فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سیزدهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۴

مقاله پژوهشی

ارزیابی تاثیرات آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره گیاه نیلوفر آبی (*Nelumbo nucifera*)

رشید علیجانی اردشیر[۱]*، زهرا کهن‌روز رستمی[۲]، سیده فاطمه میری[۲]، داریوش غلامی[۳]

DOI: 10.22124/japb.2024.27651.1544
تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳

چکیده

با وجود پتانسیل بالایی که گیاهان آبزی می‌توانند در عرصه زیست‌فناوری داشته باشند، مطالعات اندکی بر روی آنها متمرکز شده است. این مطالعه به بررسی تاثیرات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی به دست آمده از دانه گیاه تالابی نیلوفر آبی (*Nelumbo nucifera*) پرداخته است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره با استفاده از آزمون‌های پتانسیل احیای آهن، محتوای فنل و فعالیت مهار رادیکال DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت و ارزیابی‌های ضدباکتریایی با آزمون‌های کمترین غلظت مهاری (MIC) و کمترین غلظت کشندگی (MBC) بررسی شد. نتایج حاکی از اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی عصاره بود (EC_{50} ۲۲۶/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) و در غلظت‌های بالاتر، پتانسیل احیای آهن و محتوای فنل (۱۹۲/۹۳ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره) را افزایش داد. فعالیت ضدباکتریایی علیه *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* مشاهده شد (در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، به طوری که با افزایش غلظت عصاره تاثیرات ضدباکتریایی آن افزایش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). هر چند، با وجود تشکیل هاله برای دیسک آنتی‌بیوتیک، هیچ گونه هاله‌ای برای دیسک حاوی غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره مشاهده نشد. در این مطالعه همچنین محتوای فلاونوئید عصاره مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میزان آن ۵۰/۳ میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره به دست آمد. این یافته‌ها نشان دادند که عصاره اتانولی دانه نیلوفر آبی نه تنها خواص آنتی‌اکسیدانی دارد، بلکه استفاده از غلظت‌های مناسب آن می‌تواند باعث کاهش رشد باکتری شود و دریچه‌ای برای انجام مطالعات آینده بر روی عصاره این گیاه به منظور کاربرد در طب سنتی و صنایع دارویی باز می‌کند.

واژگان کلیدی: *عصاره، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدان، نیلوفر آبی.*

۱- استادیار گروه زیست‌فناوری دریا، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
۲- کارشناس زیست‌فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران.
۳- استادیار گروه زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
* نویسنده مسئول: r.alijani@ausmt.ac

مقدمه

ایران علاوه بر داشتن منابع دریایی در شمال و جنوب دارای منابع آبی گسترده از جمله تالاب‌ها است که می‌تواند به عنوان منبع غنی از ترکیبات زیست‌فعال با کاربردهای مختلف باشند (Sanjerehei and Rundel, 2017; Al-Jaber et al., 2024). هرچند، مطالعات مربوط به ترکیبات زیست‌فعال دریایی گسترده است، ولی مطالعات کمی وجود دارد که بر روی ترکیبات زیست‌فعال به دست آمده از موجودات زنده موجود در تالاب تمرکز کند (Das and Kumar, 2022). در این میان، گیاهان آبزی موجود در تالاب‌ها می‌توانند اهمیت دارویی داشته باشند و در طب سنتی استفاده شوند. گیاهان دارویی حاوی متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، ترپن‌ها، استروئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و غیره هستند (Li et al., 2020). برخی از مواد شیمیایی فنلی یا مشتقات جایگزین اکسیژن آنها مانند تانن‌ها هستند، در حالی که برخی ممکن است حاوی نیتروژن یا گوگرد باشند که از نظر زیستی فعال و برای پیشگیری از بیماری و درمان بیماری مفید هستند (Paudel and Panth, 2015). یکی از گیاهانی که در تالاب‌های ایران بویژه در تالاب‌های شمال ایران به وفور یافت می‌شوند گیاه نیلوفرآبی (*Nelumbo nucifera*) است.

گیاه نیلوفر آبی یک گیاه چندساله آبی متعلق به خانواده Nelumbonaceae است. نیلوفر آبی یک گیاه اقتصادی مهم آبزی است که نه تنها به عنوان یک گل دلپذیر و زینتی، بلکه بخش‌های مختلف آن شامل ریزوم، ساقه، برگ، دانه و شکوفه می‌تواند به عنوان یک منبع دارویی گیاهی با خواص متنوع باشد (Sheikh, 2014). دانه‌های نیلوفر آبی منبع بسیار خوبی برای ترکیبات زیست‌فعال هستند که به دلیل ترکیبات دارویی خاص خود دارای عملکرد همزمان دارو و غذایی هستند (Wang et al., 2023). آنها سرشار از کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، آمینواسیدها و آلکالوئیدها هستند و به طور گسترده‌ای به عنوان محصولات غذایی و دارویی در هند، چین و ژاپن استفاده می‌شوند (Zhang et al., 2023). این دانه‌ها نه تنها حاوی انواع غنی از آمینواسیدهای ضروری، اسیدهای چرب غیراشباع، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها، کلسیم، آهن، روی، فسفر و عناصر کمیاب دیگر هستند بلکه دارای پلی‌ساکاریدهای محلول در آب، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و

اجزای زیست‌فعال دیگر هستند (Kakar et al.,2023). تنوع متابولیت‌های ثانویه متعدد در دانه نیلوفر آبی مانند نوسیفرین، دائوریسین، لینسینین، لوتوسین، پرونوسیفرین، رومرین، آرمپاوین و نفرین (Kaur et al., 2019) گزارش شده است که دارای خواص ضدسرطانی، ضددیابتی (Liu et al., 2016)، محافظت کننده عصبی (Jung et al., 2015)، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی (Moon et al., 2019)، حفظ سلامت دستگاه گوارش (Guo et al., 2019)، ایمنی (Zhao et al., 2016) و غیره هستند. نوشیدنی‌های تهیه شده از گیاه نیلوفر آبی برای از بین بردن گرما و به عنوان داروهای آرام‌بخش و ضدفشار خون در طب سنتی استفاده می‌شود. آلکالوئیدهای موجود در این گیاه مانند نفرین دارای اثر گشادکننده عروق و لینسینین دارای توانایی‌های ضدفشار خون و ضدآریتمی است. از شکوفه نیلوفر آبی برای گرم کردن کلیه و طحال یا به عنوان یک عامل تقویت کننده قلب و عروق در طب سنتی استفاده می‌شود (Bhat et al., 2023).

با وجود اهمیت زیادی که این گیاه در طب سنتی دارد، مطالعات کمی وجود دارد که به بررسی اثرات زیستی عصاره موجود در دانه‌های این گیاه از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی آن تمرکز کند. عواملی که باعث شده تا این مطالعه به این گیاه اختصاص داده شود و این گیاه آبزی را نسبت به گیاهان دارویی دیگر در اولویت قرار دهد، شامل پتانسیل دارویی قسمت‌های مختلف گیاه، پراکنش گسترده در قاره‌های مختلف، عدم وجود مطالعات کافی بر روی این گیاه، تنوع در ترکیبات زیست‌فعال آن، تنوع کاربرد دارویی، آبزی بودن و به دنبال آن مناسب بودن این گیاه به منظور استفاده در صنایع مرتبط (مانند شیلات به منظور افزودن به جیره غذایی ماهیان برای افزایش رشد و ایمنی آنها) از جمله آنها است (Mukherjee et al.,2009; Kaur et al., 2019).

پلی‌فنول‌های موجود در گیاهان دارویی می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان دهند که منجر به مزایای سلامتی بسیاری می‌شود. در سال‌های اخیر ثابت شده است که رادیکال‌های آزاد با منشا داخلی یا خارجی از مهم‌ترین عوامل بروز شرایط آسیب‌زا در بیماری‌های التهابی، دیابت ملیتوس، آترواسکلروز، ایسکمی قلبی و مغزی، سرطان، نقص ایمنی و پیری در انسان هستند. از طرفی ثابت شده است که تعدادی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان شیمیایی دارای عوارض جانبی

هستند. از این رو، یافتن منابع جدید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از اهمیت زیادی برخوردار است (Liguori et al., 2018). موجودات زنده شبکه آنتی‌اکسیدانی پیچیده‌ایی را برای خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که برای زندگی انسان مضر هستند، ایجاد کرده‌اند. آنتی‌اکسیدان‌ها از سیستم‌های زیستی مانند پروتئین، آمینواسید، لیپید و DNA در مقابل صدمات اکسیداتیو تولید شده به وسیله گونه‌های اکسیژن فعال حمایت می‌کنند و منجر به کاهش آسیب و یا مرگ سلولی، بیماری‌های قلبی- عروقی و سرطان‌ها می‌شوند (Zafar et Pammi et al., 2023 ; al., 2023). علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به دلیل مقاومت و عوارض جانبی که میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان می‌دهند در درمان‌های پزشکی به عصاره‌ها و ترکیبات گیاهی با ویژگی‌های زیستی توجه زیادی شده است. باکتری *Escherichia coli* یک باکتری گرم منفی بیماری‌زا است که از طریق غذای آلوده منتقل می‌شود. اپیدمی‌های جهانی این بیماری گزارش شده است. باکتری‌های *Staphylococcus aureus* از جمله باکتری‌های گرم مثبت مهاجم شناخته شده است که در چندین بیماری انسان نقش دارد (Hikaambo et al., 2023).

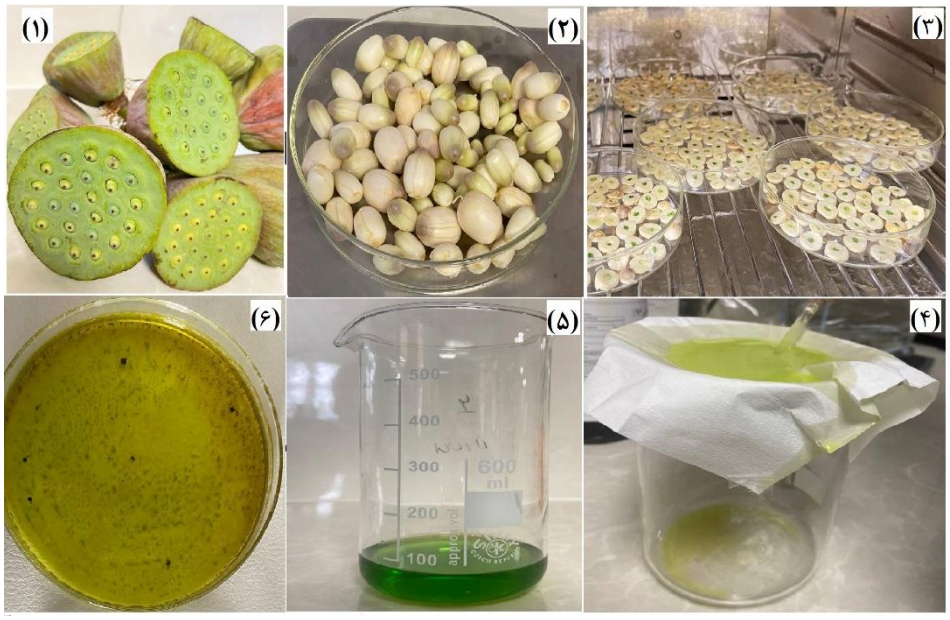
مطالعاتی بر روی عصاره گیاه نیلوفر آبی انجام شده است که نمونه آن مطالعه Rajput و همکاران در سال ۲۰۲۱ است. آنها از حلال اتانول به منظور استخراج عصاره میوه این گیاه استفاده کردند تا فعالیت ضدالتهابی آن را مورد ارزیابی قرار دهند (Rajput et al., 2021). با این وجود، تنها مطالعه انجام شده بر روی خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی دانه نیلوفر آبی در ایران مربوط به مطالعه Mohadjerani و Pakzad در سال ۲۰۱۳ است که آنها از حلال استون به منظور استخراج عصاره این گیاه استفاده کردند. با توجه به اهمیت دارویی گیاه نیلوفر آبی، مطالعه حاضر به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره اتانولی دانه این گیاه پرداخته است.

مواد و روش‌ها

استخراج عصاره الکلی دانه نیلوفر آبی

برای این مطالعه ۱۵ شاخه از گیاه نیلوفر آبی از تالابی در روستای روشن‌آباد شهرستان بابل تهیه و به آزمایشگاه پارک علم و فناوری مازندران (ساری) منتقل شد. دانه‌ها (حاوی

جوانه) از درون غلاف سبز جدا و توزین شدند. سپس ۱۱۳ گرم از دانه‌ها به صورت افقی برش داده شده و به درون آون منتقل شدند تا خشک شوند. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها از آون خارج و با دستگاه آسیاب شده و سپس از الک ۴۰ عبور داده شدند (وزن کل پودر به دست آمده ۳۱/۷ گرم بود). سپس الکل ۹۶ درصد به آن اضافه شد و بعد از بستن درب آن، در جای تاریک قرار گرفت. مخلوط مورد نظر در هر فاصله زمانی ۳۰ دقیقه هم زده شد. بعد از سه روز متوالی قرار گرفتن پودر دانه درون الکل، مخلوط مورد نظر از کاغذ صافی عبور داده شد. عصاره به دست آمده درون پلیت شیشه‌ایی و در دمای محیط آزمایشگاه قرار گرفت تا الکل آن از نمونه جدا شود و نمونه خالص شود (شکل ۱) (Fitri et al., 2021).



شکل ۱: مراحل استخراج عصاره الکلی از دانه نیلوفر آبی. مرحله ۱: جمع‌آوری دانه‌های غلاف‌دار. مرحله ۲: جدا کردن دانه‌ها از غلاف. مرحله ۳: خشک کردن دانه‌های برش داده شده در آون. مرحله ۴: عصاره‌گیری و فیلتر کردن. مرحله ۵: جمع‌آوری عصاره‌ها. مرحله ۶: خشک کردن عصاره.

آزمون احیاکنندگی آهن

۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره در غلظت‌های ۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش توزیع شد. به هر لوله ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استات (pH ۷/۲) و ۱۰۰۰ میکرولیتر پتاسیم فری سیانید اضافه شد و لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به لوله‌ها اضافه شد. از هر لوله ۲۵۰۰ میکرولیتر برداشته و با ۲۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به همراه ۵۰۰ میکرولیتر آهن (III) کلرید ترکیب شد. در نتیجه واکنش احیا کنندگی که در آن یون آهن سه ظرفیتی به یون آهن دو ظرفیتی تبدیل می‌شود، تغییر رنگ سبز- آبی ایجاد می‌شود. در نمونه شاهد به جای عصاره از متانول استفاده شد و باقی ترکیبات یکسان بود. از آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu، ژاپن) خوانده شد (Benzie and Devaki, 2018).

آزمون میزان فنول

۵۰۰ میکرولیتر از عصاره با غلظت‌های ۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش توزیع شد. ۲۵۰۰ میکرولیتر فولین سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu Reagent) به هر لوله افزوده شد. ۵ دقیقه بعد ۲۰۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات به هر لوله اضافه شد و بعد از ۲ ساعت که محلول‌ها در جای تاریک بودند، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Adebiyi et al., 2017). میزان فنول بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد (غلظت‌های ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر). معادله خط منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف گالیک اسید و میزان جذب نوری آن در طول موج ۷۶۰ نانومتر طبق رابط ۱ به دست آمد.

رابطه ۱:

$$y = 0.0046x + 0.16$$

y: میزان گالیک اسید (میلی‌گرم در هرگرم عصاره خشک)؛ x: میزان جذب نوری. (r^2=۰/۹).

آزمون DPPH

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که یک الکترون جفت نشده بر روی یکی از

اتم‌های پل نیتروژنی دارد. مهار رادیکال DPPH پایه و اساس ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است. پایه و اساس این روش این است که رادیکال DPPH به عنوان پذیرنده الکترون از یک مولکول اهدا کننده مانند آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند که در نتیجه آن DPPH به $DPPH_2$ تبدیل می‌شود و در این حالت رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تبدیل می‌شود (Nenadis and Tsimidou, 2018). محلول ۱۰۰ میکرومول در لیتر DPPH در متانول تهیه شد. ۵ میلی‌گرم عصاره توسط متانول به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. غلظت‌های مورد نظر از نمونه تهیه شد. سپس به لوله‌های آزمایش حاوی متانول و نمونه با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ۲ میلی‌لیتر از محلول آماده شده DPPH اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، جذب محتویات لوله‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره (I_{DPPH}) از رابطه ۲ محاسبه شد (Baliyan et al., 2022).

رابطه ۲:

$$I_{DPPH}(\%) = [(AC - AS)/AC] \times 100$$

AC: جذب نوری شاهد (محلول DPPH) ؛ AS: جذب نوری نمونه.

آزمون میزان فلاونوئید

از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل استفاده شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره (۱:۱۰) ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و با هم ترکیب شدند. جذب محلول‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فلاوونوئید (میلی‌گرم در گرم عصاره) بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) محاسبه شد (Adebiyi et al., 2017).

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت کشندگی باکتری

برای تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitor Concentration: MIC) و کمترین غلظت کشندگی باکتری (Minimum Bactericidal Concentration:

MBC) از باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* و گرم مثبت *Staphylococcus aureus* استفاده شد. باکتری‌ها به صورت لیوفیلیزه شده از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه و طبق دستور العمل موجود و با استفاده از محیط کشت نوترینت آگار احیا شدند.

برای تعیین MIC از کشت تازه باکتری *Staphylococcus aureus* و باکتری اشرشیا کلی*Escherichia coli* در محیط نوترینت براث کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد تا کدورتی معادل ۱×۱۰^{۶} باکتری به دست آید. با استفاده از فیلترهای سر سرنگی (با قطر منفذ ۰/۴۵) استوک عصاره با غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استریل شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره شامل ۶/۲۵ ، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. همچنین چاهک‌هایی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط نوترینت براث و باکتری به عنوان شاهد منفی و چاهک‌هایی حاوی عصاره (۸۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و باکتری به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد (غلظت عصاره برای شاهد مثبت بر اساس بیشترین میزانی از عصاره جامد است که قابلیت انحلال کامل را داشته باشد). سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (BioTek، آمریکا) خوانده شد.

برای انجام آزمون MBC، پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار و غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد. از آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون (CRO)، کرامفنیکل (C)، آموکسی‌سیلین (AMX) و پنی‌سیلین (P) به عنوان شاهد مثبت و از آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده شد. بعد از گسترده کردن باکتری‌ها بر روی پلیت‌ها و انتقال دیسک‌های آنتی‌بیوتیک و دیسک‌های دیفیوژن بر روی پلیت‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌ها (با سه تکرار) بر روی دیسک‌های دیفیوژن ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (Hassan et al.,2009).

تجزیه و تحلیل‌های آماری

به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS 22 استفاده شد. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو- ویلک و برای

مقایسه گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P<۰/۰۵) استفاده شد. برای محاسبه EC_{50} از پلتفرم آنلاین محاسبه EC_{50} (https://www.aatbio.com/ tools/ec50-calculator) استفاده شد. رسم نمودارها در نرم‌افزار Microsoft Excel 2019 انجام شد و داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده‌اند.

نتایج

آزمون احیاکنندگی آهن

نتایج مربوط به آزمون احیاکنندگی آهن در شکل ۲ نشان داده شده است. هر چقدر رنگ ترکیب مورد نظر سبزتر باشد، جذب آن بالاتر بوده و میزان آهن آن بیشتر است. نتایج این آزمون نشان داد که با افزایش غلظت عصاره الکلی دانه نیلوفر آبی، قدرت احیاکنندگی آهن نیز افزایش یافت. اگرچه بین گروه‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، با این حال بین گروه‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵) و بیشترین میزان احیا کنندگی آهن در گروه ۸۰۰ مشاهده شد.

میزان فنول

نتایج مربوط به آزمون فنول در شکل ۳ نشان داده شده است. هر چقدر رنگ ترکیب مورد نظر آبی‌تر باشد، جذب آن بالاتر و فنول آن بیشتر بوده و در نتیجه آنتی‌اکسیدان آن بیشتر است. بین تمامی گروه‌ها اختلاف معنی‌داری در میزان فنول وجود داشت و با افزایش غلظت عصاره، میزان فنول افزایش نشان داد (P<۰/۰۵).

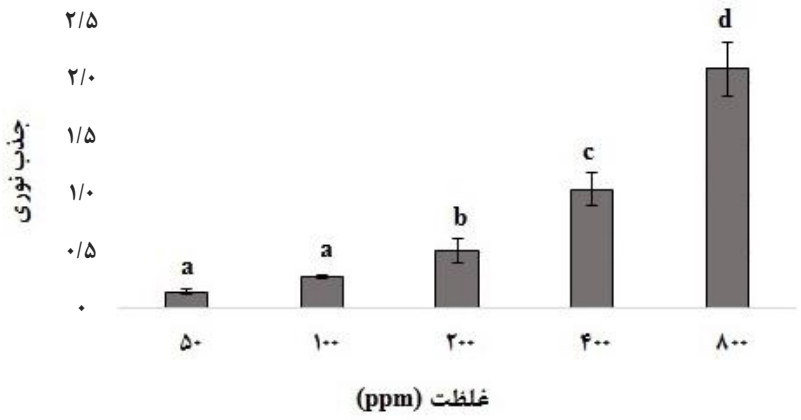
بر اساس معادله خط منحنی استاندارد، میزان فنول موجود در عصاره ۱۹۲/۹۳ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره محاسبه شد.

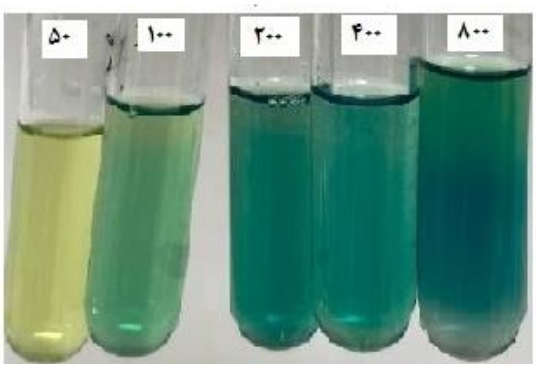
میزان فلاونوئید

نتایج مربوط به آزمون فلاونووئید در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج این آزمون نشان داد که با افزایش غلظت عصاره الکلی دانه نیلوفر آبی، میزان فلاونوئید عصاره افزایش یافت. هر چند، تنها بین بالاترین غلظت عصاره (۴۰۰ و ۸۰۰) و کمترین غلظت عصاره از نظر

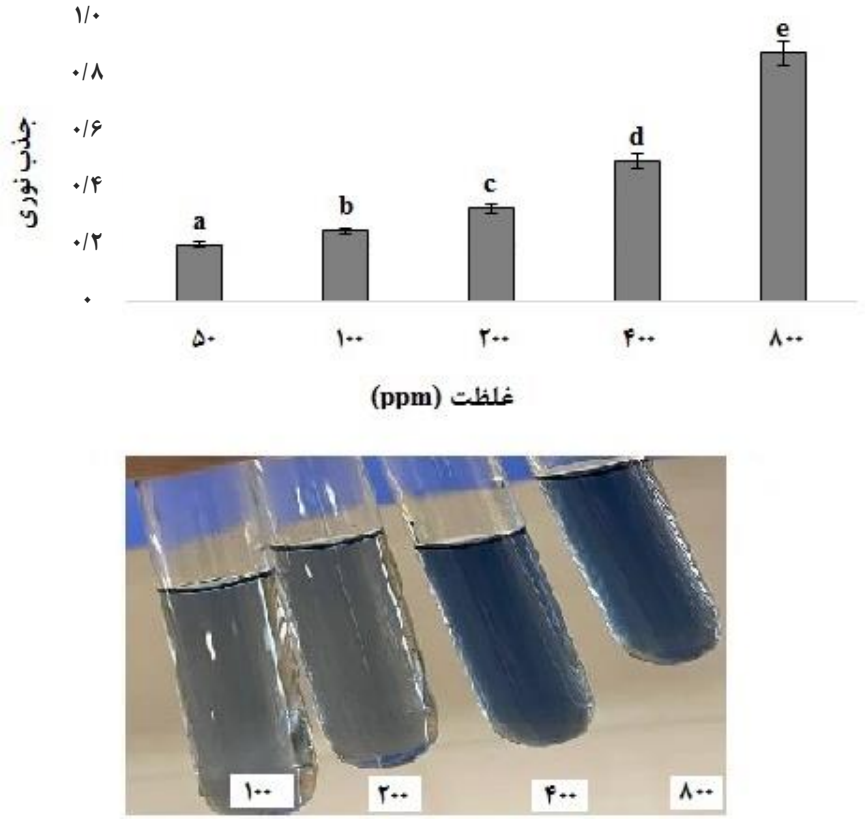
میزان فلاونوئید اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵).

معادله خط منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف کوئرستین (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و میزان جذب نوری آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر (R^2=۰/۹۰) y=0.0003x+0.05 بود که بر اساس این معادله میزان فلاونوئید موجود در عصاره ۵۰/۳ میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره محاسبه شد.

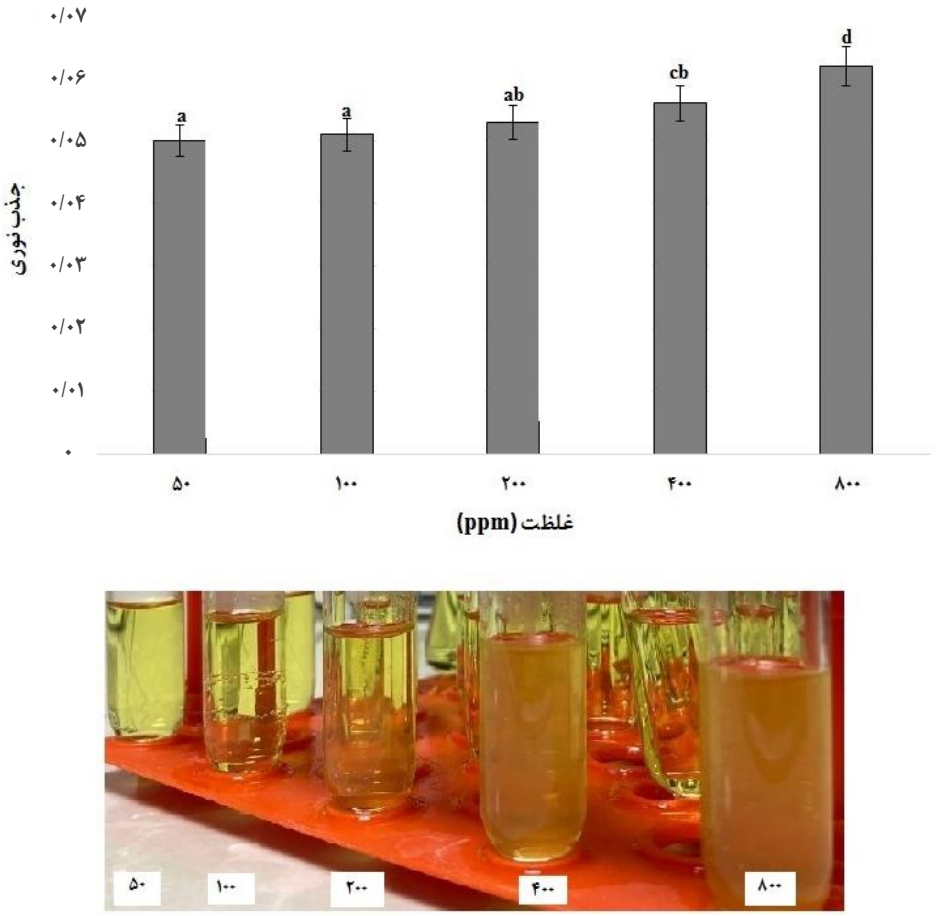




شکل ۲: نتایج آزمون احیا کنندگی آهن برای غلظت‌های مختلف عصاره الکلی استخراج شده از دانه نیلوفر آبی. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است (P<۰/۰۵).



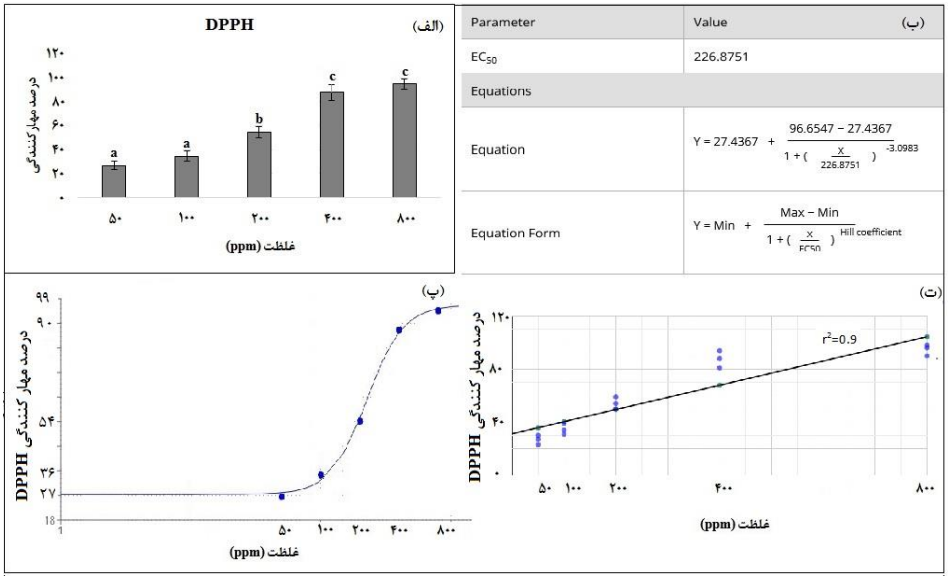
شکل ۳: نتایج آزمون فنول برای غلظت‌های مختلف عصاره الکلی استخراج شده از دانه نیلوفر آبی. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است (P<۰/۰۵).



شکل ۴: نتایج آزمون فلاوونوئید برای غلظت‌های مختلف عصاره الکلی استخراج شده از دانه نیلوفر آبی. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است (P<۰/۰۵).

درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

نتایج مربوط به آزمون احیاکنندگی آهن در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج این آزمون نشان داد که با افزایش غلظت عصاره الکلی دانه نیلوفر آبی، درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره نیز افزایش یافت، به طوری که در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH به بیش از ۹۵ درصد رسید.



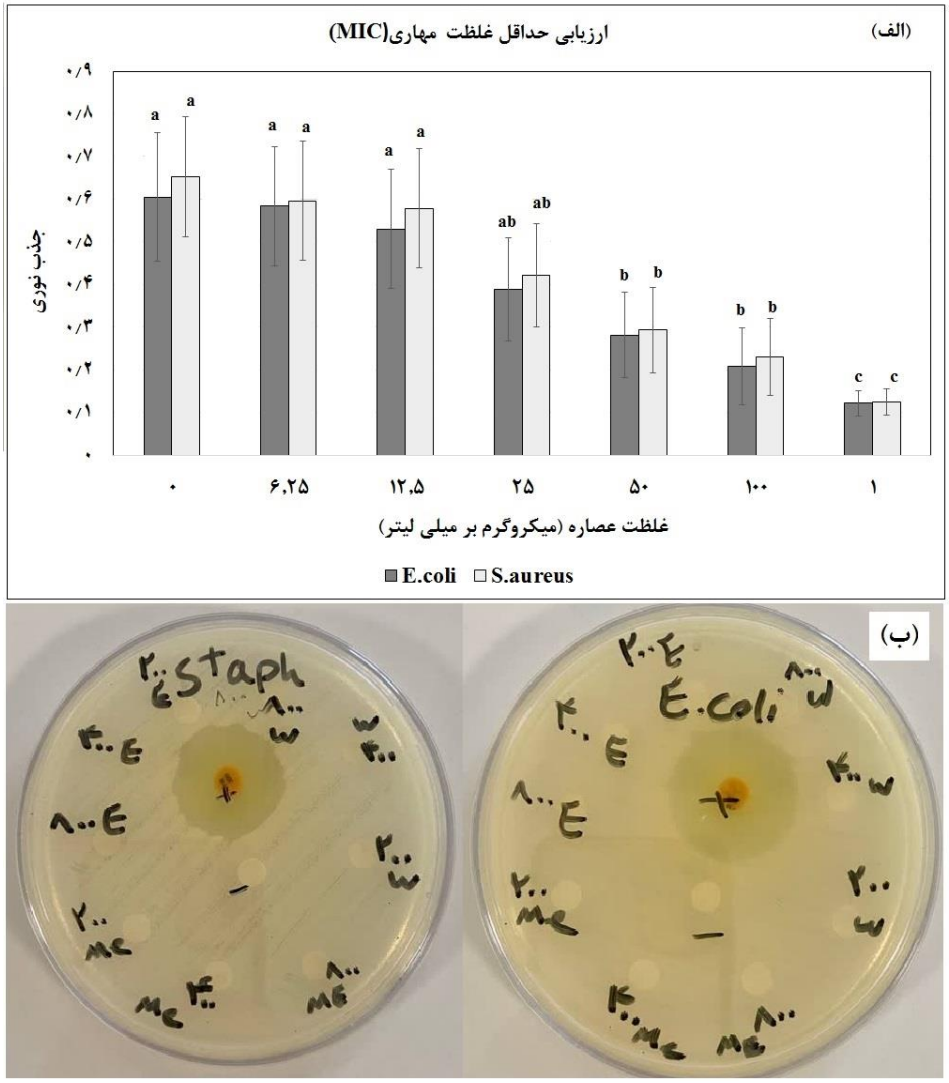
شکل ۵: خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره. الف) نتایج آزمون مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH برای غلظت‌های مختلف عصاره الکلی استخراج شده از دانه نیلوفر آبی. ب) معادلات مربوط به محاسبه EC_{50} . پ) نمودار مربوط به محاسبه EC_{50}. ت) نمودار رگرسیون. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است (P<۰/۰۵).

مطابق با شکل ۵- ب، میزان EC_{50} برای عصاره الکلی دانه نیلوفر آبی ۲۲۶/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

ارزیابی تاثیرات ضدباکتریایی عصاره دانه نیلوفر آبی

نتایج مربوط به ارزیابی کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت کشندگی (MBC) عصاره الکلی دانه نیلوفر آبی در شکل ۶- الف و ب نشان داده شده است.

مطابق با شکل ۶- الف هر چند با افزایش غلظت عصاره تاثیرات ضدباکتریایی آن افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵)، اما تاثیرات آن در غلظت بیشینه ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در حد MIC نبود. از طرف دیگر، مطابق با شکل ۶- ب با وجود تشکیل هاله برای دیسک آنتی‌بیوتیک، هیچ گونه هاله‌ای برای دیسک حاوی غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده نشد.



شکل ۶: خاصیت ضدباکتریایی عصاره. الف) ارزیابی کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره نیلوفر آبی برای دو گونه باکتری *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*. شاهد منفی فاقد عصاره است و شاهد مثبت دارای غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره است. صفر: شاهد منفی؛ ۱: شاهد مثبت. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها است (P<۰/۰۵). ب) ارزیابی کمترین غلظت کشندگی (MBC) عصاره نیلوفر آبی برای دو گونه باکتری *Escherichia coli* و *Staphylococcus*

***aureus*. تشکیل هاله مربوط به آنتی‌بیوتیک است، در حالی که در غلظت‌های مختلف عصاره که با حلال‌های آبی (W)، اتانولی (E) و متانولی (Me) استخراج شده‌اند، هاله تشکیل نشده است.**

بحث

با وجود پتانسیلی که موجودات زنده تالاب‌ها می‌توانند در عرصه زیست‌فناوری داشته باشند مطالعات اندکی بر روی آنها متمرکز شده است. گیاه نیلوفر آبی از جمله گیاهان تالاب است که بخش‌های مختلف آن قابلیت استخراج ترکیبات زیست‌فعال را با پتانسیل دارویی دارد. این مطالعه تلاش کرده است تا شکاف تحقیقاتی که در مورد تاثیرات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره الکلی به دست آمده از دانه (حاوی جوانه) وجود داشته را پر کند.

نتایج مطالعه کنونی در مورد پتانسیل احیاکنندگی آهن نشان از قدرت بالای عصاره الکلی دانه نیلوفر آبی دارد، به طوری که با افزایش غلظت عصاره از ۲۰۰ به ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (افزایش ۴ برابری)، خاصیت احیاکنندگی به بیش از ۴ برابر افزایش یافت. در مطالعه ای که Adebiyi و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی عصاره اتانولی گیاه *Grewia carpinifolia* انجام دادند، مشخص شد که با افزایش ۵ برابری غلظت عصاره (از ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، پتانسیل احیاکنندگی آهن عصاره این گیاه حدود ۳ برابر افزایش یافت. در مطالعه دیگر، Aparadh و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که با افزایش ۵ برابری غلظت عصاره گیاه علف مار *Polygonum hydropiper* (از ۱۰۰ به ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، پتانسیل احیاکنندگی آهن تا ۴ برابر افزایش یافت. در مقایسه با این دو مطالعه، نتایج مطالعه کنونی نشان داد که عصاره دانه نیلوفر آبی دارای پتانسیل احیاکنندگی بالا است (معیار مورد مقایسه برای این سه مطالعه صرفا جذب نوری بوده است). در روش احیاکنندگی آهن از یک واکنش اکسیداسیون احیا استفاده می‌شود که با تغییر رنگ همراه است. زمانی که احیاکننده واکنش (آنتی‌اکسیدان) الکترون خود را اهدا می‌کند ماده‌ای تولید می‌شود که آبی رنگ بوده و به راحتی می‌توان شدت رنگ تولید شده که نشان دهنده پیشرفت واکنش و ظرفیت بالای ماده برای احیای آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی است را اندازه گرفت (Adebiyi et al.,2017; Sethi et al., 2020). آهن تغییرات اکسیداتیو را در لیپیدها، پروتئین‌ها و دیگر اجزای سلولی کاتالیز می‌کند. علاوه بر این، پراکسیداسیون

لیپیدی توسط واکنش فنتون که در آن آهن یک واکنش دهنده است، القا می‌شود (Rynkowska et al., 2020). با توجه به نتایج آزمون احیاکنندگی آهن، به نظر می‌رسد که عصاره دانه نیلوفر آبی میزان پراکسیدهای از پیش ساخته شده را کاهش می‌دهد و یا منجر به کاهش آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی می‌شود. در کل ویژگی‌های احیاکنندگی با حضور ترکیبات اهداکننده الکترون همراه است. به عبارتی با افزایش میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره، قدرت احیاکنندگی آن افزایش می‌یابد، در نتیجه عصاره قادر خواهد بود با اهدای تعداد بیشتری الکترون یا اتم‌های هیدروژن واکنش‌های زنجیری تشکیل رادیکال‌های آزاد را شکسته و اکسیداسیون چربی را به تاخیر بیاندازد (Ulewicz-Magulska and Wesolowski, 2019). میزان قابل توجه فنول سنجش شده در مطالعه کنونی از این فرضیه حمایت می‌کند.

محتویات متابولیت دانه‌های نیلوفر آبی نسبتا ناشناخته باقی مانده است و اطلاعات در مورد روند تجمع متابولیت‌ها از جمله پروآنتوسیانیدین‌ها و فلاونوئیدها در دانه نیلوفر آبی وجود ندارد (Yu et al., 2022). هر چند، مطالعاتی در این زمینه بر روی غلاف و برگ گیاه نیلوفر آبی انجام شده است (Lee et al., 2015; Ruvanthika and Manikandan, 2019). طبق نتایج به دست آمده از آزمون فنول و فلاونوئید عصاره اتانولی دانه نیلوفر آبی، مطالعه کنونی نشان داد که این مقدار فنول و فلاونوئید موجود در این عصاره به ترتیب ۱۹۲/۹۳ میلی‌گرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم عصاره و ۵۰/۳ میلی‌گرم کوئرستین در هر میلی‌گرم عصاره بود. Pourmorad و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که میزان فنول و فلاوونوئید موجود در برخی از گیاهان دارویی ایران به ترتیب در محدوده ۲۴ تا ۲۸۹ میلی‌گرم در گرم و ۲۵ تا ۷۸ میلی‌گرم در گرم عصاره بوده است. Asadi-Samani و همکاران در سال ۲۰۱۹ به بررسی میزان فنول و فلاونوئید ۲۰ گونه گیاه دارویی در ایران پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که در میان این ۲۰ گونه، گیاه *Stachys inflate* دارای بیشترین فنول به میزان ۸۷ میلی‌گرم در گرم و گیاه *Urtica dioica* دارای بیشترین فلاوونوئید به میزان ۸۱ میلی‌گرم در گرم بوده است. در مقایسه با این گیاهان دارویی، به نظر می‌رسد که دانه گیاه نیلوفر آبی از نظر میزان فنول و فلاوونوئید غنی است. ترکیبات فنولی به عنوان یکی از مواد آنتی‌اکسیدان موجود در

گیاهان است. ترکیبات فنلی شامل فنل‌های ساده و اسیدهای فنولیک، مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید و فلاونوئیدها مواد فعال زیستی هستند که به طور گسترده در گیاهان غذایی یافت می‌شوند. بسیاری از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان منابع خوبی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند و مهم‌ترین فعالیت زیستی ترکیبات فنلی احتمالا اثرات بازدارندگی فراوان مشاهده شده آنها بر جهش‌زایی و سرطان‌زایی است (Salehi et al., 2019). فنول‌ها و مشتقات آنها از جمله فلاونوئیدها به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل در ساختار خود به عنوان عوامل احیاکننده قوی قادر به مهار رادیکال‌های آزاد هستند. این مواد همچنین با تشکیل کمپلکس با ترکیبات پروتئینی از جمله در آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و لیپوکسیژناز (موثر در اکسیداسیون) در فرایند اکسیداسیون اختلال ایجاد می‌کنند (Tanavar et al., 2020).

نتایج به دست آمده از آزمون DPPH پتانسیل بالای دانه نیلوفر آبی را در مهار این نوع رادیکال آزاد نشان می‌دهد. Mohadjerani و Pakzad (۲۰۱۳) به بررسی تاثیر استفاده از حلال‌های مختلف بر روی میزان فنول و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه نیلوفر آبی پرداختند. مطالعه آنها نشان داد که استفاده از حلال‌های مختلف می‌تواند تاثیر معنی‌داری بر روی میزان فنول و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه نیلوفر آبی داشته باشد، به طوری که EC_{50} مربوط به DPPH در محدوده ۴ تا ۴۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود است (Mohadjerani and Pakzad, 2013). مطالعه‌ای که در قاره آمریکای جنوبی بر روی عصاره گیاهان دارویی شمال شرقی مکزیک صورت گرفت نشان داد که EC_{50} مربوط به DPPH برای ۱۷ گونه گیاهی در محدوده ۳۱ تا ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (Salazar-Aranda et al., 2011). مطالعه دیگری خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گیاه نیلوفر آبی را مورد ارزیابی قرار داد و نشان داد که EC_{50} مربوط به DPPH در محدوده ۹ تا ۲۹ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (Lin et al., 2009). هر چند نتایج این دو مطالعه نشان از خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتر عصاره گیاه نیلوفر آبی نسبت به نتایج مطالعه کنونی داشته است، اما این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت در اعضای مورد استفاده از گیاه (ریزوم، برگ، ساقه، و پوسته دانه)، حلال متفاوت و حتی تفاوت جغرافیایی منطقه رشد گیاه باشد. Zhao و

همکاران (۲۰۱۴) به بررسی تاثیر منطقه جغرافیایی (شامل چین، تایوان، ژاپن، ویتنام، کره و تایلند) بر روی میزان استخراج عصاره اتانولی گیاه نیلوفر آبی و خواص آنتی‌اکسیدانی آن پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که تاثیر جغرافیایی دارای تاثیر معنی‌داری بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی و میزان فنول عصاره اتانولی گیاه نیلوفر آبی داشت، به طوری که میزان EC_{50} مربوط به DPPH در محدوده ۱۳۴ تا ۲۱۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (Zhao et al., 2014). استفاده از حلال اتانول منجر به نتایج نزدیک به مطالعه کنونی شده است.

نتایج آزمون ضدباکتریایی در مطالعه کنونی نشان داد که عصاره اتانولی در غلظت‌های آزمایش شده بالاتر از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای تاثیر معنی‌دار در کاهش جمعیت باکتری‌های گرم مثبت و منفی بود. هرچند، در غلظت‌های آزمایش شده رسیدن به کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت کشندگی (MBC) موفقیت‌آمیز نبود. مطالعه قبلی که بر روی عصاره الکلی ۶ گیاه دارویی صورت گرفت، نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره‌ها برای دو گونه باکتری بررسی شده در محدوده ۶۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (Ongsakul et al., 2009). مطالعه گذشته بر روی روغن دانه نیلوفر آبی نشان داد که این روغن دارای پتانسیل ضدباکتریایی (کاهش رشد) به منظور سرکوب خاصیت بیماری‌زایی آنها با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است (نتایج این مطالعه شبیه مطالعه کنونی است) (Arumugam and Dhailappan, 2012). از طرف دیگر مطالعه‌ای که بر روی خواص ضدباکتریایی عصاره غلاف پوشاننده دانه این گیاه صورت گرفت، نشان داد که این عصاره در غلظت کم نه تنها دارای خواص ضدباکتریایی علیه باکتری *E. coli* نبود، بلکه باعث افزایش رشد آن نیز شد (دارای خواص پری‌بیوتیکی بود). اما در غلظت‌های بالاتر از ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث بروز خواص ضدباکتریایی شد. این مورد در باکتری سویه‌های *Lactobacillus* نیز گزارش شده است، به طوری که در غلظت‌های ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث افزایش رشد این باکتری شد. مکانیسم اثر عصاره غلاف دانه‌های نیلوفر آبی در برابر سویه‌های ETEC (Enterotoxigenic *Escherichia coli*) به دلیل اختلال در ساختار و همچنین عملکرد غشای پلاسمایی است (Tang et al., 2017).

یکی از ترکیباتی که در گیاهان اثرات ضدمیکروبی دارند، فنول‌ها هستند. اثرات ضدمیکروبی ترکیبات فنولی بستگی به محل و تعداد گروه‌های هیدروکسیل روی حلقه فنلی دارد و ادعا شده است که ارتباط مستقیمی بین تعداد گروه‌های هیدروکسیل و سمیت آنها روی میکروارگانیسم‌ها وجود دارد (Tungmunnithum et al., 2018). عوامل متعددی همچون میزان اسانس گیاه، روش عصاره‌گیری، نوع حلال مورد استفاده، نوع محیط کشت و مواد موجود در آن و غلظت عصاره، در اثرات ضدمیکروبی یک گیاه موثر است (Vaou et al., 2021). ممکن است طرز قرارگیری هیدروکسیل ترکیبات فنولی موجود در دانه نیلوفر آبی در نتایج میکروبی موثر بوده باشد و یا که ممکن است واکنش‌های پروتئین‌ها (آمینواسیدها) و مواد معدنی موجود در عصاره مورد نظر با فنول به افزایش میزان فنول کمک کند. از طرفی دیگر، واکنش فنول با دیگر مواد موجود در عصاره ممکن است اثر ضدمیکروبی فنول را خنثی کند (Ferreira et al., 2017).

در مجموع، نتایج مطالعه کنونی نشان داد که عصاره اتانولی دانه نیلوفر آبی با داشتن میزان فنول (۱۹۲/۹۳ میلی‌گرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم عصاره) و فلاوونوئید (۵۰/۳ میلی‌گرم کوئرستین در هر میلی‌گرم عصاره) بالا دارای پتانسیل احیاکنندگی و آنتی‌اکسیدانی بالا (EC_{50} برای عصاره الکلی دانه نیلوفر آبی ۲۲۶/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) است و با وجود منفی بودن تشکیل هاله (نتیجه MBC)، تا حدی می‌تواند به عنوان یک عامل ضدباکتریایی (در غلظت۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در نظر گرفته شود. نظر به این پتانسیل مشاهده شده در این گیاه، مطالعات آینده به سمت پژوهش‌های گسترده‌تر بر روی این گیاه تالاب ضرورت پیدا کرده است تا بتواند جایگاه احتمالی خود را از نظر دارویی و غذایی کسب کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از آزمایشگاه پارک علم و فناوری مازندران بابت همکاری و مساعدت در انجام مراحل آزمایشگاهی این مطالعه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

Adebiyi O.E., Olayemi F.O., Ning-Hua T. and Guang-Zhi Z. 2017. In vitro antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 6: 10–14. doi: 10.1016/j.bjbas.2016.12.003

Al-Jaber H., Abu-Rub L., Kunhipurayil H.H., Eltai N.O., Abo El Alaa R.S. and Al-Mansoori L. 2024. Medicinal properties of Qatari wetland plants: A review. 12: 24–35. doi: 10.22271/ flora.2024.v12.i2a.927

Aparadh V.T., Naik V.V. and Karadge B.A. 2012. Antioxidative properties (TPC, DPPH, FRAP, metal chelating ability, reducing power and TAC) within some *Cleome* species. Annali di Botanica, 2: 49–56. doi: 10.4462/ annbotrm-9958

Arumugam A. and Dhailappan A. 2012. Fatty acid composition and antidermatophytic and anti-diarrheal activity of *Nelumbo nucifera* seed oil. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4: 264–270.

Asadi-Samani M., Rafieian-Kopaei M., Lorigooini Z. and Shirzad H. 2019. A screening to determine total phenol and flavonoid content of some Iran's medicinal plants grown in Chaharmahal va Bakhtyari province. Indian Journal of Natural Products and Resources, 9: 296–302.

Baliyan S., Mukherjee R., Priyadarshini A., Vibhuti A., Gupta A., Pandey R.P. and Chang C.M. 2022. Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. Molecules, 27: 1–19 (1326). doi: 10.3390/molecules27041326

Benzie I.F. and Devaki M. 2018. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: Concepts, procedures, limitations and applications. Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications, 11: 77–106. doi: 10.1002/9781119135388.ch5

Bhat S., Joghee S. and Iyer M.S. 2023. The therapeutic potential of *Nelumbo nucifera*: A comprehensive review of its phytochemistry and medicinal properties. International Journal of Health and Allied Sciences, 12: 58–65. doi: 10.55691/2278-344X.1059

Das G. and Kumar A. 2022. Wetland flora of West Bengal for phytoremediation: Physiological and biotechnological studies-

A review. Biotechnological Innovations for Environmental Bioremediation, 4: 455–485. doi: 10.1007/978-981-16-9001-3_19

Ferreira I.C., Martins N. and Barros L. 2017. Phenolic compounds and its bioavailability: In vitro bioactive compounds or health promoters? Advances in Food and Nutrition Research, 82: 1–44. doi: 10.1016/bs.afnr.2016.12.004

Fitri K., Khairani T.N., Sianturi K.T., Leny L. and Hafiz I. 2021. Anti-inflammatory activity of ethanol extract of lotus (*Nelumbo nucifera* G.) seed against white male rats using paw edema method. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 11: 1–4. doi: 10.2227 0/jddt.v11i4.4918

Guo Z., Jia X., Lin X., Chen B., Sun S. and Zheng B. 2019. Insight into the formation, structure and digestibility of lotus seed amylose-fatty acid complexes prepared by high hydrostatic pressure. Food and Chemical Toxicology, 128: 81–88. doi: 10.1016/j.fct.2019.03.052

Hassan A., Rahman S., Deeba F. and Mahmud S. 2009. Antimicrobial activity of some plant extracts having hepatoprotective effects. Journal of Medicinal Plants Research, 3: 20–23.

Hikaambo C.N.A., Chilala P., Ndubi F., Mayoka G., Kampamba M., Kabuka R., Chabalenge B. and Mudenda S. 2023. Antimicrobial activities of *Solanum aculeastrum* fruit extract against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: Significance of African traditional medicine in combating infections and attaining universal health coverage. Pharmacology and Pharmacy, 14: 176–188. doi: 10.4236/pp.2023.145013

Jung H.A., Karki S., Kim J.H. and Choi J.S. 2015. BACE1 and cholinesterase inhibitory activities of *Nelumbo nucifera* embryos. Archives of Pharmacal Research, 38: 1178–1187. doi: 10.1007/s12272-014-0492-4

Kakar M.U., Karim H., Shabir G., Iqbal I., Akram M., Ahmad S., Shafi M., Gul P., Riaz S., Rehman R.U. and Salari H. 2023. A review on extraction, composi-tion, structure, and biological activities of polysaccharides from different parts of *Nelumbo nucifera*. Food Science and Nutrition, 11: 3655–3674. doi: 10. 1002/fsn3.3376

Kaur P., Kaur L., Kaur N., Singh A., Kaur J., Kaur H., Kaur N. and Kaur M. 2019. A brief review on pharmaceutical uses of *Nelumbo nucifera*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8: 3966–3972.

Lee D.B., Kim D.H. and Je J.Y. 2015. Antioxidant and cytoprotective effects of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves phenolic fraction. Preventive Nutrition and Food Science, 20: 22–28. doi: 10.3746/pnf.2015.20.1.22

Li Y., Kong D., Fu Y., Sussman M.R. and Wu H. 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiology and Biochemistry, 148: 80–89. doi: 10. 1016/j.plaphy.2020.01.006

Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D. and Abete P. 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. Clinical Interventions in Aging, 13: 757–772. doi: 10.2147/CIA.S158513

Lin H.Y., Kuo Y.H., Lin Y.L. and Chiang W. 2009. Antioxidative effect and active components from leaves of lotus (*Nelumbo nucifera*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 6623–6629. doi: 10. 1021/jf900950z

Liu X., Song X., Lu J., Chen X., Liang E., Liu X., Zhang M., Zhang Y., Du Z. and Zhao Y. 2016. Neferine inhibits proliferation and collagen synthesis induced by high glucose in cardiac fibroblasts and reduces cardiac fibrosis in diabetic mice. Oncotarget, 7(38): 61703–61715. doi: 10.18632/oncotarget.11225

Mohadjerani M. and Pakzad K. 2013. Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* seed from north of Iran. Applied Chemistry Today, 7: 45–49. doi: 10.22075/chem.2017. 626

Moon S.W., Ahn C.B., Oh Y. and Je J.Y. 2019. Lotus (*Nelumbo nucifera*) seed protein isolate exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages via inhibiting NF-κB and MAPK pathways, and upregulating catalase activity. International Journal of Biological Macromolecules, 134: 791–797. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.094

Mukherjee P.K., Mukherjee D., Maji A.K., Rai S. and Heinrich M. 2009. The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*)-phytochemical and therapeutic profile. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 61: 407–422. doi: 10.1211/jpp.61.04.00 01

Nenadis N. and Tsimidou M.Z. 2018. DPPH (2, 2-di (4-tert-octyl phenyl)-1-picrylhydrazyl) radical scavenging mixed-mode colori-metric assay (s). Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications, 11: 141–164. doi: 10.1002/97811191 35388.ch8

Ongsakul M., Jindarat A. and Rojanaworarit C. 2009. Antibacterial effect of crude alcoholic and aqueous extracts of six medicinal plants against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Journal of Health Research, 23(3): 153–156.

Pammi S.S., Suresh B. and Giri A. 2023. Antioxidant potential of medicinal plants. Journal of Crop Science and Biotechnology, 26: 13–26.

Paudel K.R. and Panth N. 2015. Phytochemical profile and biological activity of *Nelumbo nucifera*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015: 1–16 (789124). doi: 10.1155/2015/789124

Pourmorad F., Hosseinimehr S.J. and Shahabimajd N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology, 5: 1142–1145.

Rajput M.A., Zehra T., Fizzah A.L.I. and Kumar G. 2021. Evaluation of antiinflammatory activity of ethanol extract of *Nelumbo nucifera* fruit. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 18(1): 56–60. doi: 10.4274/tjps.galenos.2019.47108

Ruvanthika P.N. and Manikandan S. 2019. A study on antioxidant activity, phenol, and flavonoid content of seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Drug Invention Today, 11(4): 835–840.

Rynkowska A., Stępniak J. and Karbownik-Lewinska M. 2020. Fenton reaction-induced oxidative damage to membrane lipids and protective effects of 17β-estradiol in porcine ovary and thyroid homogenates. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17: 1–9 (6841). doi: 10.3390/ijerph17186841

Salazar-Aranda R., Perez-Lopez L.A., Lopez-Arroyo J., Alanis-Garza B.A. and Waksman De Torres N. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011: 1–6 (536139). doi: 10.1093/ecam/nep127

Salehi B., Vlaisavljevic S., Adetunji C.O., Adetunji J.B., Kregiel D., Antolak H., Pawlikowska E., Uprety Y., Mileski K.S., Devkota H.P. and Sharifi-Rad J. 2019. Plants of the genus Vitis: Phenolic compounds, anticancer properties and clinical relevance. Trends in Food Science and Technology, 91: 362–379. doi: 10.1016/j.tifs.2019.07.042

Sanjerehei M.M. and Rundel P.W. 2017. The future of Iranian wetlands under climate change. Wetlands Ecology and

Management, 25: 257–273. doi: 10. 1007/s11273-016-9514-y

Sethi S., Joshi A., Arora B., Bhowmik A., Sharma R.R. and Kumar P. 2020. Significance of FRAP, DPPH, and CUPRAC assays for antioxidant activity determination in apple fruit extracts. European Food Research and Technology, 246: 591–598. doi: 10.1007/s00217-020-03432-z

Sheikh S.A. 2014. Ethno-medicinal uses and pharmacological activities of lotus (*Nelumbo nucifera*). Journal of Medicinal Plants Studies, 2: 42–46.

Tanavar H., Barzegar H., Alizadeh Behbahani B. and Mehrnia M.A. 2020. Mentha pulegium essential oil: Chemical composition, total phenolic and its cytotoxicity on cell line HT2. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 16: 643–653. doi: 10.22067/ifstrj.v16i5. 84722

Tang C., Xie B. and Sun Z. 2017. Antibacterial activity and mechanism of B-type oligomeric procyanidins from lotus seedpod on enterotoxigenic *Escherichia coli*. Journal of Functional Foods, 38: 454–463. doi: 10.1016/j.jff.2017. 09.046

Tungmunnithum D., Thongboonyou A., Pholboon A. and Yangsabai A. 2018. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. Medicines, 5: 1–16 (93). doi: 10.3390/medicines 5030093

Ulewicz-Magulska B. and Wesolowski M. 2019. Total phenolic contents and antioxidant potential of herbs used for medical and culinary purposes. Plant Foods for Human Nutrition, 74: 61–67. doi: 10.1007/s11130-018-0699-5

Vaou N., Stavropoulou E., Voidarou C., Tsigalou C. and Bezirtzoglou E. 2021. Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. Microorganisms, 9(10): 1–28 (2041). doi: 10.3390/microorganisms 9102041

Wang M., Hu W.J., Wang Q.H., Yang B.Y. and Kuang H.X. 2023. Extraction, purification, structural characteristics, biological activities, and application of the polysaccharides from *Nelumbo nucifera* Gaertn. (lotus): A review. International Journal of Biological Macromolecules, 226: 562–579. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.12.072

Yu Y., Wei X., Liu Y., Dong G., Hao C., Zhang J., Jiang J., Cheng J., Liu A. and Chen S. 2022. Identification and quantification of oligomeric proanthocyanidins, alkaloids, and flavonoids in lotus seeds: A potentially rich source of bioactive compounds. Food Chemistry, 379:

132124. doi: 10.10 16/j.foodchem.2022.132124

Zafar F., Asif H.M., Shaheen G., Ghauri A.O., Rajpoot S.R., Tasleem M.W., Shamim T., Hadi F., Noor R., Ali T. and Gulzar M.N. 2023. A comprehensive review on medicinal plants possessing antioxidant potential. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 50: 205–217. doi: 10.1111/1440-1681.13 743

Zhang Y., Xu Y., Wang Q., Zhang J., Dai X., Miao S. and Lu X. 2023. The antioxidant capacity and nutrient composition characteristics of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seed juice and their relationship with color at different storage temperatures. Food Chemistry, 18: 1–14 (100669). doi: 10.1016/j.fochx.2023. 100669

Zhao X., Feng X., Peng D., Liu W., Sun P., Li, G., Gu L. and Song J.L. 2016. Anticancer activities of alkaloids extracted from the Ba lotus seed in human naso-pharyngeal carcinoma CNE-1 cells. Experimental and Therapeutic Medicine, 12: 3113–3120. doi: 10.3892/etm.2016.3727

Zhao X., Shen J., Chang K.J. and Kim S.H. 2014. Comparative analysis of antioxidant activity and functional components of the ethanol extract of lotus (*Nelumbo nucifera*) from various growing regions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62: 6227–6235. doi: 10.1021/jf501644t

Aquatic Physiology and Biotechnology

Vol. 13, No. 1, Spring 2025

Research Paper

Evaluation of the antioxidant and antibacterial effects of lotus (*Nelumbo nucifera*) extract

Rashid Alijani Ardeshir[1]*, Zahra Kohanrouz Rostami[2], Seyedeh Fatemeh Miri[2], Darioush Gholami[3]

DOI: 10.22124/japb.2024.27651.1544

Received: June 2024 Accepted: September 2024

Abstract

Despite the high potential that aquatic plants can have in the field of biotechnology, few studies have been focused on this area. This study has investigated the antibacterial and antioxidant effects of the ethanolic extract obtained from the seeds of the wetland plant lotus (*Nelumbo nucifera*). The antioxidant activity of this extract was evaluated using tests including iron reduction potential, phenol content and DPPH radical scavenging activity. Antibacterial activity was evaluated using minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests. The results indicated high antioxidant effects of the extract (EC_{50}: 226.8µg/mL) and increased iron reduction potential and phenol content (192.93mg of gallic acid per g of extract). Antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was observed (at the concentrations of 50µg/mL) in which the increase in the concentration of the extract led to the increase of its antibacterial effects significantly ($P<0.05$). However, despite the halo formation for the antibiotic disc, no halo was observed for the disc containing the concentrations of 200, 400 and 800µg/mL extract. In this study, also the flavonoid content of the extract was analyzed and its level obtained 50.3mg of quercetin per g of extract. These findings showed that the ethanolic extract of lotus seeds not only has antioxidant properties, but the use of appropriate concentrations can reduce the growth of bacteria, and open a window for future studies on the extract of this plant for use in traditional medicine and pharmaceutical industries.

Key words: *Extract, Antibacterial, Antioxidant, Lotus.*

1- Assistant Professor in Department of Marine Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

2- B.Sc. in Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

*Corresponding Author: r.alijani@ausmt.ac