

بررسی مقایسه‌ای اثرات ضد باکتریایی فراکسیون‌های قطبی، نیمه قطبی و غیرقطبی عصاره نسترن وحشی (*Rosa canina* L.) علیه برخی باکتری‌های پاتوژن غذازاد

ساناز طهماسبی^۱، چنگیز احمدی زاده^{۱*}

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

*نویسنده مسئول: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۳۰

چکیده

با توجه به تقاضای روزافزون مواد غذایی در سراسر دنیا، افرادی به طور سهوی یا عمدی، از طریق تولید، عرضه، واردات و صادرات مواد غذایی فاسد و آلوده، سبب بیماری‌های لحظه‌ای، کوتاه مدت، طولانی مدت و حتی مرگ بسیاری از افراد می‌شوند. نسترن وحشی (*Rosa canina* L.) یکی از گیاهان دارویی ارزشمندی است که مردم اکثر سرزمین‌ها از میوه‌های آن برای درمان بعضی از بیماری‌ها استفاده می‌کنند. هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتی‌باکتریال فراکسیون‌های قطبی، نیمه قطبی، غیرقطبی عصاره گیاه نسترن وحشی بر روی باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریامونوسیتوزنز* و *اشریشیا کولی* بود. ابتدا عصاره‌های متانولی، کلروفرمی و هگزانی نسترن وحشی تهیه شد و تأثیر غلظت‌های مختلف این عصاره‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تمامی آزمایش‌ها با روش انتشار چاهک و تعیین MIC و MBC بر روی سویه‌های استاندارد باکتری‌های مورد نظر انجام گرفت. عصاره کلروفرمی گیاه نسترن وحشی در غلظت ۶/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری گرم مثبت *لیستریا مونوسیتوزنز* جلوگیری کرد. درحالی‌که برای اثر بر باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کولی* به غلظت‌های بالای عصاره کلروفرمی نیاز بود. عصاره متانولی گیاه نسترن وحشی در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر مهارکنندگی و کشندگی هم بر باکتری‌های گرم مثبت و هم بر باکتری‌های گرم منفی داشت و عصاره کلروفرمی این گیاه بیشترین اثر مهارکنندگی را روی باکتری *لیستریا مونوسیتوزنز* داشت. در حالت کلی می‌توان نتیجه گرفت که عصاره گیاه نسترن وحشی دارای اثر ضدباکتریایی است.

کلید واژه‌ها: نسترن وحشی، عصاره گیاه، فراکسیون‌های قطبی، نیمه قطبی، غیر قطبی، فساد مواد غذایی.

مقدمه

اسانس‌های گیاهی هستند. عصاره و اسانس‌های گیاهی به‌دست‌آمده از گیاهان معطر دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد اکسایشی و ضد سرطانی بوده و قادر هستند رشد پاتوژن‌ها و تولید سم توسط ریزسازواره‌ها را کنترل کنند (Tajkarimi et al., 2010). اسانس‌های گیاهی، مخلوط‌های کمپلکسی از ترکیبات فرار تولیدشده توسط ارگانسیم‌های زنده بوده که توسط روش‌های فیزیکی چون عصاره‌گیری و تقطیر از همه گیاه، یا بخش‌هایی از گیاه به دست می‌آیند. اسانس‌های گیاهی ترکیبات معطر، آب‌گریز، تغلیظ شده و فراری هستند که در سلول‌ها و کرک‌های ترش‌هی منفرد یا مجتمع، غده‌های ترش‌هی، مجاری ترش‌هی در قسمت‌های سطحی و درونی اندام‌های مختلف از جمله:

با گسترش مطالعات علمی و آگاهی مردم از خطرات نگهدارنده‌های شیمیایی به‌کاررفته در مواد غذایی، صنعت تولید به سمت استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی همچون عصاره گیاهان در مواد غذایی روی آورده است. علت استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی، دارا بودن ویژگی‌های ضد باکتری، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان افزودنی‌های طبیعی است (Saatchi et al., 2008). بنابراین لزوم انجام پژوهش در خصوص اثرات ضد میکروبی نگهدارنده‌های طبیعی و اسانس‌های گیاهی بر رشد میکروارگانسیم‌های مهم مواد غذایی در مدل‌های آزمایشگاهی و غذایی افزایش یافته است (Hsani et al., 2011). از جمله ترکیبات طبیعی که می‌توانند به‌عنوان نگهدارنده در مواد غذایی به کار روند

آن‌ها می‌توان به نیروبخش و مقوی بودن، ضدالتهاب، ضد بیوست، قابض، آنتی‌اکسیدان و آنتی‌رادیکال بودن این گیاه اشاره کرد (Ghrabi, 2005). طبق گزارش سازمان غذا-دارو (FDA) نسبت ویتامین C میوه نسترن در مقایسه با بسیاری از میوه‌ها و سبزی‌ها بیشتر است. *استافیلوکوکوس اورئوس*^۱ به‌عنوان دومین و یا گاهی سومین علت مهم بیماری‌های منتقله از راه غذا محسوب می‌شود (Normanno et al., 2005). این باکتری به علت سهولت رشد در شرایط مختلف، از غذاهای متنوعی اعم از شیر و فرآورده‌های لبنی، فرآورده‌های گوشتی، سبزیجات، سالاد، غذاهای پخته و نمکی و به‌خصوص غذاهایی که نیازمند دست‌کاری‌های طولانی می‌باشند، قابل جدا شدن است. بقای این میکروارگانیسم در انواع مختلف پنیر و مسمومیت‌های ناشی از مصرف آن‌ها به‌خوبی به ثبت رسیده است. مسمومیت غذایی *استافیلوکوکی* در نتیجه مصرف غذای آلوده به *انترتوکسین استافیلوکوکی* ایجاد می‌شود که دارای علائم بسیاری، از جمله اسهال و استفراغ، افزایش بزاق دهان، دل‌پیچه و غیره می‌باشد (Capita et al., 2002). از جمله باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از غذا، *اشریشیاکلی*^۲ می‌باشد که هم‌زیست دستگاه گوارش انسان و حیوانات خون گرم است. انواع بیماری‌زای آن نیز باعث عفونت‌های روده‌ای و خارج روده‌ای مانند گاستروانتریت، عفونت دستگاه ادراری، مننژیت، پریتونیت و سپتی‌سمی می‌شود (Tadesse et al., 2012). گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود این باکتری در انواع مختلف غذاها از جمله در سبزی‌ها وجود دارد. مثلاً وجود آن در آب سیب، کلم، کرفس، گشنیز، جوانه شاهی، کاهو و گوجه‌فرنگی گزارش شده است. *سودوموناس آئروژینوزا*^۳ باکتری شایع در ماکیان بوده و در اردک، بوقلمون و قرقاول بروز می‌نماید. این پاتوژن می‌تواند تخم‌مرغ‌های بارور را نیز موردتهاجم

برگ، گل، میوه، جوانه و شاخه‌های گیاهان وجود دارند (Tajkarimi et al., 2010). از بین تمام مواد شناسایی‌شده موجود در ترکیبات مؤثر اندام گیاهان، ترکیبات فنولی یا ترکیبات ثانویه‌ی بدون نیتروژن، بیش‌ترین و مهم‌ترین موادی هستند که دارای آثار گوناگون بیولوژیک از جمله فعالیت ضد باکتریایی مؤثر هستند (Yadegarinia et al., 2006). ویژگی آنتی‌اکسیدانی بستگی به حضور و غلظت انواع مختلف ترکیبات فنولی دارد. فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها و اسیدهای فنولی از مهم‌ترین ترکیبات فنولی هستند. رادیکال‌های آزاد عامل اصلی بسیاری از بیماری‌ها هستند. آنتی‌اکسیدان‌ها رادیکال‌های آزاد و آسیب ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن را خنثی می‌کنند (Singh and Kumari, 2015). گونه‌های زیادی هستند که به دلیل دارا بودن خواص دارویی ممتاز هستند و از آن‌ها در طب سنتی دارویی از دیرباز استفاده می‌شده است. پژوهشگران زیادی با انجام آزمایش‌ها و تحقیقات مختلف به بررسی نقایص و شرایط غیرطبیعی بدن پرداخته و سعی در تشخیص و بهبود آن‌ها به کمک گیاهان دارویی داشته‌اند. گل سرخ کوهی (نسترن وحشی) با نام علمی *Rosa canina L.* از خانواده *Rosaceae* که تحت عنوان *dog rose* نیز شناخته می‌شود به‌صورت درختچه‌ای به ارتفاع دو تا سه متر می‌باشد و به‌طور خودرو در مناطق خشک روی صخره‌ها و بوته‌زارها می‌روید (Asghari et al., 2015). ساقه آن مستقیم و استوانه‌ای شکل است و روی آن پوشیده از تیغ‌های کوچک و قلاب مانند است. برگ‌ها مرکب و دنداندار، گل‌ها معطر و به رنگ سفید تا صورتی روشن است (Ercisli and Guleryuz, 2005). میوه کاذب این گیاه که *Rose hip* نامیده می‌شود در غذا، چای یا به شکل دارو در بسیاری کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در ایران از این میوه برای تهیه مربا یا ترشی استفاده می‌شود عوامل استفاده از میوه گیاه نسترن کوهی بسیار زیاد و متنوع‌اند از جمله

1- *Staphylococcus aureus*
2- *Escherichia coli*
3- *Pseudomonas aeruginosa*

شیری آلوده می‌باشد. با توجه به مطالب فوق و اطلاعات سازمان بهداشت جهانی در مورد این باکتری که میزان کشندگی آن را ۳۰ درصد اعلام کرده است لذا بررسی میزان شیوع و فراوانی این باکتری در مواد غذایی از جمله گوشت مرغ و ماهی بسیار مهم و حیاتی است (Varnam, 1991). از آنجائی که گوشت مرغ و ماهی در سبد غذایی مردم جایگاه ویژه‌ای دارد و از این دو، فرآورده‌های غذایی متنوع تولید می‌گردد، بنابراین آلودگی گوشت مرغ و ماهی و عدم رعایت اصول بهداشتی در پروسه مناسب و تولید فرآورده‌های غذایی مرغ و ماهی می‌تواند باعث ماندگاری و رشد لیستریامونوسیتوزنر گردد که این خود باعث انتقال راحت این ارگانیسم به انسان و در نهایت بروز اپیدمی-های شدید در انسان می‌گردد (به‌ویژه کودکان -افراد مسن و زنان باردار) لذا تعیین میزان آلودگی گوشت مرغ و ماهی بسیار مهم است چون به دنبال آن ارائه راهکارهایی پیشگیرانه می‌تواند شیوع و انتشار آن را در تولیدات غذایی و سبد غذایی مردم کاهش دهد. با توجه به این‌که اثر آنتی باکتریال عصاره گیاه نسترن وحشی بر روی سویه‌های استاندارد چهار باکتری پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کولی، سودوموناس آئروژینوزا، لیستریا منوسیتوزنر در شرایط آزمایشگاهی تحقیق مستقلی صورت نگرفته است لذا در این پژوهش اثر ضد باکتریایی فراکسیون‌های قطبی نیمه قطبی و غیرقطبی عصاره این گیاه بر روی باکتری‌های پاتوژن غذازاد مورد مطالعه قرار گرفت..

روش کار

روش تهیه عصاره نسترن وحشی برای اجرای این آزمایش به یک سری مواد و دستگاه‌های خاص نیاز بود. از جمله آن می‌توان به دستگاه روتاری اوپراتور (Heidolth, Germany)، دستگاه سوکسله، آسیاب برقی (Moulinix, France)، دستگاه کلونجر، ترازوی دیجیتال (Philips,)

قرار داده، باعث مرگ جنین و ایجاد یک بیماری موضعی یا سیستمیک از جوجه‌های تازه از تخم درآمده نماید. گونه‌های خطرناک این باکتری می‌توانند باعث اسهال، کم‌آبی، تنگی نفس و مرگ شوند (Ritchie et al., 1994). اگر شرایط بهداشتی یک واحد مرغداری در سطح پایین باشد، باکتری از گله آلوده به گله حساس منتقل می‌شود. همچنین شرایط استرس‌زا و بیماری‌های هم‌زمان، به‌خصوص عوامل تضعیف‌کننده ایمنی بدن، اثرات بیماری‌زایی این باکتری را افزایش می‌دهند. مرغ‌ها ممکن است از طریق پوست مرغ طی فرآیند کشتار مرغ، حمل‌ونقل و نگهداری در خرده‌فروشی‌ها نیز به باکتری سودوموناس آلوده شوند (Davis and Conner, 2007). راه اصلی انتقال این باکتری به انسان از طریق مصرف غذاهای آلوده است. با توجه به اینکه گوشت مرغ و ماهی دو منبع غذایی مهم برای انسان است؛ لذا جداسازی این باکتری از این دو منبع، از نظر بهداشت مواد غذایی بسیار مهم می‌باشد. لیستریامونوسیتوزنر باکتری گرم مثبت، بدون اسپور، هوازی بی‌هوازی اختیاری است که به‌صورت خارج سلولی و داخل سلولی قادر به رشد می‌باشد. این باکتری مهم‌ترین باکتری جنس خود به شمار می‌آید و در محیط و طبیعت گستردگی فراوان دارد. در خاک، آب، مدفوع انسان و دام، سبزی‌های، گوشت خام سفید و قرمز، ماهی، فرآورده‌های گوشتی و شیر یافت می‌شود. این باکتری در دام و انسان می‌تواند بیماری‌زا باشد. توانایی این باکتری در رشد در خشکی و سرما باعث افزایش بقاء و پراکندگی آن گشته است لذا به‌راحتی می‌تواند در مواد غذایی موجود در یخچال رشد نماید و حتی در عملیات ناقص پاستوریزاسیون باقی‌مانده و از بین نمی‌رود (Armenise et al., 1997). انتقال باکتری به انسان از طریق خوردن شیر، گوشت، سبزی‌های آلوده و فرآورده‌های گوشتی و

سوش‌های میکروبی

باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC1112، *لیستریا منوسیتوزنز* PTCC-1297) و گرم منفی (*شریشیا کولی* PTCC-1270، *سودوموناس آئروژینوزا* PTCC.1430) حائز اهمیت در ایجاد عفونت و مسمومیت‌های غذایی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. این سوش‌ها از موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی تهران تهیه گردید.

روش انتشار چاهک

۵۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت $1/5 \times 10^8$ cfu/ml در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت یکنواخت گسترش داده شد. سپس در سطح پلیت چاهک‌هایی به قطر شش میلی‌متر به فاصله ۲/۵ سانتی‌متر از هم ایجاد شد. سپس به چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده عصاره اتانولی میوه نسترن وحشی انتقال داده شد. DMSO به‌عنوان شاهد منفی و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته می‌شود. بعد از اتمام کار تمامی محیط‌های کشت تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. پس از مدت معین کشت‌های میکروبی از تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفت و قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. قطر هاله‌ها عکس‌العملی از غلظت عصاره مورد آزمایش می‌باشد. این پدیده یک ارتباط خطی بین هاله و لگاریتم غلظت عصاره مورد آزمایش می‌باشد که با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه آن با استاندارد مشخص، قدرت ضد میکروبی عصاره مورد آزمایش تعیین شد.

ارزیابی MIC و MBC عصاره‌ها

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش میکروتیتر پلیت بر اساس معرف Resazurin انجام شد. در این روش در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد استریل گوده شماره ۱

(Germany)، اتوکلاو (HL 36E, Japan)، فور (اوون) (Memmert, Germany)، عصاره نسترن وحشی، سوش‌های میکروبی، متانول، محیط کشت مولر هینتون برات، لوله آزمایش، دستکش لاتکس، ارلن مایر، پنبه، اشاره کرد. در این تحقیق فراکسیون‌بندی براساس قطبیت حلال‌های مورد استفاده انجام شد. بدین منظور ابتدا مواد گیاهی با یک حلال غیرقطبی نظیر پترولیوم عصاره‌گیری شد. سپس عصاره به دست آمده حلال‌زدایی شد. در مرحله بعدی مواد باقیمانده از مرحله قبلی مجدداً با استفاده از حلال کمی قطبی نظیر کلروفرم عصاره‌گیری شده و در نهایت با استفاده از حلال بسیار قطبی نظیر اتانول باقی‌مانده مواد گیاهی عصاره‌گیری می‌شود. به این ترتیب ۳ دسته عصاره حاصل شد که از لحاظ قطبیت متفاوت می‌باشند. این روش بیشتر در تحقیقات فرماکونگوزی مورد استفاده است. از عصاره‌های حاصله توسط حلال ۵ درصد دی متیل سولفواکساید (DMSO) غلظت‌های (۰/۳۹، ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰) میلی گرم در میلی لیتر جهت استفاده در آزمون انتشار چاهک و تعیین MIC و MBC استفاده گردید.

جهت تهیه عصاره های قطبی، نیمه قطبی و غیر قطبی از میوه خشک شده نسترن وحشی استفاده شد و عصاره‌گیری به روش زیر انجام شد. میزان ۵۰۰ گرم از میوه خشک شده نسترن وحشی به مدت ۴۸ ساعت در درون حلال مرکب ۳۰:۷۰ اتانول - کلروفرم خیسانده شد. سپس مخلوط را صاف کرده و به‌وسیله دستگاه روتاری تحت خلأ حلال را تبخیر کرده، مخلوط باقی‌مانده را جهت چربی زدایی در کم‌ترین میزان اتانول حل کرده و دوباره بدون استفاده از خلأ توسط کاغذ صافی و قیف شیشه‌ای صاف گردید. حلال مجدداً تحت خلأ تبخیر شده و باقی‌مانده را در میزان کمی از دی‌کلرومتان یا کلروفرم حل کرده به‌وسیله سولفات سدیم آب‌زدایی شد. حلال مجدداً تحت خلأ تبخیر شده و عصاره خالص گیاه به دست آمد.

آن برای مشخص نمودن گروه هایی که با یکدیگر تفاوت معنی دار دارند، از آزمون Tukey-Kramer استفاده شد.

نتایج

در روش انتشار چاهک در غلظت ۱۰۰ درصد با واحد میکرولیتر در میلی لیتر عصاره متانولی میوه نسترن وحشی علیه سویه های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کولی بیشتر از سویه گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس هاله عدم رشد مشاهده گردید. در غلظت ۱۰۰ درصد عصاره کلروفرمی گیاه، تنها باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به عصاره گیاه حساسیت نشان داد و هاله عدم رشد مشاهده گردید درحالی که در هیچ کدام از سویه ها نسبت به عصاره هگزانی هاله عدم رشد مشاهده نگردید.

جدول ۱_ نتایج حاصل از تأثیر عصاره های میوه نسترن

وحشی به روش انتشار در چاهک			
عصاره	عصاره	عصاره	
متانولی	کلروفرمی	هگزانی	
۱۰۰ درصد	۱۰۰ درصد	۱۰۰ درصد	
(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	
سودوموناس	۱۶	۹	۰
آئروژینوزا			
استافیلوکوکوس	۱۲	۰	۰
اورئوس			
لیستریا	۰	۰	۰
منوسیتوزنز			
اشریشیا کولی	۱۵	۰	۰

الی ۹ مربوط به رقت های ۱۰۰ تا ۰/۳۹ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره می باشد. گوده ۱۰ شاهد باکتری، گوده ۱۱ شاهد محیط، گوده ۱۲ شاهد عصاره بود. در هر گوده به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون برات به غیر از گوده اول ریخته شد. در گوده اول و دوم ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده ریخته (به علت اینکه غلظت عصاره در گوده اول ۱۰۰ درصد باشد) سپس از گوده دوم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته به گوده سوم و از سوم به چهارم الی گوده ۹ از گوده ۹ به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر خارج می گردد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد نظر از کدورت نیم مک cfu/ml $10^8 \times 1/5$ رقت ۱ به ۱۰۰ تهیه کرده و در تمامی گوده ها ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد به غیر از گوده ۱۱ و ۱۲. از معرف Resazurin به مقدار ۳۰ میکرولیتر به تمامی گوده ها ریخته شد. پس از طی زمان انکوباسیون، گوده ها از نظر تغییر رنگ معرف روزا زورین از رنگ آبی متمایل به بنفش به صورتی ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی گردید. کمترین رقت از عصاره که در آن تغییر رنگ مشاهده نشد (عدم کدورت) به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره (MBC) از تمامی لوله هایی که در آن ها عدم رشد مشاهده می شود، در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و محیط های کشت تلقیح شده به صورت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پلیت مربوط به لوله ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در آن رشد باکتری مشاهده نشد، به عنوان MBC آن غلظت از عصاره در نظر گرفته شد.

روش تجزیه و تحلیل داده ها

داده ها به صورت میانگین \pm خطای معیار (Mean \pm SEM) و درصد پاسخ دهی مثبت گزارش می شوند. برای مقایسه میانگین ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده کرده و در صورت معنی دار بودن نتیجه

جدول ۲_ نتایج MBC, MIC (µg/ml) عصاره های میوه نسترن وحشی علیه باکتری‌های مورد مطالعه

عصاره هگزانی		عصاره کلروفومی		عصاره متانولی		باکتری مورد مطالعه
MBC(µg/ml)	MIC(µg/ml)	MBC(µg/ml)	MIC(µg/ml)	MBC(µg/ml)	MIC(µg/ml)	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	سودوموناس آئروژینوزا
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶/۲۵	۲۵	۱۲/۵	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	لیستریا مونوسیوتوزنز
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۰	۵۰	۲۵	اشریشیا کولی

رشد مشاهده گردید. همچنین در عصاره کلروفومی تنها در سویه سودوموناس آئروژینوزا حساسیت دیده شد اما در عصاره هگزانی هیچ هاله عدم رشدی مشاهده نشد. در روش میکروتیتر پلیت میزان MIC و MBC عصاره‌ی الکلی نسترن وحشی علیه باکتری‌های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کولی به ترتیب ۶/۲۵ و ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و علیه باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیوتوزنز به ترتیب ۱۲/۵، ۲۵ و ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر شد. میزان MIC و MBC عصاره‌ی کلروفومی نسترن وحشی علیه باکتری‌های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کولی به ترتیب ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و علیه باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیوتوزنز به ترتیب ۶/۲۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر شد. میزان MIC و MBC عصاره‌ی هگزانی این گیاه علیه همه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت ۱۰۰ می‌باشد. پس از انجام آزمون مشخص شد که اثرات مهاری عصاره الکی گیاه روی هر چهار باکتری اثر مهارکنندگی و کشندگی بالایی دارد، عصاره کلروفومی روی باکتری‌های گرم مثبت اثر مهارکنندگی بالا و روی باکتری‌های گرم منفی اثر ناچیزی دارد و عصاره هگزانی گیاه بر روی باکتری‌ها تأثیر ناچیزی دارد. علت این امر

بحث

امروزه با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی و بی‌خطر بودن ترکیبات گیاهی به تحقیق در مورد گیاهان دارویی توجه فراوانی معطوف شده است. با توجه به اینکه در سال‌های اخیر به‌صورت گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود، این امر باعث ایجاد مقاومت در باکتری‌ها شده و از طرفی هم این آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات جانبی متعدد نیز دارند؛ بنابراین با توجه به استفاده از ترکیبات طبیعی به‌عنوان عامل ضد باکتریایی بیشتر شده است. اثرات اسانس‌های گیاهی زیادی جهت کنترل رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها در این سه دهه گذشته بررسی شده است (Venskutonis et al., 1995). روش انتشار از دیسک و میکروداپلوشن (تعیین MIC و MBC) از روش‌های تشخیص خاصیت ضد باکتریایی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر خاصیت آنتی‌باکتریال فراکسیون‌های قطبی نیمه قطبی غیرقطبی عصاره گیاه نسترن وحشی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بود (با در نظر گرفتن قطر هاله عدم رشد باکتری). این مطالعه به دو روش انتشار چاهک و میکروتیتر پلیت انجام شد. در روش انتشار چاهک در غلیظترین حالت عصاره الکلی گیاه، علیه سویه‌های گرم منفی (سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کولی) هاله عدم

فنول‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود و R. *sempervirens* و *R. moschata* جایگزین خوبی برای *R. canina* به‌ویژه در مناطقی که این گونه‌ها به‌راحتی یافت می‌شود (Ouerghemmi et al., 2016). ابراهیم فلاحی و همکاران در سال ۱۳۹۴ اثرات آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیسیته عصاره آبی و الکلی میوه نسترن کوهی بر لاین سلولی U937 را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که عصاره الکلی و آبی میوه نسترن کوهی باعث کاهش پراکسیداسیون لیپید می‌شود و غلظت‌های بالای آن بیشترین سمیت را دارد (فلاحی و همکاران، ۱۳۹۴). Katarína Rovná و همکاران در سال ۲۰۱۵ خواص ضد میکروبی گیاه *R. canina* را در برابر گونه‌های مختلف میکروبی بیماری‌زای گیاهی مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که بهترین اثر عصاره اتانولی این گیاه در برابر سودوموناس آئروژینوزا است و بهترین اثر ضد میکروبی عصاره متانولی *Rosa canina* بر روی اشریشیا کولی می‌باشد (Rovná et al., 2015). فیروزه غلامپور و همکاران در سال ۲۰۱۲ احتمال درمانی بودن *Rosa canina* به‌عنوان یک عامل پیشگیری‌کننده در نارسایی حاد کلیوی ناشی از ایسکمی را در موش صحرایی مورد بررسی و نتیجه گرفتند که این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک عامل پیش‌گیرنده در برابر آسیب‌های کلیوی ناشی از آسیب‌های ایسکمی در موش‌ها مفید باشد (Gholampour et al., 2012). همکاران در سال ۱۳۸۸ اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی عصاره متانولی گیاه نسترن وحشی که در آن از عصاره‌های متانولی بخش‌های گل و میوه (نسترن وحشی) استفاده کردند را مورد بررسی و نتیجه گرفتند که میوه بالغ نسبت به میوه نابالغ و گل بالغ نسبت به گل نابالغ دارای فعالیت بیشتری است و همچنین میزان مواد ضد جهشی و ضد سرطانی، با تکوین گیاه نسترن وحشی بیشتر می‌شود (جلالی و همکاران، ۱۳۸۸) /

احتمالاً این می‌باشد که حضور لیپوپولی ساکاریدهای دیواره سلولی مانع از رسیدن ترکیبات فعال عصاره به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی می‌شود. از آنجایی که اکثر ترکیبات موجود در عصاره‌ها، ماهیت آب‌گریزی دارند، لذا می‌توان چنین گفت که این مواد امکان نفوذ و دسترسی به نقاط فعال داخل باکتری‌های گرم منفی را ندارند. به‌طور کلی فرآورده‌های گیاهی منجر به گرانه شدن سیتوپلاسم، گسیختگی غشای سیتوپلاسمی، غیرفعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون‌سلولی و برون‌سلولی و متلاشی شدن دیواره سلولی می‌شوند، به‌طوری‌که اکثر عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت، اثر بازدارندگی و بر باکتری‌های گرم منفی، تأثیر کمتری داشته‌اند (Eloff, 1999). مهدی بانان خجسته و همکاران در سال ۱۳۹۶ اثر اتانولی گیاه *Rosa canina* را بر کاهش اثرات سوء و بهبود علائم دیابت در رابطه با هیستوفیزبولوژی و مقادیر آنزیم‌های کبد در رت‌های دیابتی نر را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که عصاره روزا با کاهش بیومارکرهای سرمی آسیب کبدی و نیز کاهش آسیب بافتی، عملکرد این ارگان را در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بهبود بخشید (بانان خجسته و همکاران، ۱۳۹۶). Houda Ben Jemaa و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثر رزا کانینا برای مهار فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان و α -آمیلاز دیابت ملیتوس مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که R.C فعالیت‌های مهارتی در برابر α -آمیلاز را افزایش می‌دهد و می‌توان از آن به‌عنوان آنتی‌دیابتیک استفاده کرد (Jemaa et al., 2017). Saloua Ouerghemmi و همکاران در سال ۲۰۱۶ ترکیب فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانول و اتیل استات برگ سه گونه رز وحشی: *Rosa canina L.*, *Rosa moschata Herrm.*, *Rosa sempervirens L.* در مناطق مختلف تونس مقایسه و بررسی کردند و نتیجه گرفتند که عصاره برگ‌های گونه‌های مختلف رز تونس به‌عنوان یک منبع بالقوه

ضد سرطانی عصاره متانولی گیاه نسترن وحشی (*Rosa canina L.*). فصلنامه شناخت و کاربرد گیاهان دارویی، ۲(۲)، صفحه ۲۹-۳۳.

۳. فلاحی، ابراهیم، فرهادی، جعفر، عبدالله پور، فواد، قاسمی، مریم، کاکایی، زینب و کریمی، زهرا. (۱۳۹۴). اثرات آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیسیته عصاره آبی و الکلی میوه نسترن کوهی بر لاین سلولی U937. فصلنامه یافته، ۱۷(۳)، صفحه ۲۵-۱۵.

4. Armenise, F., Sebastio, P., Cito, G., Ianieri, A., Tiecco, G. and Oreste, E., 1997. Incidence of *Listeria* spp. in fresh seafood products [Apulia]. *Industrie Alimentari* (Italy).

5. Asghari, B., Salehi, P., Farimani, M.M. and Ebrahimi, S.N., 2015. α -Glucosidase Inhibitors from Fruits of *Rosa canina L.* *Rec Nat Prod*, 9(3).

6. Capita, R., Alonso-Calleja, C., Garcia-Fernandez, M.C. and Moreno, B., 2002. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat in Spain. *Poult. Sci.*, 81(3), pp.414-421.

7. Davis, M.A. and Conner, D.E., 2007. Antimicrobial effects of *Pseudomonas aeruginosa* on survivability and recovery of *Campylobacter jejuni* on poultry products. *Poult. Sci.*, 86(4), pp.760-764.

8. Eloff, J.N., 1999. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. *J. Ethnopharmacol.*, 67(3), pp.355-360.

9. Ercisli, S. and Guleryuz, M., 2005. Rose hip utilization in Turkey. *Acta Horticulturae*, 490:77-83.

10. Gholampour, F., Javadifar, T.S., Karimi, S., Eslam-Zadeh, T. and Owji, S.M., 2012. Effects of *Rosa canina L.* on ischemia/reperfusion injury in anesthetized rats. *TUMJ*, 70(1).

11. Ghrabi, Z. 2005. A Guide to Medicinal Plants in North Africa: *Rosa canina L.* International Union for Conservation of Nature and Natural Resources: Malaga, Spain, pp 229-231.

12. Hsani, A., Mahmoudi, R., Zare, P. and Hasany, A., 2011. Biochemical properties and

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از آزمایش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن و مقایسه این نتایج می‌توان بیان کرد، اسانس این گیاه دارای اثرات ضد باکتریایی علیه میکروب‌های بررسی شده بود و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا منوسیوتونز* بیشترین حساسیت را به اسانس نسترن وحشی نشان داد. همچنین اسانس این گیاه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های به‌کاررفته اثر مهاری قابل توجهی داشت، لذا خالص‌سازی و ارزیابی اثرات ضد باکتریایی فعال عصاره این گیاه جهت استفاده آن‌ها به‌منظور ترکیب ضد باکتریایی و نگهدارنده مواد غذایی تحت عنوان یک ماده مصرف سبز گیاهی و جایگزینی مناسب برای ترکیبات شیمیایی علیه میکروارگانیسم‌های مسمومیت‌زا و منتقله از مواد غذایی تولیدی در صنایع غذایی جهت بهبود کیفیت ایمنی و سلامت غذایی در مصرف‌کنندگان توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر صمیمانه سپاسگزاری می‌شود و تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش مرا یاری کردند تقدیر و تشکر می‌نمایم. شایان‌ذکر است که این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم ساناز طهماسبی با کد پایان‌نامه ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۴۱۰۱۲ دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر می‌باشد.

منابع

۱. بانان خجسته، سید مهدی، بصیرت، الهه، شیخ زاده، فرزام و حاتمی، حمیرا. (۱۳۹۶). اثر عصاره *Rosa Canina* بر روی خصوصیات بافتی و فعالیت آنزیم‌های کبدی موش‌های صحرایی دیابتی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل*، ۱۷(۱)، صفحه ۸۱-۸۹.
۲. فرجی جلالی، هانیه، مجد، احمد، مهراپیان، صدیقه و نژاد ستاری، طاهر. (۱۳۸۸). بررسی اثر آنتی اکسیدانی و

18. Saatchi, A., Kadivar, M. and Soleymnizad, S., 2008. Antioxidant and antifungal effects of ethanol extracts of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis*. In 18th National Congress on Food Tech.
19. Singh, R. and Kumari, N., 2015. Comparative determination of phytochemicals and antioxidant activity from leaf and fruit of *Sapindus mukorossi* Gaertn.—A valuable medicinal tree. *Ind Crop Prod*, 73, pp.1-8.
20. Tadesse, D.A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M.J. and McDermott, P.F., 2012. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. *EID*, 18(5), p.741.
21. Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9), pp.1199-1218.
22. Varnam, A.H. 1991. *Foodborn pathogens*, wolf publishing Ltd. pp. 327-353.
23. Venskutonis, P.R., Dapkevičius, A. and Baranauskienė, M., 1995. Flavour composition of some lemon-like aroma herbs from Lithuania. *Developments in food science* (Vol. 37, pp. 833-847). Elsevier.
24. Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. and Rasooli, I., 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67(12), pp.1249-1255.
- antimicrobial effects of *allium ascalonicum* and *pimpinella anisum* essential oils against *listeria monocytogenes* in white brined cheese. *J. food research*, 21(3), pp. 318-328.
13. Jemaa, H.B., Jemia, A.B., Khelifi, S., Ahmed, H.B., Slama, F.B., Benzarti, A., Elati, J. and Aouidet, A., 2017. Antioxidant activity and α -amylase inhibitory potential of *Rosa canina* L. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 14(2), pp.1-8.
14. Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G. and Di Giannatale, E., 2005. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int. J. Food Microbiol*, 98(1), pp.73-79.
15. Ouerghemmi, S., Sebei, H., Siracusa, L., Ruberto, G., Saija, A., Cimino, F. and Cristani, M., 2016. Comparative study of phenolic composition and antioxidant activity of leaf extracts from three wild *Rosa* species grown in different Tunisia regions: *Rosa canina* L., *Rosa moschata* Herrm. and *Rosa sempervirens* L. *IND Crop Prod*, 94, pp.167-177.
16. Ritchie, B.W., Harrison, J.G. and Harrison, R.L., 1994. *Avian medicine*. Lake Worth (FL): Winger's Publishing.
17. Rovná, K., Petrová, J., Terentjeva, M., Cerná, J. and Kacáňiová, M., 2015. Antimicrobial activity of *Rosa canina* flowers against selected microorganisms. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*, 4, p.62.

Comparative study of antibacterial effects of polar, semi-polar, and non-polar fractions of *Rosa canina* extract against some pathogenic bacteria

Tahmasebi S¹, Ahmaizadeh C^{1*}

1. Department of microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

*Corresponding author: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

Received: 21 September 2019

Accepted: 21 December 2019

Abstract

Due to the increasing demand for food worldwide, people inadvertently or deliberately, through the production, supply, import, and export of spoiled and contaminated food, cause instantaneous diseases, short-term, long-term, and even many deaths. *Rosa canina* is one of the most valuable medicinal plants that most people use in their lands to treat some diseases. The purpose of this study was to investigate the antimicrobial effects of polar, semi-polar, and non-polar fractions of *Rosa canina L.* extract on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *E. coli*. In this study, *Rosa canina* was used. First, methanolic, chloroform and hexane extracts of *R. canina* were extracted, and the effects of different concentrations of these extracts were investigated. All experiments were carried out using the well-diffusion method and MIC and MBC determination on standard strains of Intended bacterias. The chloroform extract of the *Rosa canina* prevented at a concentration of 6.25 µg / ml has an inhibitory effect on Gram-positive bacteria in *Listeria monocytogenes*. While the impact on gram-negative bacteria of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* is required for high concentrations of chloroform extract. Methanolic extract of *Rosa canina* at a concentration of 25 µg / ml has an inhibitory and killing effect on both gram-positive bacteria and gram-negative bacteria, and the chloroform extract of this plant has a most inhibitory effect on *Listeria monocytogenes*. In general, it can be concluded that the extract of *Rosa canina* has an antibacterial effect.

Keywords: *Rosa canina*, plant extract, polar, semi-polar, non-polar fraction.