مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی برگ گیاه *Mentha longifolia* (L.) Hud. در رویشگاه‌های مختلف شمال ایران

پریسا تربتی‌نژاد[۱]، سیده‌معصومه میرتقی[۱]، فصیحه لیوانی[۲]، هانیه باقری*[۳]

[۱] کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

[۲] کارشناس‌ارشد علوم گیاهی، واحد گرگان ، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

[۳] کارشناس‌ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۸

چکیده

عفونت‌های ادراری و مقاومت آنتی بیوتیکی در دنیا رو به افزایش است. در این میان نقش فرآورده‌های گیاهی به واسطه داشتن طیف وسیعی از ترکیبات زیستی فعال و طبیعی بسیار با اهمیت است. پونه کوهی (*Mentha longifolia* (L.) Hud.) یکی از گیاهان دارویی معطر است که در طب سنتی برای درمان عفونت‌های مجاری ادرار استفاده می‌شود. در این تحقیق اثرات ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ‌های پونه کوهی جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های زیارت (استان گلستان)، آلاشت و ییلاق دو هزار (استان مازندران) با دو روش انتشار دیسک و چاهک، علیه چهار باکتری مولد عفونت مجاری ادراری (اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس) مورد مطالعه قرار گرفت، تا رویشگاه بهینه با بهترین اثرا ضد باکتریایی گیاه معرفی گردد. یافته‌ها نشان داد، عصاره اتانولی برگ پونه جمع‌آوری شده از هر سه رویشگاه اثر مهاری خوبی بر رشد باکتری‌های گرم مثبت داشت، اما در رویشگاه‌های آلاشت (۱۶۸۳ متر) و ییلاق دو هزار (۱۱۷ متر) نسبت به رویشگاه زیارت (۹۱۵ متر) به‌صورت معنی‌داری نتایج بهتری مشاهده شد (در سطح یک درصد). به‌طوری که در این رویشگاه‌ها، تقریباً ۱۰۰ درصد سویه‌های استافیلوکوکوس منتخب نسبت به عصاره حساسیت نشان دادند. لذا ضمن تایید استفاده سنتی از پونه کوهی جهت درمان عفونت‌های مجاری ادرار می‌توان بیان داشت هنگام استفاده از یک گیاه دارویی در درمان نوع خاصی از بیماری باید به رویشگاه آن نیز توجه نمود تا بهترین اثر درمانی حاصل شود.

واژگان کلیدی: اثر ضد باکتریایی، استافیلوکوکوس، استان‌های گلستان و مازندران، پونه کوهی (*Mentha longifolia* (L.) Hud.)، عصاره اتانولی

*نویسنده مسئول: bagheri.hanieh@ymail.com

مقدمه

استفاده گسترده از عوامل ضد باکتریایی منجر به مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها و انتشار ژن‌های مقاوم در بین میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا شده است (Banerjee *et al.*, 2014). در دسترس نبودن و هزینه بالای آنتی‌بیوتیک‌های نسل جدید با میزان اثر محدود، منجر به افزایش مرگ و میر شده است. لذا، به ترکیباتی از سایر منابع با فعالیت ضدمیکروبی نیاز است (Unnithan *et al.*, 2013). فعالیت ضدمیکروبی بسیاری از گیاهان بررسی شده است و تعداد زیادی نیز مهارکننده رشد باکتری‌های پاتوژن را نشان داده‌اند. طب سنتی گیاهی برای قرن‌ها است که در بسیاری از نقاط جهان برای درمان بیماری‌های مختلف شناخته شده و استفاده از این عوامل ضدباکتری، انقلابی در درمان عفونت‌های مختلف باکتریایی ایجاد کرده است. آنالیزهای فیتوشیمیایی عصاره گیاهان دارویی نشان داده است که این گیاهان دارای ترکیب‌های ثانویه بسیاری (Banerjee *et al.*, 2014) مانند تانن‌ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها هستند که در شرایط *in vitro* فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضدسرطانی، ضدانگلی (Al- Ali *et al.*, 2014)، ضد ویروسی (Stanisavljević *et al.*, 2012؛ Al- Ali *et al.*, 2014)، ضدقارچی، ضدباکتریایی و ضدالتهابی دارند (Stanisavljević *et al.*, 2012).

جنس *Mentha* متعلق به تیره نعنا، دارای ۲۵ تا ۳۰ گونه گیاهی، اغلب در مناطق معتدل اروپا و آاسیا، استرالیا و جنوب آفریقا یافت می‌شود (Ghaderi *et al.*, 2014). فعالیت‌های زیستی مختلفی از جمله: ضدباکتری، ضدقارچ و حشره‌کشی برای گونه‌های این جنس گزارش شده است (Saeidi *et al.*, 2014). پونه کوهی با نام علمی *Mentha longifolia* (L.) Hud. گیاهی چند ساله و معطر است (Stanisavljević *et al.*, 2014) که در طب سنتی غالباً از دمکرده برگ‌های آن به‌عنوان مدر (Ghaderi *et al.*, 2014)، تسریع کننده عمل هضم، رفع آسم، اسپاسم، نفخ، درد معده، سردرد، سرماخوردگی و سرفه و همچنین در استعمال خارجی برای درمان زخم‌ها و غدد متورم استفاده می‌شود و به‌عنوان آنتی اکسیدان، مقوی سیستم ایمنی، ضدقارچ، ضدالتهاب و ضدمیکروب استفاده می‌شود (Unnithan *et al.*, 2013).

در بررسی‌های مختلف فیتوشیمیایی، حضور فلانوئیدهای مختلف، مونوترپن‌های کتونی، تانن‌ها و ساپونین‌ها را در گونه‌های مختلف جنس *Mentha* گزارش شده است که مسئول فعالیت‌های فارماکولوژیکی و بیولوژیکی این گیاهان هستند. بیان شده است که شاید بیشترین فعالیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی پونه به‌دلیل محتوی بالای فلاونوئیدهای آن باشد. حضور فلاونوئیدهای بسیاری مانند کوئرستین، لوتئولین، آپی‌ژنین و مشتقات گلیکوزیدی کامفرول در برگ‌های این گیاه گزارش شده است (Razavi *et al.*, 2012). در حقیقت این ترکیب‌ها به‌عنوان یک ضدباکتری قوی عمل می‌کنند (Akroum *et al.*, 2009).

عفونت‌های مجاری ادراری، یکی از مهمترین و شایع‌ترین عفونت‌هایی است که در گروه‌های سنی مختلف رخ می‌دهد و از نظر فراوانی، دومین عفونت پس از عفونت‌های مجاری تنفسی است که می‌تواند منجر به بروز عوارض خطرناکی مانند اختلالات دستگاه ادراری، فشار خون، اورمی و زایمان زودرس در زنان باردار شود (ملاعباس‌زاده و همکاران، ۱۳۹۲). از جمله باکتری‌های شایع در این بیماری می‌توان به اشریشیاکلی، پروتئوس ولگاریس، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس‌ها، انتروباکتر، سیتروباکتر و

سودوموناس ائروژینوزا اشاره نمود (کیایی و همکاران، ۱۳۸۹).

تاکنون در مطالعات بسیاری اثر ضد باکتریایی عصاره و اسانس گیاه پونه کوهی گزارش شده است (Dadi *et al.*, 2009; Habbu *et al.*, 2008; Hajlaiu *et al.*, 2009; Hafedh *et al.*, 2010; Razavi *et al.*, 2014; Unnithan *et al.*, 2013; Nikšić *et al.*, 2012; 2012; Banerjee *et al.*, 2014; Saeidi Al-Ali *et al.*, 2014). در تحقیق Ghaderi و همکاران (۲۰۱٤) عصاره اتانولی گیاه پونه به روش چاهک باعث مهار رشد باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس شد و همچنین فلاونوئید کوئرستین بیشترین اثر ضد باکتری را نسبت به فلاونوئیدهای لوتئولین، آپی ژنین و کامفرول داشت. محققین نتیجه گرفتند که فلاونوئیدهای موجود در پونه باعث مهار رشد برخی میکروارگانیسم‌ها شده است که شاید علتی برای استفاده از این گیاه جهت درمان عفونت دستگاه‌های گوارشی، تنفسی و ادراری باشد (Akroum *et al.*, 2009).

امروزه با توجه به عوارض داروهای شیمیایی و مقاومت میکروارگانیسم‌ها در برابر آنها در صورت اثبات اثر گیاهان علیه سویه‌های استاندارد و بالینی باکتریایی می‌توان از عصاره‌های گیاهان به‌عنوان آنتی‌بیوتیک و نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد. با نظر به رویکرد دوباره برای مصرف داروها و فراورده‌های گیاهی، بررسی خواص دارویی گیاهان بومی هر منطقه از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. لذا هدف از این مطالعه شناسایی و مقایسه اثر ضدمیکروبی گیاه پونه کوهی (*Mentha longifolia*(L.) Hud.) جمع آوری شده از استان‌های گلستان (ارتفاعات زیارت) و مازندران (ارتفاعات آلاشت و ییلاق دو هزار) در شرایط آزمایشگاهی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه: طی عملیات صحرایی فراوان گیاه پونه کوهی با نام علمی *Mentha longifolia*(L.) Hud. در فصل گل‌دهی آن (خرداد و تیرماه) از رویشگاه‌های زیارت در استان گلستان، آلاشت و ییلاق دو هزار در استان مازندران جمع‌آوری گردید. نمونه هر باریومی گیاه مورد مطالعه در هرباریوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان شناسایی و عصاره‌گیری شد. بدین صورت که ابتدا برگ‌های جوان گیاه پونهاز پایه جدا و در شرایط مناسب (مکان تاریک و با جریان هوا) خشک شد و سپس با دستگاه آسیاب برقی پودر گردید.

آماده‌سازی عصاره اتانولی گیاه: به منظور تهیه عصاره اتانولی، از اتانول ۷۰ درصد درجه و روش پرکولاسیون استفاده شد. ۵۰ گرم از پودر هر یک از نمونه‌ها در داخل دکانتور ریخته و سپس مرحله به مرحله به آن اتانول افزوده شد. افزودن اتانول تا جایی ادامه یافت که حلال تمامی حجم نمونه‌ها را پوشش داد و علاوه بر آن مقداری از اتانول نیز روی سطح نمونه داخل دکانتور را کاملاً پوشاند. مدت عصاره‌گیری در این تحقیق ۷۲ ساعت به طول انجامید. جداسازی عصاره‌ها از حلال به وسیله دستگاه روتاری و با کمک پمپ خلاء انجام گرفت (Mazandarani *et al.*, 2007).

رقیق سازی عصاره گیاهان و تهیه دیسک‌های حاوی عصاره: در این مرحله عصاره اتانولی با پروپیلن گلیکول ۱۰ درصد رقیق شده و علاوه بر عصاره خالص، غلظت‌های مختلف (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از عصاره تهیه شد (Shahverdi *et al.*, 2008). سپس جهت تهیه دیسک‌های حاوی عصاره از دیسک‌های بلانک ساخت پادتن طب استفاده شد. بدین‌ترتیب که

دیسک‌های بلانک در لوله‌های حاوی رقت‌های تعیین شده از عصاره‌ها قرار گرفتو ۵ تا ۱۰ دقیقه دیسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه تا کاملاً خشک شد سپس جهت دیسک‌گذاری آماده شد (Mashhadian, 2006).

تهیه سویه باکتری‌های مورد مطالعه: باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل سویه‌های استاندارد اشریشیاکلی (PTCC 1399)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1431)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC 1435) واستافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (PTCC 1440) بودند که همگی به صورت لیوفیلیزه از مجموعه میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند. نمونه‌های میکروبی مطابق با روش‌های استاندارد احیاء شدند.

بررسی اثر ضد باکتریایی: در این تحقیق برای اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی پونه از دو روش انشار دردیسک و چاهک گذاری انجام شد و قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. قطر هاله عدم رشد کمتر از ۸ میلی‌متر به‌عنوان مقاوم، ۸ تا ۱۲ میلی‌متر به‌عنوان نسبتاً حساس و بیشتر از ۱۲ میلی‌متر به‌عنوان حساس در نظر گرفته شد (Mazandarani *et al.*, 2007). از پلی‌اتیلن گلیکول ۱۰ درصد به‌عنوان شاهد منفی و از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. برای حصول اطمینان، این آزمایش برای هر سویه باکتری سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد در سه بار تکرار، به‌عنوان قطر نهایی ثبت شد. ستونک‌های خطا نشان‌دهنده انحراف خطا (SE) هستند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. جهت بررسی وجود اختلاف معنی‌دار در نتایج به‌دست آمده از آزمون دانکن استفاده گردید و اختلاف بین گروه‌ها در سطح معنی‌داری $P<۰/۰۱$ تعیین شد.

الف) روش انتشار در دیسک: ابتدا از چهار سویه باکتریایی سوسپانسیون میکروبی با کدورتی معادل لوله ۰/۵ مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}cfuml^{-1}$) تهیه شد.سپس با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت یکنواختی از باکتری‌ها انجام شد. آنگاه دیسک‌های حاوی رقت‌های مختلف عصاره با فاصله معین از یکدیگر از لبه پلیت بر روی سطح یکنواخت آگار قرار داده شدند. پلیت‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و نتایج اثر ضد باکتریایی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها ثبت شد (Mazandarani *et al.*, 2007).

ب) روش انتشار در چاهک: بعد از تهیه غلظت نیم مک فارلند از کشت ۲٤ ساعته باکتری‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار، کشت یکنواخت باکتری‌ها انجام شد. سپس با کمک پیپت پاستور استریل، چاهکی به قطر ٦ تا ۷ میلی‌متر در محیط ایجاد نموده و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده از عصاره، داخل آن ریخته شد و قطر هاله عدم رشد پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی و ثبت شد (مازندرانی و همکاران، ۱۳۸۸).

نتایج

بررسی میانگین قطرهاله عدم رشد در هر دو روش مشخص کرد که عصاره اتانولی پونه کوهیبر روی همه باکتری‌های منتخب به غیر از اشریشیاکلی اثر مهارکنندگی داشته و بیشترین اثر آن مربوط به دیسک‌ها و چاهک‌های واحد غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بوده است. یا به عبارت دیگر با

افزایش غلظت عصاره میزان اثرگذاری آن بر روی رشد باکتری‌های مورد مطالعه (به غیر از اشریشیاکلی) به‌صورت قابل توجهی افزایش یافت و موجب افزایش قطرهاله عدم رشد و حساسیت این باکتری‌ها نسبت به عصاره شد (جداول ۱ و ۲).

در روش انتشار در دیسک، عصاره گیاه جمع‌آوری شده از رویشگاه آلاشت (استان مازندران- ۱٦۸۳ متر) رشد هر سه باکتری استافیلوکوکوس مورد مطالعه را به میزان ۱۰۰ درصد مهار کرد. و در روش انتشار در چاهک علاوه بر مورد اخیر، عصاره گیاه جمع‌آوری شده از رویشگاه ییلاق دو هزار (استان مازندران- ۱۱۷ متر) رشد دو باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس را نیز به میزان ۱۰۰ درصد مهار کرد (جداول ۱ و ۲).

مقایسه اثر رویشگاه‌های مختلف بر میزان فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی برگ پونه کوهی در روش انتشار در دیسک و چاهک در شکل ۲ ارائه شده است. میانگین قطرهاله عدم رشد در رویشگاه‌های آلاشت (استان مازندران- ۱٦۸۳ متر) و ییلاق دو هزار (استان مازندران- ۱۱۷ متر) نسبت به رویشگاه زیارت (استان گلستان- ۹۱۵ متر) به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود (در سطح یک درصد) که نشان دهنده حساسیت بالاتر باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه نسبت به عصاره گیاه جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مازندران نسبت به رویشگاه دیگر است. به‌طورکلی نتایج نشان داد که در هر دو روش، باکتری‌های استافیلوکوکوس مورد مطالعه نسبت به عصاره‌های گیاهی حساسیت نسبتاً بالایی داشتند.

جدول ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ پونه کوهی به‌روش انتشار در دیسک بر حسب میلی‌متر

رویشگاه	غلظت ($mg\ ml^{-}$) / باکتری	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۵۰	۵۰۰
زیارت	اشریشیاکلی	–	–	–	–	–	–
	استافیلوکوکوس اورئوس	–	۱۰	۱۱	۱٤	۱۷	۲۱
	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	–	–	۹	۱۵	۱۸	۲۲
	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	–	۷	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵
ییلاق دو هزار	اشریشیاکلی	–	–	–	–	–	–
	استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲	۱٤	۱٦	۱۹	۲۰	۲۲
	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۱۰	۱۱	۱٦	۲۰	۲۵	۳۰
	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	۱۰	۱۱	۱۸	۲۱	۲۸	۳۰
آلاشت	اشریشیاکلی	–	–	–	–	–	–
	استافیلوکوکوس اورئوس	۱٤	۱۹	۱۹	۲۱	۲۵	۲٦
	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۲۰	۲۰	۲٤	۲۷	۳۰	۳۵
	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	۲۰	۲۳	۲۱	۳۰	۳۰	۳۱

(–) عدم مشاهده هاله مهار رشد

جدول ۲. میانگین قطرهاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ پونه کوهی به روش انتشار در چاهک بر حسب میلی‌متر.

رویشگاه	باکتری / غلظت ($mg\ ml^{-}$)	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۵۰	۵۰۰
زیارت	اشریشیاکلی	–	–	–	–	–	–
	استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰	۱٤	۱۷	۱۷	۱۹	۲۰
	استافیلوکوکوس ایپدرمیدیس	–	۱۲	۱۵	۱۹	۲۰	۲۰
	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	–	۱۳	۱٦	۲۱	۲۸	۲۹
ییلاق دو هزار	اشریشیاکلی	–	–	–	–	–	–
	استافیلوکوکوس اورئوس	۱۱	۱۸	۲۱	۲۲	۲۳	۲٤
	استافیلوکوکوس ایپدرمیدیس	۱۵	۱۷	۲۱	۲۳	۲٤	۲۷
	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	۲۰	۲۱	۲۵	۲۷	۲۸	۳۰
آلاشت	اشریشیاکلی	–	–	–	–	–	–
	استافیلوکوکوس اورئوس	۲۱	۲۲	۲۳	۲۵	۲٦	۲۸
	استافیلوکوکوس ایپدرمیدیس	۲۲	۲۳	۲۵	۲۷	۲۹	۳۰
	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	۲٤	۲۵	۲۷	۳۰	۳٤	۳۵

(–) عدم مشاهده هاله مهار رشد

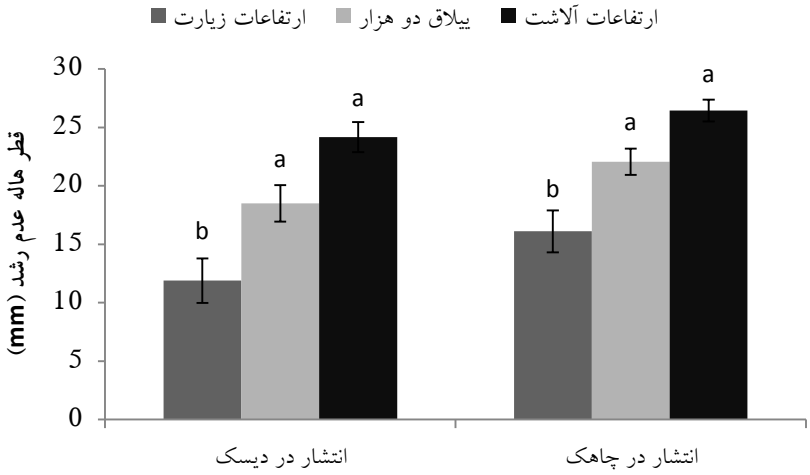
بحث

در تحقیق حاضر توانایی عصاره اتانولی برگ‌های گیاه پونه کوهی در سه رویشگاه مختلف در شمال کشور بر مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اروئوس، استافیلوکوکوس ایپدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و باکتری گرم منفی اشریشیاکلی که عوامل ایجاد عفونت مجاری ادرار هستند به دو روش انتشار در دیسک و چاهک با هدفاستفاده از آن در آینده به عنوان جایگزینی برای آنتی بیوتیک‌های معمول و تعیین بهترین رویشگاه از نظر داشتن خاصیت ضد باکتریایی بیشتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتانولی پونه کوهی بر روی همه باکتری‌های منتخب به غیر از اشریشیاکلی اثر مهارکنندگی داشت (جداول ۱ و ۲). نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت به این عصاره حساس بودند و باکتری گرم منفی مقاوم بود که با نتایجبه دست آمده توسط Akroum و همکاران (۲۰۰۹) و Al-Bayati (۲۰۰۹) مطابقت داشت. یکی از دلایل این امر ممکن است در ارتباط با قدرت نفوذ عصاره به داخل باکتری باشد. زیرا ساختمان غشای باکتری‌های گرم منفی به دلیل خاصیت آب دوستی قوی به عنوان یک سد دفاعی در برابر عوامل خارجی عمل می‌کند (مدرسی چهاردهی و همکاران، ۱۳۹۱؛ Khanam *et al.*, 2014) و در نتیجه نفوذپذیری غشای باکتری‌های گرم منفی خیلی کمتر از باکتری‌های گرم مثبت است (Ramtin *et al.*, 2014) که این امر در نتایج سایر محققان هم دیده می‌شود (کیایی و همکاران، ۱۳۸۹؛ عروجعلیان و همکاران، ۱۳۸۹؛ خسروی‌نیا و همکاران، ۱۳۹۲).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره افزایش یافت (جداول ۱ و ۲). تحقیقات نشان داده است که غلظت عصاره بر شدت اثر ضد

میکروبی آن موثر می‌باشد (خسروی و ملکان، ۱۳۸۲). طی تحقیقاتی اثر ضدمیکروبی عصاره ٤٥ گونه گیاه بومی ایران علیه سه سویه از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (Bonjar, 2004) و ۱۱ گونه گیاه دارویی بر باسیلوس سرئوس (Hamdan *et al.*, 2007) مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که با رقیق شدن عصاره‌ها از اثر ضدمیکروبی آن‌ها کاسته می‌شود که همسو با نتایج تحقیق حاضر بود.



شکل ۱. مقایسه اثر ضدباکتریایی عصاره گیاه در رویشگاه‌های مختلف بر اساس میزان قطر هاله عدم رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس مورد مطالعه (P<۰/۰۱).

همچنین مشاهده شد که اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مازندران به‌صورت معنی‌داری نسبت به رویشگاه گلستان بیشتر بود (شکل ۱). از یک سو محققین بسیاری حضور مواد موثره و فعال ثانوی در عصاره و اسانس گیاه پونه را موجب بروز خاصیت ضد میکروبی آن بیان داشتند (Hamdan *et al.*, 2007؛ Al- Ali *et al.*, 2014؛ Ghaderi *et al.*, 2014؛ Saeidi *et al.*, 2014؛ Banerjee *et al.*, 2014؛ Stanisavljević *et al.*, 2014) و از سوی دیگر عوامل محیطی مانند شرایط اقلیمی یا جغرافیایی را عواملی تاثیرگذار بر روی کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان دانسته‌اند (Ozkan *et al.*, 2011؛ Otles and Yalcin, 2012). در نتیجه، احتمالاً شدت فعالیت ضد باکتریایی گیاهان می‌تواند به‌صورت غیرمستقیم تحت تاثیر شرایط محیطی قرار گیرد.

محققین بر این باورند که در گیاهان سنتز پلی فنل‌ها و فلاونوئیدهای کل در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده مانند ارتفاع (Jaakola *et al.*, 2004) و یا شوری تحریک می‌شود که این ترکیب‌ها به‌دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل در ساختمان خود می‌توانند گیاه را در برابر اثرات مضر رادیکال‌های آزاد حفاظت کنند. در این راستا متابولیت‌های ثانویه شاید نقشی را در سازگاری گیاهان به شرایط تنش ایفا کنند. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در همه اندام‌های گیاهی وجود دارند و به‌طور معمول ترکیباتی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهند شامل فنل‌ها، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و ویتامین‌ها هستند. در دهه‌های اخیر، توجه خاصی به اثرات آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها و توانایی آنها در اتصال و مهار رادیکال‌های آزاد شده است. علاوه بر نقش این ترکیب‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، در طیف وسیعی از خواص دارویی

مانند اثرات ضد حساسیت، حفاظت کبد، ضد ویروس، ضد سرطان، ضد زخم، ضد آرتریت، ضد التهاب، ضد میکروب، ضد روماتیسم، حفاظت قلبی- عروقی و انبساط عروق نقش دارند (Ivan & Oprică, 2013).

در تحقیق حاضر، ارتفاع رویشگاه آلاشت (استان مازندران- ۱۶۸۳ متر) بیشتر از دو رویشگاه دیگر است. محققین بین افزایش ارتفاع از سطح دریا با کمیت و کیفیت مواد موثره ثانوی در گیاهان دارویی مختلف رابطه مستقیم مشاهده کردند (لیوانی، ۱۳۹۲؛ Rajasekaran *et al.*, 2009؛ Yang and Miao, 2010).

افزایش ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی با بالا رفتن ارتفاع به عنوان پاسخی در برابر افزایش اشعه UV می‌باشد (Jaakola and Hohtola, 2010). همچنین شدت نور، دوره‌های نوری و دما بر روی سنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه تاثیر می‌گذارد (Hohtola, 2007). محققین بیان داشتند که در ارتفاعات بالاتر از ۱۵۰۰ متر، مقادیر بالاتری از ترکیب‌های فنلی در گیاهان وجود دارد (Jaakola *et al.*, 2004). همچنین محققین فلاونوئیدهای موجود در عصاره گیاه پونه را عامل مهار رشد برخی باکتری‌ها عنوان کرده‌اند که شاید علتی برای استفاده از این گیاه جهت درمان عفونت دستگاه ادراری باشد (Akroum *et al.*, 2009). با توجه به مسائل بیان شده، می‌توان اشعه UV را عاملی تنش‌زا بر گیاهان در ارتفاعات درنظر گرفت که احتمالاً روی مقدار فنل‌ها و فلاونوئیدهای کل اثر می‌گذارد و می‌تواند علتی برای افزایش اثر ضدباکتریایی عصاره گیاه جمع‌آوری شده از منطقه مرتفع (آلاشت- ۱۶۸۳ متر) در تحقیق حاضر باشد.

در تحقیق حاضر عصاره گیاه جمع‌آوری شده از ییلاق دو هزار (استان مازندران- ۱۱۷ متر) علی رغم کم بودن ارتفاع رویشگاه، خاصیت ضد باکتریایی نسبتا برابر با رویشگاه مرتفع (منطقه آلاشت- ۱۶۸۳ متر) نشان داد به‌طوری‌که بین اثر ضد باکتریایی عصاره این گیاه در دو رویشگاه مازندران اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد وجود نداشت (شکل ۱). شاید علت این امر نزدیک بودن این رویشگاه (ییلاق دو هزار- ۱۱۷ متر) به دریا و در نتیجه میزان شوری بالاتر محلول خاک آن منطقه باشد. در این راستا طی تحقیقاتی افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاهان نخود (Singh, 2004)، فلفل قرمز (Navaro *et al.*, 2006)، *Bruguiera parviflora* (Parida *et al.*, 2002) و *Colubrina asiatica* (Sonar *et al.*, 2011) تحت شرایط تنش شوری گزارش شده است. با توجه به مسائل بیان شده،شاید علت بالاتر بودن اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی پونه کوهی جمع‌آوری شده ازرویشگاه‌های مازندران نسبت به رویشگاه دیگربه دلیل وجود تنش‌های محیطی بیشتر در این رویشگاه‌ها باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

در تحقیق حاضر عصاره اتانولی گیاه پونه جمع آوری شده از رویشگاه‌های استان مازندران نسبت به رویشگاه استان گلستان فعالیت ضد باکتری بالاتری نشان داد که احتمالا به علت وجود تنش‌های محیطیبیشتر (عامل ارتفاع، UV و شوری خاک) و به دنبال آن القای بیشتر سنتز متابولیت‌های ثانویه بود. همچنین در این تحقیق مهار بسیار خوب رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس می‌توانداستفاده ازاین گیاهرا در طب سنتی به عنوان کاهش دهنده عفونت مجاری ادرارتایید کند. از این رو، با توجه به مسئله افزایش همه روزه مقاومت آنتی بیوتیکی و عوارض جانبی داروهای شیمیایی می‌توان با انجام پژوهش‌های مشابه زمینه را برای جایگزینی

این ترکیب‌ها با مواد ضد میکروبی سنتزی فراهم ساخت.

منابع

1. Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta, D. and Lalaoui, K. 2009. Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. American Journal of Scientific Research, 4(2): 93-96.
2. Al- Bayati, F.A. 2009. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grow wild in IraqAnnals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 8: 20-26.
3. Al- Ali, K., Abdelrazik, M., Hemeg, H. and Ozbak, H. 2014. Antibacterial activity of four herbal extracts against Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Almadinah hospital, Saudi Arabia. International Journal of Academic Scientific Research, 2(2): 27-34.
4. Banerjee, S., Banerjee, R.P. and Pradhan, N.K. 2014. A comparative study on antimicrobial activity of leaf extract of five medicinal plants and commonly used antibiotics. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, 2(6):788-795.
5. Bonjar, S., 2004. Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. The Journal of Ethnopharmacology, 94: 301-305.
6. Dadi, P.K., Ahmad, M. and Ahmad, Z. 2009. Inhibition of ATPase activity of *Escherichiacoli* ATP synthase by polyphenols. International Journal of Biological Macromolecules, 45(1): 72-9.
7. Ghaderi, P., Ahmadi, R., Balkanyian, F., Moridikyia, A., Mahdavi, E. and Tavakoli, P. 2014. *In-vitro* antibacterial activity of bunium persicumand *Mentha longifolia* against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*.International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Sciences, May 2-3, Antalya, Turkey.
8. Habbu, P.V., Mahadevan, K.M., Shastry, R.A. and Manjunatha, H. 2009. Antimicrobial activity of flavanoid sulphates and other fractions of *Argyreia speciosa* (Burm.f) Boj. Indian Journal of Experimental Biology, 47(2): 121-8.
9. Hafedh, H., Fethi, B.A., Mejdi, S., Emira, N. and Amina, B. 2010. Effect of *Menthalongifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. African Journal of Microbiology Research, 4(11): 1122-1127.
10. Hajlaoui, H., Snoussi, M., Ben Jannet, H., Mighri, Z. and Bakhrouf, A. 2008. Comparison of chemical composition and antimicrobial activities of *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* essential oil from two Tunisian localities (Gabes and Sidi Bouzid). Annals of Microbiology, 58(3): 103-110.
11. Hamdan, M., Al-Ismail, K. and Al-Delaimy, K. 2007. The antibacterial activity of selected edible plant extracts against *Bacillus cereus*. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 3(2): 148-155.
12. Hohtola, A. 2007. Northern plant as a source of bioactive products. 291-307. In: Taulavuori and Tauravuori (eds) Physiology of Northern Plants under Changing Environment. Res. Signpost, India, 307p.
13. Ivan, M.A. and Oprică, L. 2013. Study of polyphenols and flavonoids contents of some halophytes species collected from Dobrogea region. Bulletin of the Transilvania University of Braşov, Series II, 6(2): 121-128.
14. Jaakola, L. and Hohtola, A. 2010. Effect of alatitude on flavonoid biosynthesis in plants. Plant Cell and Environment, 33: 1239-1247.
15. Jaakola, L., Maatta-Riihinen, K.R., Karenlampi, S. and Hohtola, A. 2004. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. Planta, 218(5): 721-728.
16. Khanam, Z., Wen, C.S. and Ul Haq Bhat, I. 2014. Phytochemical screening and antimicrobial activity of root and stem extracts of wildEurycoma longifoliaJack (Tongkat Ali). Journal of King Saud University – Science, (In Press), http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2014.04.006
17. Khosravi, A. and Malecan, M. 2004. Effects of *Lavandula stoechas* extracts on *Staphylococcusaureus* and other gram negative bacteria. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences, 29: 3-9. (In Persian)
18. Khosravinia, S., Ziaratnia, S.M., Bagheri, A. and Marashi, S.H. 2013. Investigation of antibacterial effects of cell suspension culture and comparison by essential oils and seed extract in *Bunium persicum*. Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology, 2(1): 79-92. (In Persian)
19. Kiaei, E., Mazandarani, M. and Ghaemi, E. 2010. Antibacterial activity of 7 species of medicinal plants on bacteria isolated from

29. Otles, S. and Yalcin, B. 2012. Phenolic Compounds analysis of root, stalk and leaves of nettle. The Scientific World Journal, 2012: 1-12.
30. Ozkan, A., Yumrutas, O., Saygideger, S.D., Kulak, M. 2011. Evaluation of antioxidant activities and phenolic contents of some edible and medicinal plants from Turkey's flora. Advances in Environmental Biology, 5(2): 231-236.
31. Parida, A., Das, A. and Das. P. 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. The Journal of Plant Biology, 45(1): 38-36.
32. Rajasekaran, C., Kalaivani, T., Jayakumararaj, R., Singh, A., Pusalkar, V.R. and Marimuthu, R. 2009. Studies on the impact of altitudinal gradient on ammonium assimilatory metabolism in *Glucine max* L. (Fabaceae). Ethnobotanical Leaflets, 13: 301-309.
33. Ramtin, M., Massiha, A., Khoshkholgh-Pahlaviani, M.R.M., Issazadeh, K., Assmar, M. and Zarrabi, S. 2014. *In vitro* antimicrobial activity of *Iris pseudacorus* and *Urtica dioica*. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, 16(3): 35-39.
34. Razavi, S.M., Zarrini, G. and Molavi, G. 2012. The evaluation of some biological activity of *Mentha longifolia* (L.) Huds growing wild in Iran. Pharmacologia, 3(10): 535-538.
35. Saeidi, S., Hassanpour, K., Ghamgosha, M., Heiat, M., Taheri, R.A., Mirhosseini, A. and Farnoosh, G. 2014. Antibacterial activity of ethyl acetate and aqueous extracts of *Menthalongifolia* L. and hydroalcoholic extract of *Zataria multiflora* Boiss. plants against important human pathogens.Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 4(12): 972-975.
36. Shahverdi, A.R., Ostad, S.N., Khodaee, S., Bitarafan, L., Monsef-Esfahani, H.R., Jamalifar, H., Nikavar, B. and Mohseni, M. 2008. Antimicrobial and cytotoxicity potential of *Peganum harmala* smoke. Pathlogy Magazine, 4(15): 236-40.
37. Singh, A.K. 2004. The physiology of salt tolerance in four genotypes of chickpea during germination. Journal of Agricultural Science and Technology, 6: 87-93.
38. Sonar, B.A., Desai Nivas, M., Gaikwad, D.K. and Chavan, P.D. 2011. Assessment of salinity-induced antioxidative defense UTI patients in Golestan province. Journal of Medicinal Plants, 9(34): 74-83. (Persian)
20. Livani, F. 2014. Total phenol and anthocyanin variation in different parts of *Prunus spinosa* L. and *Mespilus germanica* L. in Golestan province. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 1(4): 79-88.
21. Mashhadian, N.V. and Rakhshandeh, H. 2005. Antibacterial and antifungal effects of *Nigella sativa* exteracts against *S. aureus*, *P. aeroginosa*. Pakestan Medical Sciences Journal, 21(1): 47-52.
22. Mazandarani, M., Ghaemi, E.A. and Ghaffari, F. 2009. Antibacterial survey of different extracts of *Peganum harmala* L. different parts in North East of Golestan province (Inche Borun). Journal of Plant Science Researches, 4(3):27-38. (In Persian)
23. Mazandarani, M., Yassaghi, S., Rezaei, M.B. and Ghaemi, E.A. 2007. Ethnobotany and anti bacterial activity from essential oil of two endemic *Hypericum* species in North of Iran. Asian Journal of Plant Sciences, 6(2): 354-358.
24. Modarresi Chahardehi, A., Ibrahim, D., Fariza Sulaiman, S. and Aboulhassani, F. 2012. Determination of antimicrobial activity of various extracts of stinging nettle (*Urtica dioica*). Journal of Medicinal Plants, 2(42): 98-104. (In Persian)
25. Molaabaszadeh, H., Hajisheikhzadeh, B., Mollazadeh, M., Eslami, K. and Mohammadzadeh Gheshlaghi, N. 2013. The study of sensibility and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection in Tabriz city. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 3(2): 149-154. (In Persian)
26. Navarro, J.M., Flores, P., Garrido, C. and Martinez, V. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at ripening stages, as affected by salinity. Food Chemistry, 96(1): 66-73.
27. Nikšić, H., Kovač-Bešović, E., Makarević, E. and Durić, K. 2012. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mentha longifolia* (L.) Huds. Essential oil. Journal of Health Sciences, 2(3): 192-200.
28. Oroujalian, F., Kasra Kermanshahi, R., Azizi, M. and Basami, M.R. 2010. Synergistic antibacterial activity of the essential oils from three medicinal plants against some important food-borne pathogens by microdilution method. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2: 133-146. (In Persian)

system in *Colubrina asiatica* Brong. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 7(3): 193-200

39. Stanisavljević, D., Đorđević, S., Milenković, M., Lazić, M., Veličković, D., Ranđelović, N. and Zlatković, B. 2014. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils obtained from *Mentha longifolia* L. Hudson, dried by three different techniques. Records of Natural Products, 8(1): 61-65.
40. Stanisavljević, D.M., Stojičević, S.S., Đorđević, S.M., Zlatković, B.P., Veličković, D.T., Karabegović, I.T. and Lazić, M.L. 2012. Antioxidant activity, the content of total phenols and flavonoids in the ethanol extracts of *Mentha longifolia* (L.) Hudson dried by the use of different techniques. Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, 18(3) 411-420.
41. Unnithan, C.R., Gebreselassie, H., Sushen, U., Reddy, D.N., Woldu, A. and Muuz, M. 2013. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Mentha longifolia* L of Mekole, Ethiopia. Journal of Biological & Scientific Opinion, 1(3): 151-153.
42. Yang, F. and Miao, L.F. 2010. Adaptive responses to progressive drought stress in two poplar species originating from different altitudes. Silva Fennica, 44(1): 23-27.