مقاله اصیل پژوهشی

اثر ضدّ باکتریایی اسانس نعناع سبز (*Mentha spicata L.*) بر هشت گونه باکتری بیماری‌زای مهم دستگاه گوارش

مجید زارع بیدکی[1]، مینا عرب[2]، محترمه خزاعی[3]، احسان افکار[4]

چکیده

زمینه و هدف: گیاه نعناع با نام علمی *Mentha spicata* L.، از جمله گیاهانی است که اسانس آن مصارف دارویی فراوانی دارد و اثرات ضدّ باکتریایی آن مورد بحث است. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر ضدّ باکتریایی اسانس این گونه خاص نعناع، بر روی 8 سویه استاندارد باکتریایی شامل: اشریشیاکولی، باسیلوس‌سرئوس، کلبسیلا پنومونیه، پسودوموناس‌آیروژینوزا، استافیلوکوکوس‌اورئوس، شیگلا فلکسینری و دو گونه سالمونلا بود.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، با روش میکرودایلوشن‌براث، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس نعناع در برابر این باکتری‌ها، به دو روش چشمی و کدورت‌سنجی، توسط دستگاه الایزا ریدر تعیین شد. مراحل آزمایش، سه‌بار تکرار شد. نتایج با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به‌دست آمده، میانگین MIC اسانس نعناع در بین باکتری‌های مورد آزمایش، تفاوت معنی‌داری داشت ($P<0/05$)؛ به‌طوری‌که بیشترین حساسیّت نسبت به این اسانس، در باسیلوس‌سرئوس و کمترین حساسیّت در کلبسیلا پنومونیه و استافیلوکوکوس‌اورئوس وجود داشت. اما از لحاظ آماری، اختلاف معنی‌داری بین میانگین MBC این اسانس در بین باکتری‌ها مشاهده نشد ($P>0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که اسانس این گیاه، دارای اثرات ضدّ باکتریایی انتخابی است و پیشنهاد می‌شود تا به‌عنوان یک مادّه آنتی‌سپتیک، در صنایع داروسازی و غذایی مورد کاربرد قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: نعناع سبز؛ اسانس؛ اثر ضد باکتریایی؛ MIC؛ MBC

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1393؛ 21 (3): 274-282.

دریافت: 1393/04/24 پذیرش: **1393/09/29**

[1] استادیار، مرکز تحقیقات هپاتیت، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[2] نویسنده مسؤول؛ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

آدرس: بیرجند- خیابان غفاری- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بیرجند- دانشکده پزشکی

تلفن: 09384052017 پست الکترونیکی: minaarab70@yahoo.com

[3] کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[4] کارشناس ارشد آمار، معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

مقدمه

بیماری‌های عفونی، یکی از چالش‌های بزرگ علم پزشکی در قرن بیست و یکم است و به طبع آن، تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید روز به روز افزایش می‌یابد. در عین حال، گسترش روزافزون مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان بیماری‌های عفونی را مشکل و پرهزینه کرده است؛ از این رو، امروزه محقّقین به سمت جایگزین‌های گیاهی روی آورده‌اند که ضمن دارابودن اثرات ضدّ باکتریایی، فاقد عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی هستند (1). امروزه نسبت تعداد داروهای گیاهی رسمی مورد استفاده در درمان بیماری‌ها، در مقایسه با تعداد کل داروهای رسمی در جهان در حال فزونی است. این نسبت در کشورهایی همچون: چین و هند با حدود بیش از 70%، در بالاترین مقدار و در کشورهایی همچون آمریکا با حدود 20% در حدّ پایینی قرار دارد (2). متأسفانه در ایران، این نسبت در حدّ پایینی است؛ به طوری‌که در حال حاضر در حدود 5% می‌باشد (3).

بعضی از اسانس‌های گیاهان، به‌عنوان عوامل مهم ضدّ میکروبی طبیعی گزارش شده‌اند. اسانس‌ها، مایعات روغنی معطری هستند که از اندام‌های مختلف گیاه نظیر: دانه، ریشه، جوانه، پوست، شاخه، برگ، غنچه و گل به‌دست می‌آیند. به‌طور عمده، ترکیبات فنلی، مسئول خواص ضدّ میکروبی اسانس‌ها هستند. اسانس‌ها می‌توانند تا بیش از 60 نوع ترکیب داشته باشند و ترکیبات اصلی، ممکن است تا 85% اسانس را تشکیل دهند. نتیجه بعضی از بررسی‌ها نشانگر این موضوع است که اثرات ضدّ باکتری اسانس‌ها، به‌صورت کامل نسبت به اثرات تک‌تک اجزا بیشتر است (4). اسانس‌ها با داشتن خاصیت آب‌گریزی، موجب نفوذ در چربی غشایی سلول باکتری می‌گردند و متعاقباً منجر به خارج‌شدن یون‌ها و محتویات سلولی از آن می‌شوند. خروج این مواد از سلول، با ایجاد اختلال در عملکرد سلولی، باعث مرگ آن می‌شود (5). نعناع یکی از رایج‌ترین گیاهانی می‌باشد که از زمان باستان به‌دلیل خواص درمانی و آروماتیک آن، مورد استفاده قرار می‌گرفته است. گیاه نعناع، دارای 4000 گونه است که در 200 جنس جای داده شده است. گونه *Mentha spicata* L. از تیره *Lamiaceae*، یکی از مهم‌ترین و مشهورترین گونه‌های نعناع است که در قسمت‌های مختلف جهان پراکنده می‌باشد. این گونه، از لحاظ ترکیب اسانس، تفاوت‌هایی با دیگر گونه‌های نعناع دارد که اصلی‌ترین این تفاوت‌ها، عدم وجود منتول و تشکیل‌شدن ترکیبی به نام کاروون (carvon) است که درصد بالایی (73%) از اسانس را شامل می‌شود (6). در طبّ سنتی، استفاده از این گیاه برای هضم بهتر مواد غذایی، افزایش حرکات دستگاه گوارش، درمان سرماخوردگی و وبا و کاهش التهاب برونش‌ها، کاربرد فراوانی داشته است. امروزه نیز از این گیاه در تهیّه بسیاری از غذاها و همچنین در لوازم آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود. مطابق بعضی گزارش‌ها، عصاره این گیاه، دارای خواص ضدّ باکتریایی و همچنین ضدّ قارچی و ضدّ سرطانی است (7). با وجود اینکه برخی از پژوهشگران، خواص ضدّ انگلی و آنتی‌اکسیدانی این گونه نعناع را اثبات نموده‌اند و استفاده از آن را برای پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان پیشنهاد می‌کنند، اما ترکیبات و خواص ضدّ میکروبی آن، به‌میزان بسیار کمی بررسی شده است (8). در مطالعات Znini و همکاران (9) و Kokkini و همکاران (10)، صرفاً ترکیبات شیمیایی این گونه از نعناع شناسایی شده است؛ همچنین موسوی و همکاران در بررسی اثر ضدّ میکروبی اسانس این گونه نعناع و نایسین به‌صورت ترکیبی بر روی لیستریا منوسیتوژنز و اشریشیاکولی O157:H7، گزارش کردند که اثر ترکیبی آنها منجر به کاهش معنی‌دار در تعداد هر دو باکتری می‌شود (11، 12).

برای کاربردی‌کردن مصرف اسانس‌های گیاهی در طبّ مکمل، بررسی اثرات ضدّ میکروبی آنها در رشد باکتری‌های بیماری‌زا در محیط آزمایشگاهی ضرورت دارد؛ بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضدّ باکتریایی اسانس نعناع بر هشت گونه پاتوژن مهم گوارشی به‌صورت *in vitro* بود.

روش تحقیق

این مطالعه تجربی، در سال 1393 در دانشگاه علوم پزشکی بیرجند انجام شد.

تهیه اسانس:

پس از جمع‌آوری گیاه نعناع (*Mentha spicata* L.) و تأیید علمی آن توسط کارشناس ارشد گیاهان دارویی در دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند، استخراج اسانس گیاه ذکرشده، به‌روش تقطیر با آب، توسط دستگاه کلونجر انجام شد؛ بدین ترتیب که ابتدا 100 گرم از برگ خشک گیاه، آسیاب و به بالن 2 لیتری منتقل شد و مقدار یک‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. عملیات اسانس‌گیری، 4 ساعت به طول انجامید. با توجه به اینکه چگالی اسانس از چگالی آب کمتر است، بنابراین اسانس استخراج‌شده، روی فاز آبی قرار گرفته و به‌راحتی توسط قیف دکانتور جداسازی شد. اسانس تقطیرشده، پس از آبگیری با سولفات سدیم‌انیدرید، بلافاصله به یک شیشه تیره و دربسته بدون تماس با نور و هوای آزاد، منتقل و تا زمان استفاده، در یخچال در دمای 4°C نگهداری گردید (13).

آماده‌کردن اسانس:

با توجه به عدم حلالیّت اسانس در محیط کشت محتوی آب، به یک امولسیفایر که اسانس را بدون داشتن اثرات ضدّ میکروبی چشمگیر در خود حل کند، نیاز بود؛ از این رو از مادّه دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان حلال استفاده شد. با انجام یکسری آزمایش‌های متناوب، بهترین میزان حلالیّت برای اسانس نعناع به‌دست آمد؛ سپس در لوله‌ای سترون، به‌طور جداگانه، 50µl اسانس خالص نعناع ریخته شد و 1950µl از حلال DMSO به آن اضافه و توسط شیکر به‌هم زده شد تا محلول یکدست و شفافی به‌دست آید. از این استوک اولیه، برای مراحل بعدی استفاده گردید (14).

تهیه سوسپانسیون باکتریایی:

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این تحقیق عبارت بودند از:

اشریشیاکولی (ATCC 25922)، باسیلوس‌سرئوس (ATCC 11778)، کلبسیلاپنومونیه (ATCC 700603)، پسودوموناس‌آیروژینوزا (ATCC 27883)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29213)، شیگلا فلکسینری (ATCC12022)، سالمونلا انتریکا (PTCC 1709) و سالمونلا تیفی‌موریوم (PTCC 1639).

این باکتری‌ها، از قبل به‌صورت جداگانه و لیوفیلیزه، از انستیتو پاستور ایران و مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و در کرایو بانک تلقیح و در دمای -70°C نگهداری شدند. برای احیای این باکتری‌ها، ابتدا از هر کرایو بانک، یک ساچمه آغشته به محلول باکتری‌های مورد نظر برداشته و در سه میلی‌لیتر محیط نوترینت‌براث (مرک، آلمان) قرار داده شد؛ سپس این محیط‌های کشت، به‌مدت 24 ساعت در دمای 37°C گرمخانه‌گذاری شدند تا باکتری‌ها دوباره تکثیر شوند. پس از احیای باکتری‌های مورد مطالعه، به‌منظور به‌دست آوردن پرگنه‌هایی از باکتری، از محیط کشت نوترینت‌براث حاوی باکتری‌های پاتوژن، بر روی محیط بلاداگار، کشت جداگانه‌ای به عمل آمد تا بتوان از پرگنه‌های ظهوریافته بر سطح محیط کشت، برای تهیه محلولی معادل با کدورت نیم مک‌فارلند ($1/5\times10^8$cfu/ml) استفاده کرد.

آزمایش میکرودایلوشن‌براث (Microdilution broth) برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibition Concentration: MIC)

آزمایش MIC، در میکروپلیت 96 چاهکی استریل و با روش براث‌میکرودایلوشن انجام شد. این میکروپلیت‌ها، دارای 8 ردیف 12 چاهکی به حجم 250 میکرولیتر هستند. ابتدا از محیط کشت نوترینت‌براث، 100µl داخل 96 چاهک میکروپلیت ریخته شد. به اولین چاهک هر ردیف، توسط سمپلر، 100µl از اسانس نعناع (که در حلال DMSO حل شده بود) اضافه گردید؛ سپس 100µl، از چاهک اول برداشته و در چاهک دوم ریخته و بعد از چند بار پر و خالی‌کردن توسط

سمپلر، 100µl از چاهک دوم برداشته و به چاهک سوم ریخته شد. این کار، تا چاهک شماره 11 ادامه داده شد. سپس 10µl از محیط کشت حاوی هر باکتری که معادل کدورت نیم مک‌فارلند شده بود، به تمام چاهک‌ها به‌استثنای چاهک شماره 11 هر ردیف اضافه شد. چاهک‌های شماره 11 هر ردیف، به‌عنوان شاهد اسانس (کنترل منفی)، فقط حاوی محیط کشت و اسانس بود. چاهک‌های شماره 12 هر ردیف، به‌عنوان شاهد باکتری (کنترل مثبت) برای تعیین کدورت باکتری حاوی محیط کشت، DMSO و باکتری‌ها بود. پس از تلقیح باکتری‌ها، میکروپلیت بر روی شیکر به‌مدّت 30 ثانیه قرار داده شد تا مخلوط کاملاً یکنواخت گردد؛ سپس جذب نوری با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در ساعت صفر و با طول موج 620nm خوانده شد. در مرحله آخر، میکروپلیت در انکوباتور با دمای 37°C به‌مدّت 24 ساعت قرار داده شد و بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به‌صورت چشمی مشاهده و نیز جذب نوری توسط الیزا ریدر خوانده شد. برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد، کمترین غلظتی که کدورتی نداشت و به عبارت دیگر رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان عدد MIC منظور گردید.

بررسی حداقل غلظت کشنده (Minimum Bactericidal Concentration/ MBC):

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی، از چاهک‌های فاقد کدورت (غلظت‌های MIC و بیشتر از آن)، مقدار 10µl در شرایط کاملاً استریل و در نزدیکی شعله برداشته و بر روی محیط بلاداگار، تلقیح و کشت داده شد. پس از انکوباسیون 24 ساعته در دمای 37°C، کمترین رقّتی که توانسته 99/9 % باکتری‌ها را بکشد، به‌عنوان رقّت MBC در نظر گرفته شد.

کلیه مراحل آزمایش، سه‌بار تکرار شد و نتایج به‌صورت میانگین آنها ارائه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش 16) انجام شد. برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار در نتایج به دست‌آمده، از آزمون‌های one-way ANOVA همراه با LSD استفاده شد و اختلاف میانگین داده‌ها در سطح P<0/05 از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس نعناع برای 8 میکروارگانیسم مذکور به‌روش میکرودایلوشن‌براث، بر حسب درصد در جدول یک آمده است.

جدول 1- میانگین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و کشندگی(MBC) اسانس نعناع علیه باکتری های مورد مطالعه

باکتری	MIC ($\bar{X}$ ± SD)	MBC ($\bar{X}$ ± SD)
اشریشیاکولی	0/13±0/05	0/234±0/13
باسیلوس‌سرئوس	0/104±0/05	0/156±0/13
کلبسیلاپنومونیه	0/26±0/09	0/312
پسودوموناس‌آیروژینوزا	0/208±0/09	0/52±0/18
استافیلوکوکوس‌اورئوس	0/26±0/09	0/312
شیگلا فلکسنری	0/156	0/364±0/23
سالمونلا انتریکا	0/156	0/52±0/18
سالمونلا تیفی‌موریوم	0/156	0/468±0/27

جدول 2- سطح معنی‌داری تفاوت MIC باکتری‌های مورد مطالعه بر حسب نتایج آزمون LSD

	اشریشیاکولی	باسیلوس سرئوس	کلبسیلا پنومونیه	پسودوموناس آیروژینوزا	استافیلوکوکوس اورئوس	شیگلا فلکسنری	سالمونلا انتریکا	سالمونلا تیفی‌موریوم
اشریشیا کولی		0/6	0/017*	0/128	0/017*	0/6	0/6	0/6
باسیلوس سرئوس	0/6		0/005*	0/048*	0/005*	0/301	0/301	0/301
کلبسیلا پنومونیه	0/017*	0/005*		0/301	1	0/048*	0/048*	0/048*
پسودوموناس آیروژینوزا	0/128	0/048*	0/301		0/301	0/301	0/301	0/301
استافیلوکوکوس اورئوس	0/017*	0/005*	1	0/301		0/048*	0/048*	0/048*
شیگلا فلکسنری	0/6	0/301	0/048*	0/301	0/048*		1	1
سالمونلا انتریکا	0/6	0/301	0/048*	0/301	0/048*	1		1
سالمونلا تیفی‌موریوم	0/6	0/301	0/048*	0/301	0/048*	1	1	

*= در سطح P<0/05 معنی‌دار تلقی شده است.

نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه، بیانگر تفاوت معنی‌دار MIC اسانس نعناع در بین باکتری‌های مورد آزمایش بود (P=0/039، F=2/847). مطابق داده‌های مندرج در جدول فوق، غلظت 0/104درصد اسانس نعناع، بر ضدّ باسیلوس‌سرئوس بیشترین اثر مهارکنندگی و غلظت 0/26 درصد این اسانس بر ضدّ کلبسیلاپنومونیه و استافیلوکوکوس‌اورئوس کمترین اثر مهارکنندگی را از خود نشان داد؛ همچنین اسانس این گیاه در غلظت‌های 0/13، 0/156 و 0/208 درصد، باعث مهار رشد سایر باکتری‌های مورد آزمون شد. حساسیّت هر دو گونه سالمونلا نسبت به این اسانس، در غلظت 0/156درصد بود.

برای مقایسه دوبه‌دوی MIC اسانس نعناع در بین باکتری‌های مورد مطالعه، از آزمون آماری LSD استفاده گردید (جدول 2)؛ همچنین نتایج آزمون واریانس یک‌طرفه مشخص کرد که MBC اسانس نعناع، در بین باکتری‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری نداشت (P=0/145، F=1/854)؛ با این وجود، غلظت 0/156درصد از این اسانس، بر باسیلوس‌سرئوس اثر کشندگی داشت (جدول 1).

بحث

محصولات گیاهی دارای خواص ضدّ باکتریایی، به علت دسترسی ارزان و عوارض اندک، به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک مطرح هستند. یکی از این گیاهان، خانواده نعناع است که به‌سبب تنوّع گونه‌ها و وجود ترکیبات ترپنوئیدی گوناگون، اسانس و ترکیبات فنلی به‌خصوص فلانوئیدها، از لحاظ اثرات ضدّ میکروبی قابل بررسی است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضدّ باکتریایی اسانس گونه *Mentha spicata L.* (نعناع سبز) بر هشت گونه پاتوژن مهم گوارشی در شرایط *in vitro* انجام شد.

نتایج این تحقیق نشان داد که اثرات ضدّ باکتریایی گیاه نعناع قابل توجه است. این یافته با گزارش‌های حاصل از معدود مطالعات انجام‌شده در این زمینه مشابهت دارد. نوری‌زاده و همکاران، آثار ضدّ باکتریایی عصاره‌های نعناع، شیرین‌بیان، پونه، بابونه و آویشن را بر هلیکوباکترپیلوری، به دو روش آگاردایلوشن و دیسک‌دیفیوژن بررسی کردند که بیشترین اثر، مربوط به نعناع بود و دامنه MIC عصاره آن برای سویه‌های مختلف 200-350 میکروگرم در میلی‌لیتر و دامنه قطر هاله عدم رشد 12-17 میلی‌متر گزارش گردید (15).

در تحقیق حاضر، دامنه MIC و MBC اسانس نعناع به‌ترتیب بین: 0/26-0/104 و 0/52-0/156 درصد تعیین گردید. نتایج حاصل از این مطالعه، نشان از قدرت مهارکنندگی (MIC=%0/104) و باکتری‌کشی (MBC=%0/156) بالای اسانس گیاه نعناع بر

باسیلوس‌سرئوس داشت. در بین باکتری‌های مورد بررسی، اشریشیاکولی از نظر میزان تأثیرپذیری از اثر ضدّ باکتریایی اسانس، رتبه دوم را نشان داد و با حداقل غلظت مهاری 0/13%، از این نظر پس از باسیلوس‌سرئوس قرار گرفت؛ در عین حال، دو میکروارگانیسم کلبسیلاپنومونیه و استافیلوکوکوس‌اورئوس، در غلظت 0/26درصد کمترین حساسیّت را نشان دادند. این تفاوت‌ها، قدرت باکتری‌کشی انتخابی این گونه نعناع را به‌ویژه بر باسیلوس‌سرئوس به‌خوبی آشکار می‌سازد؛ در عین حال، عدم وجود تفاوت معنی‌دار در غلظت‌های MBC نعناع برای هشت گونه باکتریایی، پیشنهاد می‌کند که در موارد استفاده عام از این گیاه با هدف کنترل عفونت و یا پیشگیری از فساد و آلودگی میکروبی مواد غذایی، بهتر است از غلظت‌های MBC این گیاه استفاده گردد.

Padmini و همکاران، با بررسی فعالیّت ضدّ میکروبی عصاره نعناع به‌روش آگار ژل‌دیفیوژن، اثر چشمگیر نعناع بر ضدّ باکتری‌های سالمونلاتیفی و پسودوموناس‌ایروژینوزا را گزارش کردند (16). محبوبی و حقّی، خواص ضدّ میکروبی اسانس نعناع را به دو روش دیسک‌دیفیوژن و براث‌میکرودایلوشن، مورد بررسی قرار دادند و MIC آن را برای باکتری‌های گرم مثبت، بین 0/25-4 میکرولیتر در میلی‌لیتر و برای لیستریامنوسیتوژنز 1میکرولیتر در میلی‌لیتر گزارش نمودند (17). نیریز نقدهی و همکاران، خواص ضدّ باکتریایی اسانس نعناع و پونه کوهی را بر روی باسیلوس‌سرئوس و اشریشیاکلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی به‌روش حداقل غلظت مهارکنندگی بررسی کردند و نشان دادند که اسانس نعناع، به‌صورت کامل می‌تواند رشد این دو عامل بیماری‌زا را مهار کند (18).

اثرات ضدّ ویروسی و ضدّ قارچی نعناع نیز توسط محقّقان، مورد بررسی قرار گرفته است. Hermann و Kusera، اثر ضدّ ویروسی عصاره نعناع را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که منتون (Menthone)، روی ویروس‌های آنفولانزا، هرپس، نیوکاسل و چند ویروس دیگر مؤثر است (19). Sokovic و همکاران، ترکیبات شیمیایی و اثرات ضدّ قارچی اسانس گونه‌های نعناع و آویشن را بررسی نمودند و گزارش کردند که بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهنده گونه M.spicata، کاروون (69/5٪) و منتون (21/9٪) بوده و خاصیت ضدّ قارچی قوی دارد (20). نائینی و همکاران که اثر ضدّ قارچی 50 اسانس و عصاره گیاهی را بر روی کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند، نشان دادند که اسانس نعناع، در روش دیسک‌گذاری و انتشار در آگار، دارای اثرات ضدّ کاندیدایی بسیار قوی است (21). در مطالعه عطایی و همکاران مشخص شد که عصاره گیاه نعناع، دارای اثر ضدّ قارچی می‌باشد؛ به‌طوری‌که در رقّت 1/5، از رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس جلوگیری می‌کند و در رقّت 1/2 دارای اثر کشندگی است (22).

تحقیقاتی نیز در مورد خواص آفت‌کشی و ضدّ سرطانی گیاه نعناع به انجام رسیده است. فهیم و همکاران، حساسیّت تخم، پوره و حشره کامل سفید بالک گلخانه به دو اسانس گیاهی نعناع و زیره سبز را در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که میزان حشره‌کشی اسانس نعناع بیشتر از زیره سبز است (23). در مطالعه Yuangang و همکاران مشخص شد که سمیّت سلولی اسانس نعناع بر روی سلول‌های کارسینومای پروستات انسان، به‌طور معنی‌داری قوی‌تر از اثر آن بر روی سلول‌های کارسینومای ریه و سرطان پستان انسان می‌باشد (24). Kumar و همکاران نیز بیان کردند که عصاره گیاه نعناع در کنار ویژگی‌های درمانی، دارای خواص ضدّ باکتریایی، ضدّ قارچی و ضدّ سرطانی است (13).

در مورد نحوه عمل اسانس‌ها در مورد مرگ باکتری‌ها، چنین اظهار نظر شده است که متابولیت‌های فنلی موجود در گیاهانی چون نعناع، توانایی این را دارند که یک هیدروژن از گروه هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک خود رها کرده و باعث اکسیداسیون رادیکال‌های آزاد چربی‌ها و دیگر بیومولکول‌های غشای سلولی و تخریب آن شوند و به این ترتیب، خاصیّت آنتی‌اکسیدانی، ضدّ میکروبی و ضدّ التهابی

خود را اعمال می‌نمایند (25).

اثر ضدّ باکتریایی اسانس این گیاه ممکن است به کاروون، لیمونن و منتون موجود در ترکیبات شیمیایی این گیاه بستگی داشته باشد. Flamin و همکاران، اثر ضدّ باکتریایی لیمونن، منتول، پولگون و منتون بر باکتری‌هایی چون سالمونلا و لیستریا را مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند که پولگون، دارای بیشترین اثر روی سالمونلاست (26). Aggarwal و همکاران نیز فعالیّت ضدّ باکتریایی و ضدّ قارچی انانتیومرهای لیمونن و کاروون جداشده از نعناع را مورد تأیید قرار دادند (27).

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش، خاصیّت ضدّ باکتریایی اسانس نعناع را به‌خوبی آشکار ساخت. پیشنهاد می‌شود که از اسانس این گیاه، در صنایع غذایی (به عنوان نگهدارنده) و در صنایع دارویی برای درمان بیماری‌هایی همچون: مسمومیّت‌های غذایی و عفونت‌های چشمی ناشی از باسیلوس‌سرئوس و عفونت‌های گوارشی و ادراری ناشی از اشریشیاکولی استفاده شود؛ همچنین به‌دلیل محدودیّت روزافزون استفاده از مواد شیمیایی، پیشنهاد می‌شود اثر این گیاه بر روی انواع دیگری از میکروارگانیسم‌ها نیز مطالعه گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل نتایج طرح تحقیقاتی مصوب (کد 44/92) شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند می‌باشد. نویسندگان مقاله، از جناب آقای مهندس پویان که در تهیه اسانس برای انجام این پژوهش همکاری داشته‌اند و نیز معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع:

1- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int J Food Microbiol. 2004; 94(3): 223-53.

2- Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, Marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz J Med Biol Res. 2000; 38(2): 179-89.

3- Bagheri A, Naghdi Badi H, Movahedian F, Makkizadeh M, Hemati A. Evaluation of using herbal medicine in Isfahan women population. Journal of Medical Plants. 2005; 3(15): 81-93. [Persian]

4- Ayfer D, Turgay O. Antimicrobil activities of various medicinal and commercial plant extracts. Turk. J.Biol. 2003; 27: 157-62.

5- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiol. 2001; 18(4): 463-70.

6- De Feo V, Ricciardi AI, Biscardi D, Senatore F. Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of Minthostachys verticillate (Griseb) Ep1 (Lamiaceae). J Essential Oil Res. 1998; 10(1): 61-5.

7- Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S. Insecticidal properties of Mentha species: A review. Ind Crops Prod. 2011; 34(1): 802-17.

8- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. Food Chem Toxicol. 2008; 46(2): 446-75.

9- Znini M, Bouklah M, Majidi L, Kharchouf S, Aouniti A, Bouyanzer A, et al. Chemical composition and inhibitory effect of Mentha spicata essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. Int J Electrochem Sci. 2011; 6(3): 691- 704.

10- Kokkini S, Karousou R, Lanaras T. Essential oils of spearmint (carvone-rich) plants from the island of Crete (Greece). Biochem Syst Ecol. 1995; 23(4): 425-30.

11- Moosavy MH, Mahmoudi R, Davudi S, Shavisi N, Antimicrobial Efficacy of Mentha spicata Essential Oil and Nisin in Combination on Listeria monocytogenes. Journal of Medicinal Plants. 2013; 4(48): 104-16. [Persian]

12- Moosavy MH, Shavisi N, Antimicrobial Efficacy of *Mentha spicata* Essential Oil and Nisin in Combination on E. coli O157:H7, Journal of Food Industry Research, 2013; 23(3): 319-28. [Persian]

12- Moosavy MH, Shavisi N. Determination of Antimicrobial Effects of Nisin and Mentha spicata Essential Oil against Escherichia coli O157:H7 Under Various Conditions (pH, Temperature and NaCl Concentration). Pharmaceutical sciences. 2013; 19(2): 61-7.

13- Kazem Alvandi R, Sharifan A, Aghazadeh Meshghi M. Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil. Journal of Comparative Pathobiology. 2011; 7(4): 355-64. [Persian]

14- Soltan Dallal M, Bayat M, Yazdi M, Aghaamiri S, Ghorbanzadeh Meshkani M, Abedi Mohtasab T, et al. Antimicrobial effect of Zataria multiflora on antibiotic-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from food. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2012; 17(2): 21-9. [Persian]

15- Nourizadeh E, Mirzapur T, Ghasemi K, Razavi SM, Latifi Navid S. Antibacterial effects of extracts of peppermint, licorice, oregano, chamomile and thyme on Helicobacter pylori. Bimonthly Official Publication Medical Daneshvar. 2004; 11(52): 67-72. [Persian]

16- Padmini E, Valarmathi A, Usha Rani M. Comparative analysis of chemical composition and antibacterial activities of Mentha spicata and Camellia sinensis. Asian J Exp Biol Sci. 2010; 1(4): 772-81.

17- Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil. J Ethnopharmacol. 2008; 119(2): 325-7.

18- Neyriz Nagadehi M, Razavi Rohani SM, Karim G, Razavilar V, Zeynali A, Delshad R. The effect of monolaurin in combination with mentha pulegium l. And mentha spicata l. Essential oils on bacillus cereus and e. Coli o157:h7: in vitro study. Veterinary Journal (Tabriz). 2010; 3(4): 657-66. [Persian]

19- Herrmann EC, Kucera LS. Antiviral Substances in Plants of the Mint Family (Labiatae). III. Peppermint (Mentha piperita) and other Mint Plants. Exp Biol Med. 1967; 124(3): 874-8.

20- Soković MD, Vukojević J, Marin PD, Brkić DD, Vajs V, Van Griensven LJ. Chemical Composition of Essential Oilsof Thymus and Mentha Speciesand Their Antifungal Activities. Molecules. 2009; 14(1): 238-49.

21- Naeini A, Naseri M, Kamalinejad M, Khoshzaban F, Rajabian T, Nami H, et al. Study on Anti- Candida Effects of Essential Oil and Extracts of Iranian Medicinal Plants, In vitro. Journal of Medicinal Plants. 2011; 2(38): 163-72. [Persian]

22- Atai Z, Ansari M, Mousavi A, Mirzaei A. In-vitro study of antifungal effects of selected herbal extracts on standard and wild strains of Candida albicans. The Journal of Islamic Dental Association of IRAN (JIDA). 2007; 19(2): 91-7. [Persian]

23- Fahim M, Safaralizadeh MH, Safavi SA. Evaluation of susceptibility of egg, nymph and adult of greenhouse whitefly trialeurodes vaporariorum (hem. Aleyrodidae) to two plant essential oils (spearmint and cumin) under laboratory conditions. Journal of Agricultural Science (University of Tabriz). 2012; 22(3): 27-35. [Persian]

24- Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, et al. Activities of ten essential oils towards Propionibacterium acnes and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. Molecules. 2010; 15(5): 3200-10.

25- Strycharz S, Shetty K. Peroxidase activity and phenolic content in elite clonal lines of Mentha pulegium in response to polymeric dye R-478 and Agrobacterium rhizogenes. Process Biochem. 2002; 37(8): 805- 12.

26- Flamini G, Cioni PL, Puleio R, Morelli I, Panizzi L. Antimicrobial activity of the essential oil of Calamintha nepeta and its constituent pulegone against bacteria and fungi. Phytother Res. 1999; 13(4): 349-51.

27- Aggarwal KK, Khanuja SPS, Ahmad A, Santha Kumar TR, Gupta VK, Kumar S. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of Mentha spicata and Anethum sowa. Flavour Fragr J. 2002; 17(1): 59-63.

Abstract *Original Article*

Anti-bacterial effect of Mentha spicata L. essence on eight standard species of gastrointestinal pathogens

Majid Zare Bidaki[1], Mina Arab[2], Mohtarame Khazaei[3], Ehsan Afkar[4]

Background and Aim: Mint plant, scientifically called *Mentha spicata L.*, is one of the plants which has many medicinal uses and its antibacterial effects is a matter of debate. Thus the present study aimed at evaluating antibacterial effects of *Mentha spicata L* essence on 8 standard bacterial species including *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, and two *Salmonella* species.

Materials and Methods: In this experimental study, using micro-dilution broth method and reading the results by ELISA reader, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of mint essence were determined against the 8 standard bacterial strains. The lab tests were repeated three times. The obtained results were analyzed by statistical tests.

Results: The MIC for *Mentha spicata L* essence was significantly different among the bacterial species ($P<0.05$). The highest growth inhibitory effect was found against *Bacillus cereus* and the least ones were recorded against *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. No significant difference was found between the bacterial MBCs ($P>0.05$).

Conclusion: The current study revealed significant and selective antibacterial characteristics of *Mentha spicata L* suggesting that it can be used in pharmaceutical and food industries.

Key Words: Menth aspicata L; Essence; Antibacterial effect; MIC; MBC

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2014; 21 (3): 274-282.

Received: July 15, 2014 ***Accepted: December 20, 2014***

[1] *Assistant professor, Hepatitis Research Center, Department of Medical Microbiology, Faculty of paramedics, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran*
[2] *Corresponding author; Student of MSc. in clinical biochemistry, Member of Student Research Committee, Faculty of medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran*
[3] *Bachelor of laboratory sciences, Faculty of paramedics, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran*
[4] *MSc in Statistics, Deputy of Research and Technology, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran*