تحقیقی

# اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی، متانولی و استونی گال رز وحشی علیه *استافیلوکوکوس آرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس*

**عاطفه حق‌پرستی[۱]، دکتر مریم محمدی سیچانی*[۲]، مجید توکلی[۳]**

*۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. ۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. ۳- مربی، کارشناسی ارشد حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان، ایران.*

## چکیده

**زمینه و هدف :** *امروزه به‌دلیل مصرف بی‌رویه و غیرضروری آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت دارویی باکتری‌ها افزایش یافته و درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم نیز با مشکلات بسیار و هزینه بالا امکان‌پذیر است. گال‌ها از رشد غیرطبیعی بافت‌های گیاه میزبان در واکنش به حضور یک موجود زنده خارجی به‌وجود آمده و تغییر شکل پیدا کرده‌اند. گال‌های رز در اثر فعالیت زنبورهای گالزای خانواده* ***Cynipidae*** *به‌ویژه در اثر فعالیت نسل جنسی* ***Diplolepsis mayri*** *روی بوته‌های رز وحشی به‌وجود می‌آیند. این مطالعه به منظور تعیین اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی، متانولی و استونی گال رز وحشی علیه استافیلوکوکوس آرئوس و انتروکوکوس فکالیس انجام شد.*

**روش بررسی :** *در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی، عصاره‌های متانولی، استونی و آبی گال رز وحشی در غلظت‌های ۱۵/۶، ۳۱/۳، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش سوکسله تهیه شدند. فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها با روش انتشار چاهک و حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی به روش میکرودایلوشن انجام شد. همچنین ترکیبات موثره گال رز وحشی به روش* ***GC-MS*** *ارزیابی گردید.*

**یافته‌ها :** *قطر هاله عدم رشد ناشی از غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های متانولی، استونی و آبی گال رز وحشی به ترتیب ۲۷/۳، ۲۶/۷ و ۲۰ میلی‌متر به‌دست آمد. قطر هاله عدم رشد گال رز وحشی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم تقریباً یکسان بود. غلظت عصاره‌ها با میزان فعالیت ضدباکتریایی رابطه مستقیم داشت. عصاره متانولی گال رز بالاترین اثر ضدباکتریایی را نشان داد. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره متانولی برای استافیلوکوکوس آرئوس و انتروکوکوس فکالیس به ترتیب ۶۲/۵ و ۳۱/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.*

**نتیجه‌گیری :** *عصاره‌های آبی، متانولی و استونی گال رز وحشی در شرایط آزمایشگاهی علیه استافیلوکوکوس آرئوس و انتروکوکوس فکالیس فعالیت ضدباکتریایی بالایی دارند.*

**کلید واژه‌ها :** *گال رز وحشی ، استافیلوکوکوس آرئوس ، انتروکوکوس فکالیس*

* نویسنده مسؤول : دکتر مریم محمدی سیچانی ، پست الکترونیکی **mohamadi_m@iaufala.ac.ir**

نشانی : فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی، تلفن ۳۷۴۲۰۱۳۵-۰۳۱، نمابر ۳۷۴۲۰۱۳۴

**وصول مقاله : ۱۳۹۵/۴/۲۱ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۵/۱۲/۶ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹۵/۱۲/۸**

## مقدمه

عوارض ناشی از مصرف داروهای ضدمیکروبی سنتتیک شیمیایی و مقاومت روزافزون بسیاری از باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، تمایل به استفاده از مواد مؤثره گیاهی و یا ترکیبات طبیعی با اثر آنتی‌بیوتیکی را افزایش داده و کاربرد گیاهان دارویی به‌عنوان جایگزین داروهای شیمیایی پیشنهاد شده است (۱و۲). داروهای گیاهی دارای اثرات مفیدی بوده و به‌دلیل همراه بودن مواد موثره موجود در آنها با مواد دیگر از یک تعادل بیولوژیک برخوردار است. مواد مؤثره گیاهی در بدن انباشته نشده و در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها، اثرات جانبی کمتری دارند (۳).

گل رز وحشی یا گل سرخ (*Rosa canina*) از تیره رزاسه‌آ (*Rosaceae*) است. این گیاه دارای ساختارهای ناهنجار در بخش‌هایی از ساقه و برگ‌ها بوده که گال نامیده می‌شود. گال‌ها از رشد غیرطبیعی بافت‌های گیاه میزبان در واکنش به حضور یک موجود زنده خارجی مانند قارچ‌ها، ویروس‌ها، باکتری‌ها، بندپایان و نماتدها به‌وجود آمده و تغییر شکل پیدا کرده‌اند. عوامل گال‌زا از گال به عنوان یک پناهگاه و منبع غذایی استفاده می‌کنند. گال‌ها وظیفه تأمین غذا و حفاظت از حشره میهمان خود در مقابل صدمات فیزیکی و شرایط نامناسب محیطی را برعهده دارند (۴). گال‌های رز در اثر فعالیت زنبورهای گالزای خانواده *سینیپیدا* (*Cynipidae*)

به‌ویژه در اثر فعالیت نسل جنسی *دیپلولپسیس مایری* (*Diplolepsis mayri*) روی بوته‌های رز وحشی به‌وجود می‌آیند.

گال‌ها منابع با ارزشی از ترکیبات فعال بوده و ارزش فراوان اقتصادی دارند. گال‌های ایجاد شده روی رز وحشی توسط زنبور گالزای دیپلولپیس مایری خاصیت دارویی داشته و به‌عنوان داروی قابض مصرف درمانی دارد. رزها به دلیل داشتن بالاترین مقدار ویتامین C (۴۰۰-۳۰۰ میلی‌گرم) به خوبی شناخته شده‌اند (۵). علاوه بر این میوه و گلبرگ‌های رز حاوی مواد دیگری نظیر ویتامین‌ها و مواد معدنی، کاروتنوئیدها، توکوفرول، بیوفلاونوئید، اسیدهای میوه‌ای، تانن، پکتین، قندها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه و روغن‌های ضروری است. عملکرد دارویی میوه‌های گل سرخ ممکن است تا حدی نشان از وفور ترکیبات فنولیک در آنها باشد. ترکیبات فنولی دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت بیوشیمیایی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و همچنین توانایی تغییر بیان ژن است (۶و۷).

تاکنون در مورد خاصیت ضدمیکروبی گال‌های رز گزارشی منتشر نشده و بیشتر مقالات موجود در ارتباط با گال‌های درخت بلوط است. این مطالعه به منظور تعیین اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی، متانولی و استونی گال رز وحشی ایجاد شده توسط زنبور *دیپلولپسیس مایری* علیه *استافیلوکوکوس آرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* انجام شد.

## روش بررسی

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی گال‌های رز وحشی از مناطق مرتعی و جنگلی استان لرستان در تابستان سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری شدند و توسط محققان سازمان جهادکشاورزی لرستان نوع گال و زنبور ایجادکننده آن (*دیپلولپسیس مایری*) شناسایی و مورد تایید قرار گرفتند. ابتدا گال‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰درصد قرار گرفتند. به منظور رفع اثر هیپوکلریت، ۴-۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. گال‌ها در شرایط کاملاً استریل خشک شدند و به شکل پودر در آمدند.

عصاره‌گیری از گال با دستگاه سوکسله به مدت ۵ ساعت با استفاده از حلال‌های متانول، استون و آب به‌صورت جداگانه انجام شد. ۵۰ گرم از پودر خشک گال رز وحشی در ۲۵۰ میلی‌لیتر از حلال در بالن مخصوص و درون دستگاه روتاری در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس عصاره تهیه شده تحت شرایط استریل خشک و به صورت پودر به‌دست آمد. عصاره‌های تهیه شده تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند.

سویه‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* (ATCC:25923) و *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC:9854) از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

با حل کردن یک گرم از پودر عصاره در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره تهیه گردید. سپس به روش تهیه سری رقت غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آماده گردید (۸).

۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل نیم استاندارد مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ cfu/ml) به‌صورت یکنواخت بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه چاهک‌هایی در محیط کشت ایجاد گردید و انتهای هر چاهک با ۱۰ میکرولیتر آگار مذاب بسته شد. در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت اینکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف هر چاهک بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. این آزمون ۳ بار تکرار گردید. آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت (۸). برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (minimum inhibitory concentration: MIC) و حداقل غلظت کشندگی (minimum bactericidal concentration: MBC) عصاره‌های گال به روش میکرودایلوشن، MIC عصاره‌های متانولی، استونی و آبی به روش میکروتیتردایلوشن تعیین شد. غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۳، ۷/۸، ۳/۹، ۱/۹۵ و ۰/۹۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره متانولی، استونی و آبی تهیه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف به ترتیب در خانه‌های شماره ۱ تا ۱۰ چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ایی ته U شکل استریل ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل لوله نیم استاندارد مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ cfu/ml) به چاهک‌ها اضافه شد. چاهک‌های سری ۱۱، حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل ۰/۵ استاندارد مک فارلند همراه با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به عنوان کنترل مثبت و چاهک‌های سری ۱۲ حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت استریل مولر هینتون براث به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (۹).

میزان جذب نوری چاهک‌های میکروپلیت در دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. پس از ۴۸ ساعت اینکوباسیون میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مجدداً میزان جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر بررسی گردید. از مقایسه میزان جذب نوری هر یک از چاهک‌ها قبل و بعد از انکوباسیون و همچنین بررسی چشمی کدورت ایجاد شده در چاهک‌ها کمترین غلظت از عصاره که در آن کدورتی مشاهده نگردید؛ به عنوان میزان MIC در نظر گرفته شد. به منظور تعیین MBC عصاره‌ها از چاهک‌های مربوط به MIC و چاهک‌های قبل از آن که کدورت قابل مشاهده نداشتند؛ ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس

*جدول ۱ : قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس آرئوس و انتروکوکوس فکالیس در غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی، استونی و آبی گال رز وحشی*

| باکتری | عصاره | | غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۵۰۰ | ۲۵۰ | ۱۲۵ | ۶۲/۵ | ۳۱/۳ | ۱۵/۶ | آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم | P-value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| استافیلوکوکوس آرئوس | متانولی | میانگین و انحراف معیار | ۲۷/۳± ۲/۵ | ۲۲/۷± ۲/۵ | ۲۰± ۳/۴ | ۱۸/۷± ۳/۰ | ۱۷/۳± ۲/۵ | ۱۶/۳± ۲/۳ | ۱± ۰/۲۵ | ۰/۰۵۷ |
| | | میانگین رتبه | ۱۶/۶۷ | ۱۲/۶۷ | ۹/۳۳ | ۷/۵ | ۶/۱۷ | ۴/۶۷ | - | - |
| | استونی | میانگین و انحراف معیار | ۲۶/۷± ۰/۶ | ۲۳/۷± ۲/۳ | ۱/۷± ۲۲ | ۲۱/۷± ۲/۹ | ۱۷/۳± ۰/۶ | ۱۲/۰± ۱/۷ | ۱± ۰/۲۵ | ۰/۰۰۹ |
| | | میانگین رتبه | ۱۷ | ۱۲/۶۷ | ۱۰/۳۳ | ۱۰ | ۵ | ۲ | - | - |
| | آبی | میانگین و انحراف معیار | ۰/۰± ۰/۲ | ۷/۱± ۰/۱۷ | ۷/۱± ۰/۱۴ | ۲/۱± ۳/۱۱ | ۰/۰± ۰/۸ | ۰/۰± ۰/۷ | ۱± ۰/۲۵ | ۰/۰۰۵ |
| | | میانگین رتبه | ۱۷ | ۱۳/۶۷ | ۱۱ | ۸/۳۳ | ۵ | ۲ | - | - |
| | P-value | | ۰/۰۵۵ | ۰/۰۵۴ | ۰/۰۵۸ | ۰/۰۴۸ | ۰/۰۵۵ | ۰/۰۲۳ | - | - |
| انتروکوکوس فکالیس | متانولی | میانگین و انحراف معیار | ۲۲/۷± ۲/۵ | ۲۱/۰± ۱/۳ | ۱۹/۳± ۳/۰ | ۱۸/۰± ۲/۶ | ۱۴/۳± ۱/۵ | ۱۳/۰± ۳/۴ | ۱± ۰/۲۳ | ۰/۱۴۹ |
| | | میانگین رتبه | ۱۴/۸۳ | ۱۲/۳۳ | ۱۰/۵۰ | ۸/۳۳ | ۶/۱۷ | ۴/۳۳ | - | - |
| | استونی | میانگین و انحراف معیار | ۲/۱± ۳/۱۶ | ۰/۰± ۰/۱۳ | ۲/۱± ۷/۱۰ | ۲/۱± ۳/۹ | ۶/۳± ۷/۷ | ۳± ۷/۳ | ۱± ۰/۲۳ | ۰/۰۰۷ |
| | | میانگین رتبه | ۱۷ | ۱۴ | ۱۰/۳۳ | ۸/۵۰ | ۳/۸۳ | ۳/۳۳ | - | - |
| | آبی | میانگین و انحراف معیار | ۰/۰± ۰/۲ | ۵/۱± ۷/۱۶ | ۰/۰± ۰/۱۵ | ۲/۱± ۷/۱۳ | ۰/۰± ۰/۱ | ۴/۶± ۷/۶۷ | ۱± ۰/۲۳ | ۰/۰۰۶ |
| | | میانگین رتبه | ۱۷ | ۱۳/۳۳ | ۱۱ | ۸/۶۷ | ۵ | ۵/۳۳ | - | - |
| | P-value | | ۰/۰۳۳ | ۰/۰۴۹ | ۰/۰۳۳ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۷۴ | ۰/۰۶۹ | - | - |

از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. غلظتی از عصاره‌های مورد آزمایش که بر روی محیط کشت جامد مربوط به آن رشدی از باکتری مشاهده نشد؛ به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. به منظور تایید نتایج، آزمون هر نمونه ۳ بار تکرار گردید.

ترکیبات تشکیل‌دهنده گال رز وحشی به روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) تعیین گردید. این دستگاه دارای ردیاب جرمی Aglient 5975 C با منبع یونیزاسیون الکترونی (El) کوپل شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی Aglient 7890 است که از ستون HP-5MS با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر تشکیل شده است. دمای محل تزریق (Inlet) دستگاه کروماتوگرافی گازی در ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، دمای منبع یونیزاسیون ردیاب جرمی روی ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای آنالایزر (کوادروپل) روی ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد و دمای واسط بین GC-MS روی ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید.

داده‌های با استفاده از نرم‌افزار SPSS-20 تجزیه و تحلیل شدند. برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیروویلک استفاده شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون کروسکال والیس انجام شد و برای مقایسه دو به دو گروه‌ها از آزمون من‌ویتنی استفاده گردید. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها**

عصاره های متانولی، استونی و آبی گال رز وحشی دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه کوکسی‌های گرم مثبت مورد آزمایش بودند. اندازه قطر هاله عدم رشد سویه‌های استاندارد در محدوده ۳۰-۸ میلی‌متر به‌دست آمد (جدول یک).

برای باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* تنها در غلظت‌های ۶۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱۵/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت آماری معنی‌داری بین سه عصاره مورد مطالعه مشاهده شد. به طوری که در این دو غلظت قطر هاله عدم رشد در عصاره آبی به‌طور معنی‌داری کمتر از دو عصاره دیگر بود (P<۰/۰۵).

برای باکتری *انتروکوکوس فکالیس* در غلظت‌های ۵۰۰-۶۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت آماری معنی‌داری بین سه عصاره مشاهده شد. به طوری که در این غلظت‌ها قطر هاله عدم رشد در عصاره استونی به‌طور معنی‌داری کمتر از دو عصاره دیگر بود (P<۰/۰۵).

تفاوت آماری معنی‌داری در قطر هاله عدم رشد هر دو باکتری در غلظت‌های مختلف عصاره متانولی مشاهده نشد؛ ولی قطر هاله

جدول ۲ : مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره متانولی، آبی و استونی گال رز وحشی

| باکتری | عصاره متانولی (mg/ml) | | عصاره آبی (mg/ml) | | عصاره استونی (mg/ml) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC |
| استافیلوکوکوس آرئوس | ۱۵/۶ | ۳۱/۳ | ۶۲/۵ | ۱۲۵ | ۳۱/۳ | ۳۱/۳ |
| انتروکوکوس فکالیس | ۳۱/۳ | ۶۲/۵ | ۶۲/۵ | ۱۲۵ | ۱۵/۶ | ۳۱/۳ |

حداقل غلظت بازدارندگی (minimum inhibitory concentration: MIC) ، حداقل غلظت کشندگی (minimum bactericidal concentration: MBC)

جدول ۳ : مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در گال رز وحشی روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS)

| ترکیبات شناسایی شده | درصد ترکیب | درصد احتمال حضور در گیاه | اندیس بازداری کواتس | زمان رهاسازی |
|---|---|---|---|---|
| Oleic Acid | ۲۴/۹۳ | ۹۹ | ۲۱۷۶ | ۳۲/۷۲۲ |
| Palmitic acid | ۱۴/۴ | ۹۹ | ۲۰۷۱ | ۳۱/۶۸۰ |
| 9-Octadecenoic acid (Z), Red oil | ۱۳/۲۱ | ۹۵ | ۲۱۹۵ | ۳۲/۸۲۴ |
| Methyl Oleate | ۱۱/۷۶ | ۹۹ | ۲۱۹۸ | ۳۲/۵۱۸ |
| 1,2,3-Benzenetriol | ۲/۴۶ | ۹۰ | – | ۲۵/۱۰۳ |
| Valeric acid | ۲/۲۱ | ۸۷ | ۸۸۱/۷ | ۶/۵۵۳ |
| Methyl palmitate | ۲/۰۹ | ۹۹ | ۱۹۳۱ | ۳۱/۳۳ |
| 2-(Naphthylimino)-4,4-dimethylthia zolin | ۲/۰۳ | ۸۶ | – | ۲۳/۰۶۸ |
| Pyrogallol C.I. | ۱/۹۲ | ۹۳ | – | ۲۳/۹۳ |
| iso-Valeric Acid | ۱/۶۳ | ۷۲ | ۸۷۷/۱ | ۶/۴۳۶ |
| Stearic acid | ۰/۵۹ | ۹۸ | ۲۱۴۱ | ۳۲/۶۶ |

عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره‌های استونی و آبی تفاوت آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر از غلظت‌های دیگر بود.

مقایسه باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* با *انتروکوکوس فکالیس* با غلظت‌های ۵۰۰-۱۵/۶ میلی گرم در میلی‌لیتر در عصاره متانولی اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داد.

قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* در عصاره استونی در همه غلظت‌ها به‌طور معنی‌داری بزرگتر از قطر هاله عدم رشد باکتری *انتروکوکوس فکالیس* بود (P<۰/۰۵).

در عصاره آبی تنها در غلظت‌های ۶۲/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر و ۳۱/۳ میلی گرم در میلی‌لیتر اختلاف آماری معنی‌داری بین دو باکتری مشاهده شد (P<۰/۰۵). به‌طوری که قطر هاله عدم رشد باکتری *انتروکوکوس فکالیس* در این غلظت‌ها به‌طور معنی‌داری بزرگتر از قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* بود. در سایر غلظت‌ها بین دو باکتری گرم مثبت اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید.

مقادیر MIC و MBC عصاره‌های متانولی، استونی و آبی گال رز وحشی برای هریک از باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* در جدول ۲ آمده است.

اولئیک اسید (۲۴/۹۳درصد)، پالمیتیک اسید (۱۴/۴ درصد) و ۹-اکتادکنوئیک اسید (۱۳/۲۱ درصد) بیشترین ترکیبات فعال و موثر موجود در گال رز وحشی شناسایی شدند (جدول ۳).

## بحث

بر اساس آزمون‌های انجام شده به روش انتشار چاهک مشخص گردید که عصاره متانولی، استونی و آبی گال‌های رز وحشی دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت هستند. در روش انتشار چاهک با افزایش غلظت عصاره‌ها، اندازه قطر هاله عدم رشد نیز افزایش یافت. بر اساس نتایج این آزمون اختلاف معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره مشاهده شد.

در مطالعه Basri و همکاران روی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی مشخص گردید متانول ۸۵درصد در مقایسه با سایر حلال‌ها قابلیت بیشتری برای استخراج ترکیبات فعال گیاهی داشته و دلیل اثر بهتر عصاره‌های متانولی دانسته شد. انتخاب روش و حلال مناسب برای داشتن عصاره‌ای با خاصیت ضدباکتریایی مناسب، مهم و قابل توجه است و بر روی فعالیت‌های بیولوژیکی و مواد حاصل از عصاره اثرگذار است. عصاره‌های گیاهان معمولاً در حلال‌های آلی از قبیل اتانول، متانول، استون و هگزان حل می‌شوند و در مقایسه با عصاره آبی اثر بیشتری دارند. Basri و همکاران از دو حلال استونی و متانولی برای عصاره‌گیری استفاده نمودند که ممکن است عصاره‌گیری با این مواد توانسته مواد موثره بیشتری را از خانواده ترکیبات ضدمیکروبی نظیر تانن، اسیدتانیک و اسید گالیک گال‌های بلوط را جداسازی کند (۱۰). در صورتی که در مطالعه حاضر عصاره آبی نیز موثر واقع شد و دارای فعالیت ضدباکتریایی بود. در مطالعه جهانیان و همکاران که روی خصوصیات ضدمیکروبی گال‌های خرنوک و تیغی درخت بلوط بر باکتری‌های بیماری‌زای شایع انجام شد؛ مشخص گردید دلیل اختلاف در نوع

عصاره تهیه شده از گال، نوع گال، غلظت‌های به‌کار رفته و روش عصاره‌گیری است. این نتایج قابل مقایسه با نتایج ضدمیکروبی حاصل از سایر گال‌ها و گونه‌های بلوط نیست؛ ولی وجه مشترک همه مطالعات، خواص ضدمیکروبی گال‌های بلوط به دلیل وجود تانن موجود در آنها بوده است (۱۱).

مطالعات کمی در مورد شناسایی ترکیبات موثره و اثر ضدباکتریایی گال رز وحشی در دنیا انجام شده است و اطلاعات منتشر شده‌ای در دسترس نیست. بررسی ترکیبات شناسایی شده به روش گازکروماتوگرافی- طیف‌سنجی جرمی نشان داد که بیش از ۶۵درصد از مواد تشکیل‌دهنده گال رز وحشی را اسیدهای چرب تشکیل می‌دهند. Desbois و Smith در گزارشی اعلام نمودند اسیدهای چرب مانع از رشد و یا حتی باعث مرگ باکتری‌ها می‌شوند و دلیل آن را دخالت اسیدهای چرب در چرخه انتقال الکترون در غشاءسیتوپلاسمی باکتری‌ها دانستند که این مداخله با برهم‌زدن وظایف غشاء در باکتری‌ها به مرگ آنها می‌انجامد (۱۲). Basri و همکاران تحقیقات بسیاری بر روی گال‌های بلوط انجام داده‌اند (۱۰و۱۳و۱۴). آنها اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و استونی گال بلوط ایجاد شده به‌وسیله زنبور گالزای سینیپس گال تینکتوریا را بر روی سه باکتری گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس آرئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *باسیلوس سوبتیلیس* و سه باکتری گرم منفی مانند *سالمونلا تیفی موریوم* و *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد مطالعه قرار دادند. میزان MIC عصاره‌های استونی و آبی گال بلوط یکسان و برابر ۰/۰۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. در این مطالعه میزان MIC عصاره آبی و استونی گال رز وحشی بر *استافیلوکوکوس آرئوس* یکسان و برابر ۳۱/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و میزان MIC عصاره آبی و استونی و *انتروکوکوس فکالیس* برابر ۶۲/۵ و۱۵/۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. در مطالعه Basri و همکاران عصاره‌های استونی و آبی گال‌های بلوط اثرات باکتریوسیدال بر سویه *استافیلوکوکوس آرئوس* داشتند (۱۴). میزان MIC گال رز وحشی در محدوده ۳۱/۳-۱۵/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد که در مقایسه با گال بلوط بیشتر است. دلیل احتمالی این تفاوت به نوع گال و ترکیبات فعال موجود در آنها مربوط است.

در اکثر موارد رابطه مستقیمی بین قطر هاله عدم رشد و غلظت عصاره گال‌ها وجود داشت که این روند نشان می‌دهد گال‌ها اثر ضدباکتریایی مشخصی دارند و با افزایش غلظت ماده موثره آنها اثر ضدباکتریایی نیز افزایش می‌یابد. اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی گال رز وحشی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حدوداً مشابه آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم بود. عصاره متانولی، استونی و آبی گال رز وحشی بر روی باکتری‌های گرم مثبت مؤثر و دارای فعالیت ضدباکتریایی یکسانی بودند. در صورتی که این نتیجه با نتایج بعضی محققین هماهنگ نیست (۱۶-۱۴). تنوع در مناطق جغرافیایی جمع‌آوری گال‌ها، نوع و گونه زنبورهای ایجاد کننده گال (نوع گال) و روش‌های مختلف عصاره‌گیری، می‌توانند سبب ایجاد اختلاف در نتایج به‌دست آمده و مقادیر مختلف MIC گال‌های مورد مطالعه محققان باشند. در مطالعه Vermani و Prabhat اثر ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی، آبی، کلروفرمی و پترولیوم اتری گال بلوط بر باکتری‌های بیماری‌زای دهان و دندان ارزیابی شد و عصاره متانولی از سایر عصاره‌ها فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نشان داد. عصاره متانولی بیشترین اثر را بر روی استرپتوکوکوس سانگوئیس داشت و *استافیلوکوکوس آرئوس*، *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس سالیواریوس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (۱۵).

تانن یک ترکیب فنولی با خاصیت ضدباکتریایی است که در گال بلوط وجود دارد و می‌توان خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌های مختف گال‌های بلوط را به دلیل وجود تانن در این عصاره‌ها دانست (۱۷). در مطالعه Rao و همکاران ضمن اثبات اثر ضدمیکروبی عصاره متانولی گال بلوط بر *شیگلا فلکسنری*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، *سالمونلا تیفی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا نومونیه*، *پروتئوس ولگاریس*، *انتروباکتر آئروژنز*، *آسپرژیلوس نایجر*، *کاندیدا آلبیکنس* و *تریکوفیتون روبروم* این فعالیت را به ترپنوئیدها، تانن و فلاونوئید موجود در عصاره نسبت دادند (۱۸).

انجام مطالعاتی در ارتباط با تجزیه و شناسایی ترکیبات فعال تشکیل‌دهنده گال‌های رز و ارزیابی مقایسه‌ای آنها پیشنهاد می‌گردد.

## نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های متانولی، استونی و آبی گال رز وحشی در شرایط آزمایشگاهی علیه باکتری‌های گرم مثبت بیماری‌زا شامل *استافیلوکوکوس آرئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* فعالیت ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای دارند.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه (شماره ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۳۱۱۴) خانم عاطفه حق‌پرستی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی از دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان بود.

## References

1. Oskay M, Oskay D, Kalyoncu F. Activity of some plant extracts against multi-drug resistant human pathogens. Iran J Pharm Res. 2009; 8(4): 293-300.

2. Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa strains. Asian Pac J Trop Dis. 2010; 3(4): 266-69. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10) 60064-8

3. Hosein Farzaei M, Abbasabadi Z, Reza Shams-Ardekani M, Abdollahi M, Rahimi R. A comprehensive review of plants and

their active constituents with wound healing activity in traditional Iranian medicine. Wounds. 2014 Jul; 26(7): 197-206.

4. Stone GN, Schönrogge K. The adaptive significance of insect gall morphology. Trends in Ecology & Evolution. 2003; 18(10): 512-22. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00247-7

5. Guclu S, Hayat R, Shorthouse JD, Tozlu G. Gall-inducing wasps of the genus diplolepis (Hymenoptera: Cynipidae) on shrub roses of Turkey. Proc Entomol Soc Wash. 2008; 110(1): 204-17. doi: http://dx. doi.org/10.4289/0013-8797-110.1.204

6. Mishra RP, Arshad M, Sami A. Antibacterial properties of Rosa indica (L.) Stem, leaves and flowers. J Pharm Biomed Sci. 2011; 12(15): 1-3.

7. Manjari SA, Kanti CC, Sarojini N, Sriti K. Correlation between phytochemical screening and in vitro antibacterial activity study of Rosa Indica LINN leaves. Int J Res Ayurveda Pharm. 2011; 2(5): 1595-97.

8. Muskhazli M, Nurhafiza Y, Nor Azwady AA, Nor Dalilah E. Comparative study on the in vitro antibacterial efficacy of aqueous and methanolic extracts of Quercus infectoria Gall`s against cellulosimicrobium cellulans. Journal of Biological Sciences. 2008; 8(3): 634-38. doi: 10.3923/jbs.2008.634.638

9. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods. 2000 Apr; 40(2): 175-79.

10. Basri DF, Tan LS, Shafei Z, Mohamad Zin N. In vitro antibacterial activity of galls of Quercus infectoria Olivier against oral pathogens. J Evid Based Complementary Altern Med. 2012; Article ID: 632796. http://dx.doi.org/10.1155/2012/632796

11. Jahaniyan-Najaf abadi F, Mohammadi-Sichani M, Tavakoli M. [The antibacterial activity of Andricus Moreae gall methanol and acetone extracts of Quercus Infectoria against gram positive bacteria]. Yafte. 2013; 15(2): 77-83. [Article in Persian]

12. Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Feb; 85(6): 1629-42. doi: 10.1007/s00253-009-2355-3

13. Basri DF, Khairon R. Pharmacodynamic interaction of Quercus infectoria galls extract in combination with Vancomycin against MRSA using microdilution checkerboard and time-kill assay. J Evid Based Complementary Altern Med. 2012; Article ID: 493156. http://dx.doi.org/ 10.1155/2012/493156

14. Basri DF, Fan SH. The potential of aqueous and acetone extracts of galls of Quercus infectoria as antibacterial agents. Indian J Pharmacol. 2005; 37(1): 26-29.

15. Vermani A, Prabhat N. Screening of Quercus infectoria gall extracts as anti-bacterial agents against dental pathogens. Indian J Dent Res. 2009 Jul-Sep; 20(3): 337-39. doi: 10.4103/0970-9290.57380

16. Satripathkul C, Leela T. Growth inhibition of pathogenic bacteria by extract of Quercus infectoria galls. Int J Biosci Biochem Bioinforma. 2001 May; 1(1): 26-31.

17. Khennouf S, Benabdallah H, Gharzouli K, Amira S, Ito H, Kim TH, et al. Effect of tannins from Quercus suber and Quercus coccifera leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. J Agric Food Chem. 2003 Feb; 51(5): 1469-73. doi: 10.1021/jf020808y

18. Rao N, Mittal S, Sudhan S, Menghani E. In vitro phytochemical screening, antioxidant & antimicrobial activity of the methanolic extract of Quercus infectoria L. Int J Pharm Pharm Sci. 2013; 5(2): 273-77.

**Original Paper**

# Antibacterial activity of methanol, acetone and aqueous extracts of Wild Rose gall against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*

**Haghparasti A (M.Sc)[1], Mohammadi-Sichani M (Ph.D)*[2], Tavakoli M (M.Sc)[3]**

[1]M.Sc in Microbiology, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[3]Academic Instructor, M.Sc in Medical Entomology and Vector Control, Lorestan Agricultural and Natural Resources Research Center, Khoramabad, Iran.

## Abstract

**Background and Objective:** Nowadays, microorganisms have high resistance to antibiotics due to indiscriminate and unnecessary consumption. Treatment of infections caused by resistant bacteria has become difficult and expensive. Galls wild rose created by wasp's species *Diplolepis mayri*. This study was done to evaluate antibacterial activity of methanol, acetone and aqueous extracts of Wild Rose gall against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*.

**Methods:** In this experimental laboratory study, the methanol, acetone and aqueous extracts of wild rose galls in 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 and 500 mg/dl were prepared by Soxhlet apparatus. Antibacterial activity of extracts was determined using well diffusion. MIC and MBC were determined by microdilution method. The active compounds of gall were evaluated by GC-MS.

**Results:** The inhibition zone of 500 mg/ml methanol, acetone and aqueous extracts of wild rose gall were 27.3, 26.7 and 20.0, respectively. The inhibition zone of wild rose gall was similar to imipenem (antibiotics). The extract concentration was related with antibacterial activity. The gall rose methanol extract showed the highest antibacterial effect. The MIC and MBC of methanol extract against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* was 62.5, 31.3 mg/ml, respectively.

**Conclusion:** This study showed that aqueous, methanol and acetone extracts of wild rose galls have strong antibacterial activity.

**Keywords:** Wild Rose gall, Antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*

*** Corresponding Author: Mohammadi-Sichani M (Ph.D), E-mail: mohamadi_m@iaufala.ac.ir**

**Received** 11 Jul 2016 **Revised** 24 Feb 2017 **Accepted** 26 Feb 2017

Cite this article as: Haghparasti A, Mohammadi-Sichani M, Tavakoli M. [Antibacterial activity of methanol, acetone and aqueous extracts of Wild Rose gall against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*]. J Gorgan Univ Med Sci. Autumn 2017; 19(3): 92-98. [Article in Persian]