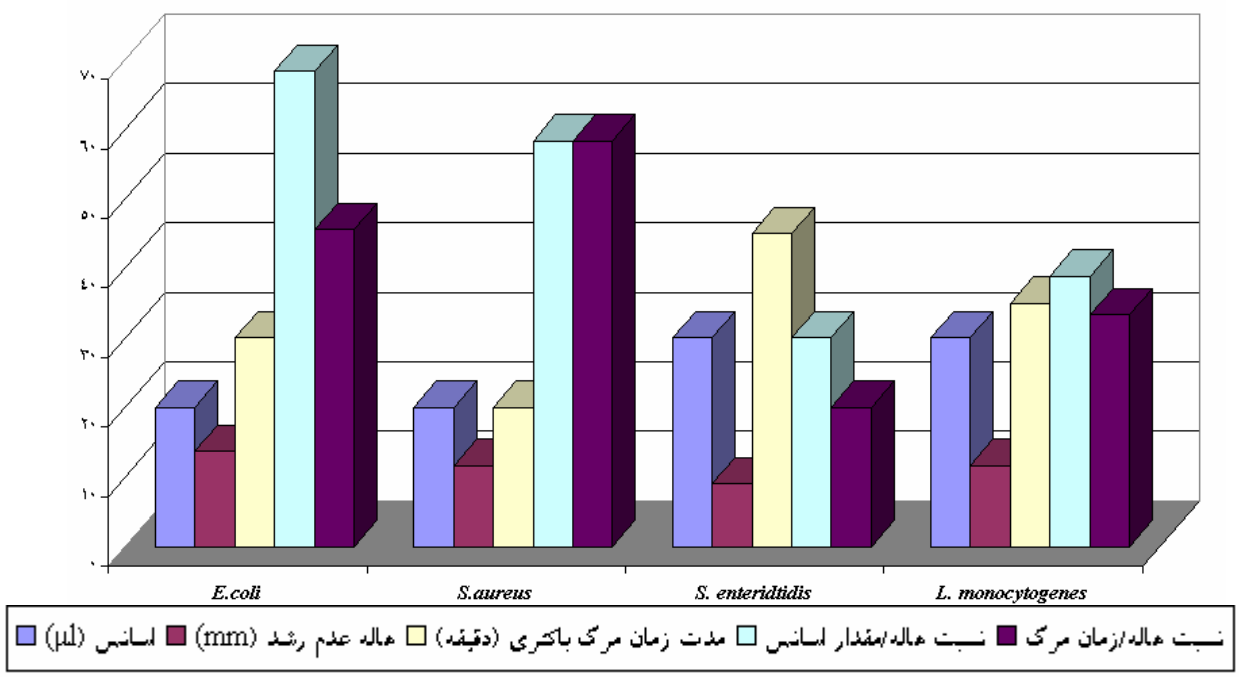
رشد خوب = +++ رشد متوسط = ++ += MIC - = MBC



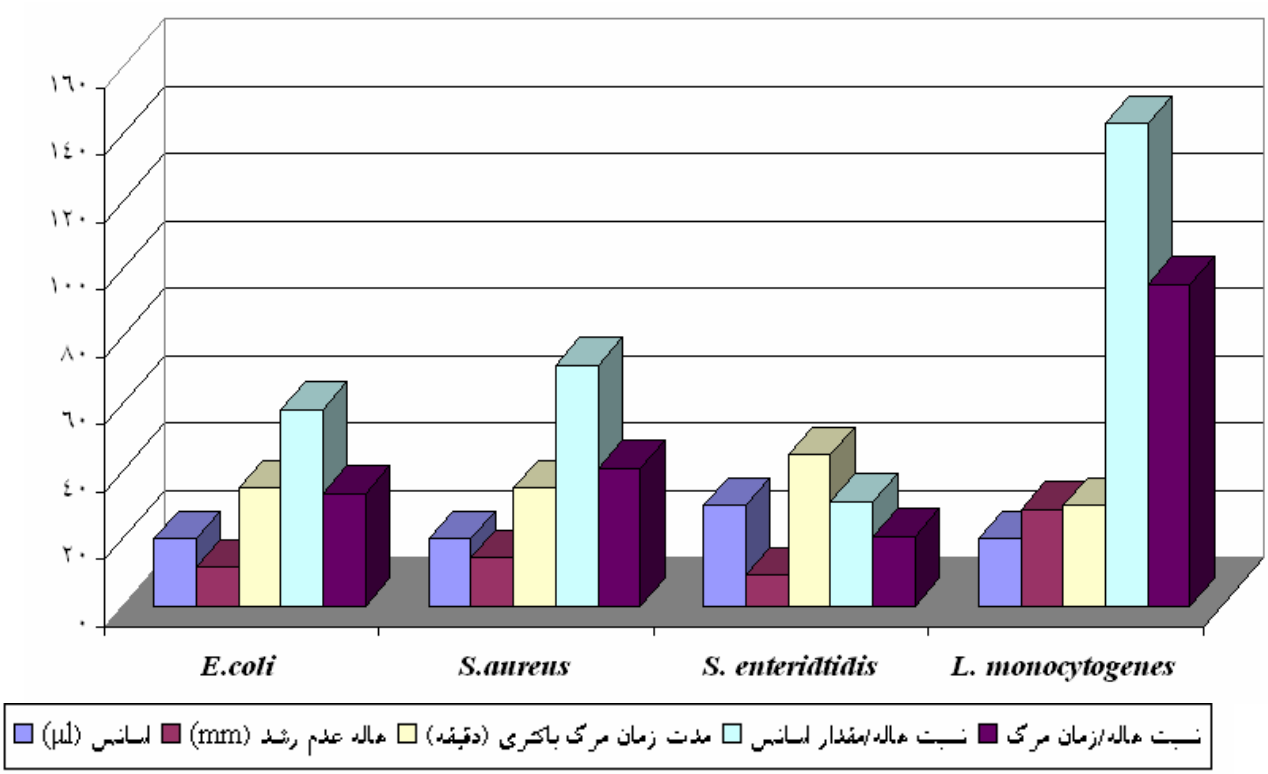
شکل ۱- سینتیک مرگ باکتریایی در مواجهه با کمترین غلظت باکتری کشی اسانس پونه *(Mentha spicata)*



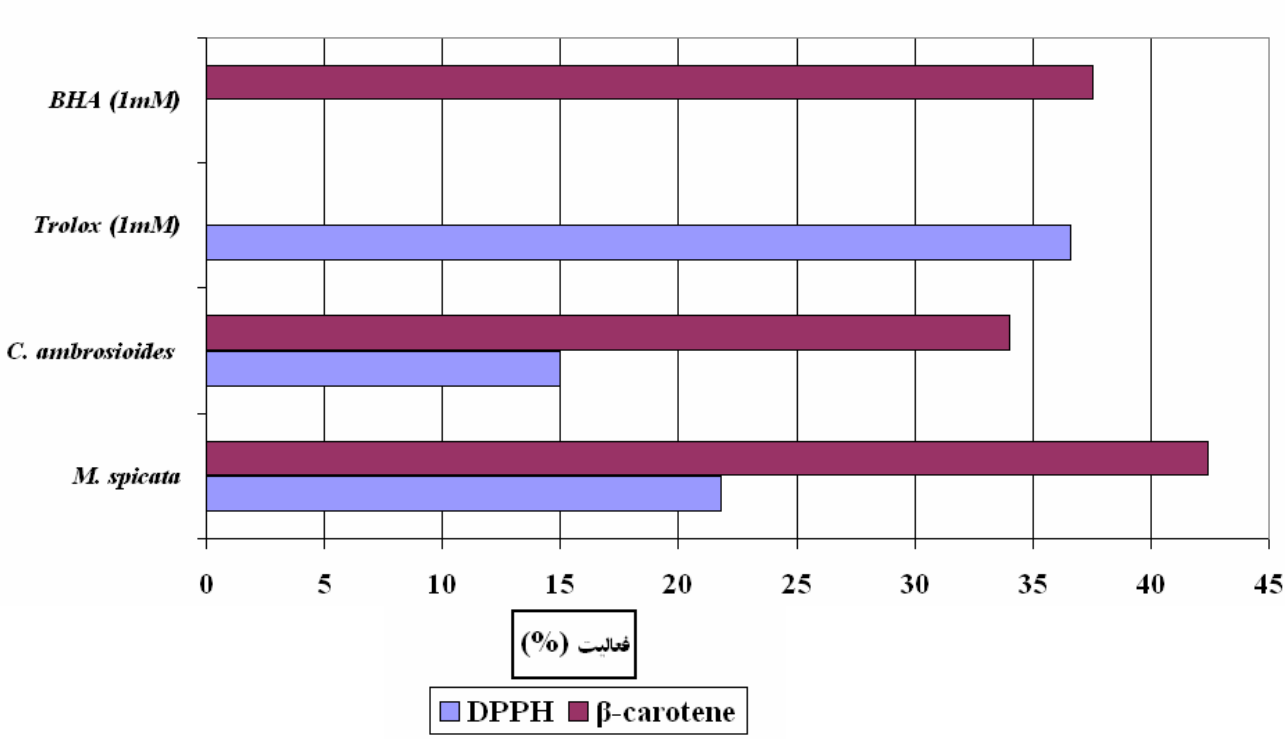
شکل ۲- سینتیک مرگ باکتریایی در مواجهه با کمترین غلظت باکتری کشی اسانس سلمک معطر *(Chenopodium ambrosioides)*



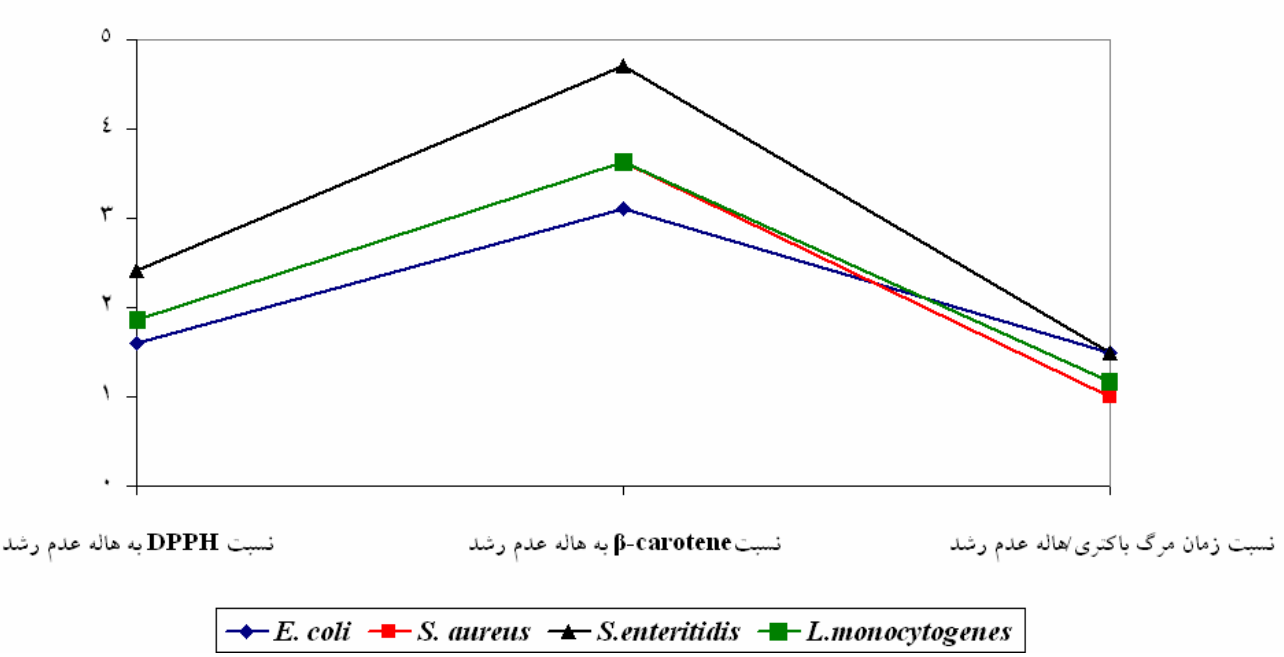
شکل ۳- تاثیر کمترین غلظت روغن اسانسی پونه بر هاله عدم رشد و زمان مرگ باکتری



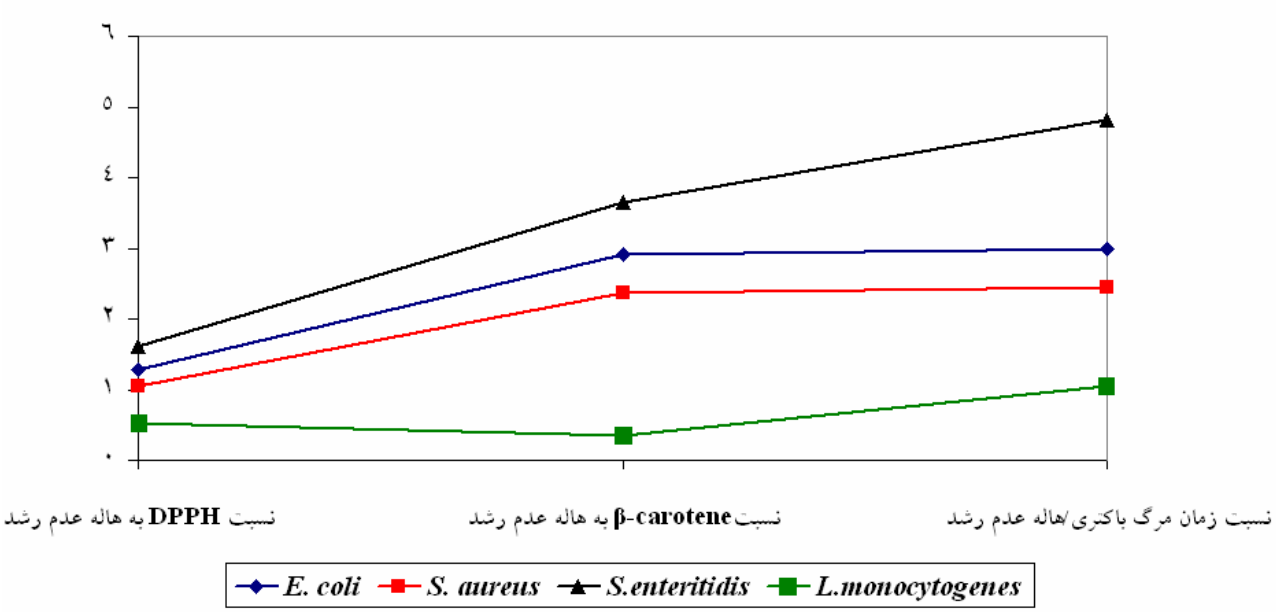
شکل ٤- تأثیر کمترین روغن اسانسی سلمک معطر بر هاله عدم رشد و زمان مرگ باکتری



شکل ٥- فعالیت آنتی‌اکسیدانی و رادیکال آزاد زدایی اسانسها در مقایسه با استانداردهای شیمیایی



شکل ٦- رابطه خاصیت ضد باکتریایی و فعالیت آنتی اکسیدانی و رادیکال آزاد زدایی اسانس پونه



شکل ۷- رابطه خاصیت ضد باکتریایی و فعالیت آنتی اکسیدانی و رادیکال آزاد زدایی اسانس سلمک معطر

بحث

میکروارگانیسمهای *E. coli* ،*L. monocytogenes* ،*S. aureus* و *S. enteritidis* به‌ترتیب نسبت به اسانسها حساسیت نشان دادند. جهت تعیین حداقل غلظت‌های مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC)، اسانسهای تازه را در رقتهای مختلف در برابر سوسپانسیونهای میکروبی محتوی 10^7 میکروارگانیسم در میلی‌لیتر قرار دادیم. اسانسها خاصیت کشندگی و مهارکنندگی میکروبی خوبی نشان دادند. تأثیر ضد میکروبی پونه قویتر از سلمک معطر بود، ولی مقدار اسانس لازم برای ایجاد هاله یا تأثیر مهارکنندگی و یا اثر کشندگی بر میکروارگانیسمها در یک اسانس نسبت به نوع میکروارگانیسمها متفاوت بود (جدولهای ۱ و ۲). این تفاوت نشان دهنده اثر بخشی متفاوت ترکیبهای مختلف شیمیایی اسانسها بر میکروارگانیسمها می‌باشد. تأثیر بازدارندگی رقتهای مختلف روغنهای اسانسی بر رشد میکروارگانیسمها نشان داد که باکتریها حساستر از سایر میکروارگانیسمها هستند که این نتیجه منطبق با نظر Kivanc و Agkul (۱۹۸٦) می‌باشد. سینتیک باکتریسیدال اسانسها نشان داد که اسانسها قادر به کشتن تمام باکتریها در فاصله زمانی ٤٥-۱۵ دقیقه می‌باشند (شکلهای ۲-۱). ارزش D یا Decimal reduction time میکروارگانیسمها مورد بررسی قرار گرفت (شکلهای ۲-۱). باکتری *E. coli* ارزش D متفاوتی در برابر اسانسها نشان داد. ارزش D این باکتری در برابر اسانس پونه ٤/۲۸، و اسانس سلمک معطر ۵ دقیقه بود. *S. aureus* ارزش D معادل ۲/۸ دقیقه در مواجهه با اسانس پونه، و ۵ دقیقه در برابر اسانس سلمک معطر داشت. باکتری *S. enteritidis* در برابر اسانسها مقاومت خوبی نسبت به سایر باکتریهای مورد مطالعه نشان داد و ارزش D معادل ٦/٤٢ دقیقه در مواجهه با اسانسهای پونه و سلمک معطر نشان داد. *L.monocytogenes* دارای ارزش D معادل ۵ دقیقه در برابر اسانس پونه و ٤/۲۸ دقیقه در برابر اسانس سلمک معطر بود. در مقایسه با تأثیرپذیری کمتر باکتریهای *E. coli* و *S. aureus* تحت تأثیر روغن

اسانسی *Salvia tomentosa* (Haznedaroglu *et al.*, 2001)، در این مطالعه باکتریهای فوق به شدت تحت تأثیر اسانسهای مورد مطالعه قرار گرفتند. شکلهای ۳ و ٤ نشان می‌دهند که قطر هاله‌های ممانعت رشد باکتری ارتباط مستقیمی به مقدار اسانس و مدت زمان لازم برای کشتن باکتریها نداشته و عوامل دیگری نیز دخالت دارند. بنابراین می‌توان استنباط نمود که اندازه قطر هاله‌های عدم رشد دقیقاً نمی‌تواند بیانگر MIC یا MBC باشد و برای تعیین میزان حساسیت هر میکروارگانیسم به هر ماده ضد میکروبی، تعیین قطر هاله و MIC و MBC لازم است. این اختلاف تأثیر روغنهای فرار بر عوامل بیماری‌زا، نشان دهنده اثربخشی مختلف ترکیبهای شیمیایی متفاوت در اسانس هر گیاه است و این اختلاف در گیاهان مختلف و گونه‌های متفاوت بیشتر می‌شود که نشان دهنده وابستگی اثر دارویی به ترکیبهای شیمیایی اسانسها و شرایط اقلیمی گیاهان (Chi & Lawrence, 1997) و حتی احتمال موارد استفاده دارویی گوناگون یک گونه گیاهی می‌باشد. به نظر می‌رسد بیشترین خاصیت ضد میکروبی در کلیه اسانسهای مورد مطالعه از ترکیبهای مونوترپنی (Lis-Balchin *et al.*, 1998) ناشی می‌شود. بر اساس گزارشی، برخی هیدروکربنهای مونوترپنی مثل پینن و بورنئول کمترین تأثیر ضد میکروبی را دارند (Dorman & Deans, 2000). بررسی هاله عدم رشد میکروبی و حداقل زمان لازم برای کشتن میکروارگانیسمها نشان می‌دهد که اندازه قطر هاله عدم رشد ارتباط چندانی با سینتیک میکرب‌کشی آن ندارد. همان‌طوری‌که در این مطالعه نشان داده شد، هر چند قدرت ضد میکروبی اسانسها بیشتر بود، ولی در تست انتشار، گاه هاله‌هایی با قطر کمتر ولی قدرت میکروب کشی بیشتر دیده می‌شد که این موضوع با نظر Pandey و همکارانش (۱۹۹٦) مطابقت دارد. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی اسانسها نشان داد که اسانسهای تحت مطالعه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی مساوی یا برتر در مقایسه با آنتی‌اکسیدان شیمیایی BHA هستند (شکل ۵). در مطالعه خواص رادیکال‌زدایی اسانسهای مورد مطالعه نتیجه‌ای عکس آزمایش β-carotene bleaching حاصل شد (شکل ۵). این تفاوتها به دلیل بکارگیری روشهای مختلف آزمایش دور از انتظار نیست. پراکسیداسیون لیپید فرآیند پیچیده‌ای در سلولهای هوازی است و بیانگر برهم‌کنش بین اکسیژن ملکولی و اسیدهای چرب اشباع نشده است. شکلهای ٦ و ۷ نشان می‌دهند که نسبت خواص آنتی‌اکسیدانی به خاصیت ضد میکروبی با هر دو روش بکار گرفته شده در خصوص اسانس سلمک معطر (شکل ۷) به طور موازی است و بنابراین ضمن تأیید خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس سلمک معطر ارتباط مستقیم بین این خاصیت با قدرت ضد میکروبی آن بدست می‌آید.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مراکز تحقیقاتی علوم پایه دانشگاه شاهد و بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که با تأمین هزینه، امکان عملی شدن این طرح را فراهم آوردند، تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آوریم.

منابع مورد استفاده

- Arrieta, J., Reyes, B., Calzada, F., Cedillo-Rivera, R. and Navarrete, A., 2001. Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianum*. Fitoterapia, 72(3): 295-297.
- Aruoma, O.I., 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. Food Chemistry and Toxicology, 32: 671–683.
- Bishop, C.D. and Thornton, I.B., 1997. Evaluation of the antifungal activity of the essential oils of

- Lis-Balchin, M., Deans, S.G. and Eaglesham, E., 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. Flavour and Fragrance Journal, 13: 98-104.
- Namiki, M., 1990. Antioxidants/antimutagens in food. Critical Review in Food Science Nutrition, 29: 273–300.
- Ngo, B.E., Schmutz, M., Meyer, C., Rakotonirina, A., Bopelet, M., Portet, C., Jeker, A., Rakotonirina, S.V., Olpe, H.R., and Herrling, P., 2001. Anticonvulsant properties of the methanolic extract of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). Journal of Ethnopharmacology, 76(2): 145-150.
- Pandey, M.C., Sharma, J.R. and Dikshit, A., 1996. Antifungal evaluation of the essential oil of *Cymbopogon pendulus* (Nees ex St. eud) wats. CV. Prama. Flavour and Fragrance Journal, 11: 257-260.
- Pokorny, J., 1991. Natural antioxidant for food use. Trends Food Science Technology, 9: 223–227.
- Rasooli I. and Mirmostafa S.A., 2003. Bacterial susceptibility and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. J. Agri. Food Chem. 51: 2200-2205 (2003).
- Vikrant, V., Grover, J.K., Tandon, N., Rathi, S.S. and Gupta, N., 2001. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. Journal of Ethnopharmacology, 76(2): 139-143.
- Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh و M., Alipoor Astaneh S. and Rasooli I., 2006., Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. Phytochemistry, 67(12): 1249-1255.

Monarda citriodora var. citriodora and *Melaleuca alternifolia* on post harvest pathogens. Journal of Essential Oil Research, 9: 77-82.
- Chi,_k.S. and Lawrence, M.B., 1997. Reasons for the variation in composition of some commercial essential oils. In: Sara J. Risch and Chi-Tang Ho (Eds.). Spices, Flavor Chemistry and Antioxidant Properties, pp. 138-159, ACS Symposium series, 660 p.
- Ciani, M., Menghini, L., Mariani, F., Pagiotti, R., Menghini, A. and Fatichenti, F., 2000. Antimicrobial properties of essential oil of *Satureja montana* L. on pathogenic and spoilage yeasts. Biotechnology Letters, 22(12): 1007-1010.
- Davies, N.W., 1990. Gas Chromatographic Retention Index of Monoterpenes and Sesquiterpenes on Methyl silicone and Carbowax 20M phases. Journal of Chromatography, 503, 1-24.
- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88, 308–316.
- Haznedaroglu, M.Z., Karabay, U. and Zeybek, U., 2001. Antibacterial activity of Salvia tomentosa essential oil. Fitoterapia, 72: 829–831.
- Khan, M.R., Kihara, M., and Omoloso, A.D., 2001a. Antimicrobial activity of *Harpulliua ramiflora*. Fitoterapia, 72(3): 298-300.
- Khan, M.R., Kihara, M., and Omoloso, A.D., 2001b. Antimicrobial activity of *Picrasma javanica*. Fitoterapia, 72(4): 406-408.
- Kivanc, M., and Akgul, A., 1986. Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. Flavour and Fragrance Journal, 1: 175-179.

Relation of antioxidative property and free radical scavenging capacity to the antimicrobial characteristics of essential oils from *Mentha spicata* L. and *Chenopodium ambrosioides* L.

I. Rasooli[*1], L. Gachkar[2], D. Yadegarinia[2], M.B. Rezaei[3], M. Taghizadeh[1], M.H. Fakoor[4] and A.M. Allameh[5]

1- Department of Biology, Shahed University, Tehran, Iran, E-mail: rasooli@shahed.ac.ir
2- Infectious Diseases & Tropical Medicine Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services, Tehran-Iran
3- Department of Medicinal plants, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran-Iran
4- M.Sc graduate of Islamic Azad University-Qom.
5- Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, P.O. Box 14115-111, Tehran, Iran

Abstract

Lipid peroxidation is the most important deteriorative effect of free radicals that leads to destruction of cell membrane. The routine use of antioxidants is becoming more limited due to their instability and their probable carcinogenic effects. The use of natural additives and antioxidants in treatment of microbial and non microbial diseases is gaining momentum among people. In the present work, we extract and identify the chemical compounds of the essential oils of *Mentha spicata* L. and *Chenopodium ambrosioides*.L. Antioxidative property, free radical scavenging capacity and antimicrobial characteristics of oils were then studied. The microorganisms employed in this study were: *E.coli, S.aureus, S.enteritidis, L. monocytogenes.* The plants were hydrodistilled and the essential oils were extracted. The chemical constituents of the oils thus obtained were identified by GC/MS. Employing disc diffusion and tube dilution methods antimicrobial effects of the oils on were studied. Zones of microbial growth inhibition and Minimum Inhibitory and Bactericidal concentrations (MIC & MBC) of the microorganisms exposed to various dilutions of the oils were determined. Kinetics of microbial death were determined. Antioxidant properties of the oils were tested and their relation to antimicrobial properties of the oils were studied. Chemical analysis lead to identification of 14 and 13 compounds in the essential oils of *Mentha spicata* and *Chenopodium ambrosioides*, respectively. The sensitivity of bacteria to the oils were the order of *L. monocytogenes*> *E. coli*> *S. aureus*> *S. enteritidis*. The antibacterial properties of the essential oils from *Mentha spicata* leaves were higher than the oils from *C. ambrosioides* leaves. The D values for *E. coli, S. aureus, S. enteritidis* and *L. monocytogenes* exposed to the MBC levels of the essential oils were: *Mentha spicata* (6.42, 10, 6.42, 6.42) and *Chenopodium ambrosioides* (2.85, 4.28, 5, 4.28) minutes respectively. The zones of microbial growth inhibitions were not correlated to microbicidal kinetics of the oils. The oils had antioxidant properties equivalent to or higher than synthetic BHA antioxidant. The correlation between antioxidative properties and antimicrobial activities of the oils were studied.

Key words: *Mentha spicata* L., *Chenopodium ambrosioides* L., essential oils, antioxidant, *E .coli, S. aureus, S. enteritidis, L. monocytogenes.*