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

ساناز طهماسبی[1]، چنگیز احمدی زاده[1*]

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 بیماری های لحظه ای، کوتاه مدت، طولانی مدت و حتی مرگ بسیاری از افراد می شوند. 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، لیستریامنوسیتوژنز* و *اشریشیا کولی* بود. ابتدا عصاره‌های متانولی، کلروفرمی و هگزانی نسترن وحشی تهیه شد و تأثیر غلظت‌های مختلف این عصاره‌ها موردبررسی قرار گرفت. تمامی آزمایش‌ها با روش انتشار چاهک و تعیین MIC و MBC بر روی سویه‌های استاندارد باکتری های مورد نظر انجام گرفت. عصاره کلروفرمی گیاه نسترن وحشی در غلظت ۶/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری گرم مثبت *لیستریا مونوسیتوژنز* 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 مونوسیتوژنز* داشت. در حالت کلی می‌توان نتیجه گرفت که عصاره گیاه نسترن وحشی دارای اثر ضدباکتریایی است.

کلید واژه ها: نسترن وحشی، عصاره گیاه، فراکسیون های قطبی، نیمه قطبی، غیر قطبی، فساد مواد غذایی.

مقدمه

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 نگهدارنده های 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 میکروارگانیسم‌های مهم مواد غذایی در مدل‌های آزمایشگاهی و غذایی افزایش‌یافته است (Hsani et al., 2011). ازجمله ترکیبات طبیعی که می‌توانند به‌عنوان نگهدارنده در مواد غذایی به کار روند 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 ارگانیسم‌های 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 ترشحی منفرد یا مجتمع، غده‌های ترشحی، مجاری ترشحی در قسمت‌های سطحی و درونی اندام‌های مختلف ازجمله:

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 ازجمله 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 دندانه‌دار، 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 مورداستفاده 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 ازجمله آن‌ها می‌توان به نیروبخش و مقوی بودن، ضدالتهاب، ضد یبوست، قابض، آنتی‌اکسیدان و آنتی رادیکال 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*[1] 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* درنتیجه مصرف غذای آلوده به انتروتوکسین *استافیلوکوکی* ایجاد می‌شود که دارای علائم بسیاری، ازجمله اسهال و استفراغ، افزایش بزاق دهان، دل‌پیچه و غیره می‌باشد (Capita et al., 2002). ازجمله باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از غذا، *اشریشیاکلی*[2] 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 ازجمله در سبزی‌ها وجود دارد. مثلاً وجود آن در آب سیب، کلم، کرفس، گشنیز، جوانه شاهی، کاهو و گوجه‌فرنگی گزارش‌شده است. *سودوموناس آئروژینوزا*[3] باکتری شایع در ماکیان بوده و در اردک، بوقلمون و قرقاول بروز می‌نماید. این پاتوژن می‌تواند تخم‌مرغ‌های بارور را نیز موردتهاجم

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

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، ازنظر بهداشت مواد غذایی بسیار مهم می‌باشد. *لیستریامونوسیتوژنز*[1] 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 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 ازجمله 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 *لیستریامونوسیتوژنز* گردد که این خود باعث انتقال راحت این ارگانیسم به انسان و درنهایت بروز اپیدمی‌های 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 منوسیتوژنز* 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 موردمطالعه قرار گرفت..

روش کار

روش تهیه عصاره نسترن وحشی

برای اجرای این آزمایش به یک سری مواد و دستگاه‌های خاص نیاز بود. ازجمله آن می‌توان به دستگاه روتاری اوپراتور (Heidolth, Germany)، دستگاه سوکسله، آسیاب برقی (Moulnix, France)، دستگاه کلونجر، ترازوی دیجیتال (Philips,

1- *Listeria monocytogenes*

Germany)، اتوکلاو (HL 36E, Japan)، فور (اوون) (Memmert, Germany)، عصاره نسترن وحشی، سوش‌های میکروبی، متانول، محیط کشت مولر هینتون براث، 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 مجددا 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 فارماکوگنوزی 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 صاف‌کرده 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.

سوش‌های میکروبی

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

روش انتشار چاهک

۵۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت $1/5\times10^{8}$ cfu/ml در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت 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 تهیه‌شده 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 موردبررسی 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

الی ۹ مربوط به رقت‌های ۱۰۰ تا ۰/۳۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره می‌باشد. گوده ۱۰ شاهد باکتری، گوده ۱۱ شاهد محیط، گوده ۱۲ شاهد عصاره بود. در هر گوده به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث به‌غیراز گوده اول ریخته شد. در گوده اول و دوم ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه‌شده 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 می‌گردد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری موردنظر از کدورت نیم مک cfu/ml $1/5\times10^{8}$ رقت ۱ به ۱۰۰ تهیه‌کرده و در تمامی گوده‌ها ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد به‌غیراز گوده ۱۱ و ۱۲. از معرف Resazurin به مقدار ۳۰ میکرولیتر به‌تمامی گوده‌ها ریخته شد. پس از طی زمان انکوباسیون، گوده-ها ازنظر تغییر رنگ معرف روزازورین 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) به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره (MBC) از تمامی لوله‌هایی که در آن‌ها عدم رشد مشاهده می‌شود، در سطح محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شد و محیط‌های کشت تلقیح شده به‌صورت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پلیت مربوط به لوله‌ای که حاوی کم‌ترین غلظت عصاره بود و در آن رشد باکتری مشاهده نشد، به‌عنوان MBC آن غلظت از عصاره در نظر گرفته شد.

روش‌تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار (Mean ± 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 آن برای مشخص نمودن گروه هایی که با یکدیگر تفاوت معنی دار دارند، از آزمون Tukey-Kramer استفاده شد.

نتایج

درروش انتشار چاهک در غلظت ۱۰۰ درصد با واحد میکرولیتر در میلی لیتر عصاره متانولی میوه نسترن وحشی علیه سویه‌های 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 درحالی‌که در هیچ‌کدام از سویه‌ها 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

باکتری	عصاره متانولی ۱۰۰ درصد (µg/ml)	عصاره کلروفرمی ۱۰۰ درصد (µg/ml)	عصاره هگزانی ۱۰۰ درصد (µg/ml)
سودوموناس آئروژینوزا	۱۶	۹	۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲	۰	۰
لیستریا منوسیتوژنز	۰	۰	۰
اشریشیا کولی	۱۵	۰	۰

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

باکتری موردمطالعه	عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی		عصاره هگزانی	
	MIC (µg/ml)	MBC(µg/ml)	MIC(µg/ml)	MBC(µg/ml)	MIC(µg/ml)	MBC(µg/ml)
سودوموناس آئروژینوزا	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲/۵	۲۵	۶/۲۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
لیستریا منوسیتوژنز	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
اشریشیا کولی	۲۵	۵۰	۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

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 عوامل ضد باکتریایی بیشتر شده است. اثرات اسانس‌های گیاهی زیادی جهت کنترل رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها در این سه دهه گذشته بررسی‌شده است (Venskutonis et al., 1995). روش انتشار از دیسک و میکرودایلوشن (تعیین MIC و MBC) از روش‌های تشخیص خاصیت ضد باکتریایی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر خاصیت آنتی باکتریال 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. درروش انتشار چاهک در غلیظ‌ترین حالت عصاره الکلی گیاه، علیه سویه‌های گرم منفی (*سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کولی*) هاله عدم رشد مشاهده گردید. همچنین در عصاره کلروفرمی تنها در سویه *سودوموناس آئروژینوزا* حساسیت دیده شد اما در عصاره هگزانی هیچ هاله عدم رشدی مشاهده نشد. درروش 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 مونوسیتوژنز* به ترتیب ۱۲/۵ و ۲۵، ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر شد. میزان MIC و MBC عصاره‌ی کلروفرمی نسترن وحشی علیه باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کولی* به ترتیب ۲۵ و ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و علیه باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب ۶/۲۵ و ۱۰۰، ۶/۲۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر 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 کلروفرمی 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

احتمالاً این می‌باشد که حضور لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی مانع از رسیدن ترکیبات فعال عصاره به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی می‌شود. ازآنجایی‌که 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. به‌طورکلی فرآورده‌های گیاهی منجر به گرانوله شدن سیتوپلاسم، گسیختگی غشای سیتوپلاسمی، غیرفعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون‌سلولی و برون سلولی 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 هیستوفیزیولوژی و مقادیر آنزیم‌های کبد در رت‌های دیابتی نر را موردبررسی قراردادند 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 موردبررسی قراردادند و نتیجه گرفتند کهR.C فعالیت‌های مهاری در برابر α-آمیلاز را افزایش می‌دهد و می‌توان از آن به‌عنوان آنتی دیابتیک 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 تونسی به‌عنوان یک منبع بالقوه فنول‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود و *R. sempervirens* و *R. moschata* جایگزین خوبی برای *R.canina* به‌ویژه در مناطقی که این‌گونه ها به‌راحتی یافت می‌شود (Ouerghemmi et al., 2016). ابراهیم فلاحی و همکاران در سال ۱۳۹۴ اثرات آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیسیتی 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 Rovnáو همکاران در سال ۲۰۱۵ خواص ضدمیکروبی گیاه *R.canina* را در برابر گونه‌های مختلف میکروبی بیماری‌زای گیاهی موردبررسی قراردادند 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 موردبررسی 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). هانیه فرجی جلالی و 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 موردبررسی 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)/

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 بررسی‌شده بود و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا منوسیتوژنز* بیشترین حساسیت را به اسانس نسترن وحشی نشان داد. هم‌چنین اسانس این گیاه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های به‌کاررفته اثر مهاری قابل‌توجهی 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 آنزیم های کبدی موش های صحرایی دیابتی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل*، ۱۷(۱)، صفحه ۸۱-۸۹.

۲. فرجی جلالی، هانیه.، مجد، احمد.، مهرابیان، صدیقه و نژاد ستاری، طاهر. (۱۳۸۸). بررسی اثر آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی عصاره متانولی گیاه نسترن وحشی (*Rosa canina L*). *فصلنامه شناخت و کاربرد گیاهان دارویی*، ۲(۲)، صفحه ۲۹-۲۳.

۳. فلاحی، ابراهیم.، فرهادی، جعفر.، عبدالله پور، فواد.، قاسمی، مریم.، کاکایی، زینب و کریمی، زهرا. (۱۳۹۴). اثرات آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیسیتی 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. J., 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

18. Saatchi, A., Kadivar, M. and Soleymnianzad, 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 mukorrossi 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 ofallium ascalonicum and pimpinella anisumessential oils against listeria monocytogenes in white brined cheese. J. food research, 21(3), pp. 318-328.
13. Jemaa, H.B., Jemia, A.B., Khlifi, 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 Kacániová, 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 S[1], 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. *Rose 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.