Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(77): 82-89

In vitro study of antimicrobial effects of *Rosmarinus officinalis* leaf extract against some pathogens

Golshani Z[1], Dawoodi V[2]

1- Master of Microbiology, Young Researchers and Elite Club, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Received:5.May.2013, Accepted: 11.Sep.2013

Abstract

Background: Today with raised use of antibiotics and prevalence of resistant strains, there is need for antimicrobial drugs that have fewer side effects than antibiotics. Rosmarinus officinalis is a medicinal plant which had many uses in traditional medicine. In this study, methanol leave extract of this plant is tested on various pathogens.

Materials and Methods: In this in vitro study Rosmarinus officinalis was used to evaluate its antimicrobial effects. Methanol leave extract of this plant with concentrations of 400, 200, 100, and 50 mg/ml were prepared, and antibacterial activities were evaluated by well diffusion method on strains of Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration were determined by the microplate method.

Results: In this study, the most efficacy of thanol extract of rosemary leaves was at concentration of 400 mg/ml against Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli. Minimum inhibitory concentration of the extract on the growth of these bacteria showed changes from 6/25 mg/ml to 100 mg/ml. Also MBC of extract showed range from 12/5 to 200 mg/ml respectively.

Conclusion: It was found that rosemary methanol extract inhibited growth of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa but did not inhibit of Bacillus cereus growth.

Keywords: Plant Extracts, Rosmarinus Officinalis, Minimum Inhibitory Concentrations

*Corresponding Author:
Address: Department of Microbiology, Young Researchers and Elite Club, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
Email:zey_golshani@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 8 (شماره پیاپی 77)، آبان 1392، 89-82

مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی برگ رزماری روی سویه‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی

زینب گلشنی[1]، ویدا داودی[2]

1. کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت:92/2/15 تاریخ پذیرش: 92/6/20

چکیده

زمینه و هدف: امروزه با افزایش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و نیز شیوع سویه‌های مقاوم، خلاء ناشی از کاربرد داروهای ضد میکروبی جدید که دارای اثرات جانبی کمتری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها باشند احساس می‌شود. رزماری از گیاهان دارویی است که در طب قدیم کاربرد فراوانی داشته است. در این مطالعه اثر عصاره متانولی برگ این گیاه روی پاتوژن‌های مختلف بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی از گیاه Rosmarinus officinalis برای بررسی اثرات ضد میکروبی آن استفاده گردید. عصاره متانولی برگ‌های این گیاه با غلظت‌های 400، 200، 100 و 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و به روش انتشار چاهک روی سویه‌های اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی گردید. تست تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی به روش میکروپلیت انجام گرفت.

یافته‌ها: در این بررسی، بیشترین میزان اثر عصاره متانولی برگ رزماری روی سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی در غلظت‌های400 میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده گردید. غلظت مهارکنندگی این عصاره روی رشد این باکتری‌ها از 6/25 تا100 میلی گرم بر میلی لیتر تغییر نشان داد. هم‌چنین حداقل غلظت کشندگی عصاره در مورد این باکتری‌ها از 12/5 تا200 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش مشخص شد، عصاره متانولی گیاه رزماری بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا اثر دارد ولی روی باسیلوس سرئوس اثر مهاری ندارد.

واژگان کلیدی: عصاره گیاهی، رزماری، حداقل غلظت مهار کنندگی

***نویسنده مسئول:** دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اصفهان، ایران.

email: zey_golshani@yahoo.com

مقدمه

امروزه با افزایش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و داروهای ضد میکروبی شاهد شیوع روز افزون سویه‌های بیماری‌زای مقاوم به چندین آنتی بیوتیک هستیم. ظهور این سویه‌های مقاوم در بیماران بستری، روند درمان را طولانی و مشکل‌تر کرده است. با وجود این که تولید آنتی بیوتیک‌های مختلف روز به روز افزایش می‌یابد اما بروز مقاومت و انتشارآن در باکتری‌ها یک مشکل بزرگ جهانی را ایجاد کرده است. سودوموناس آئروژینوزا از پاتوژن‌های گرم منفی و غیر تخمیر کننده فرصت طلب در عفونت‌های بیمارستانی خصوصا زخم‌های عفونی می‌باشد. باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس نیز از پاتوژن‌های مهم بیمارستانی محسوب می‌گردند(1).

توجه به گیاهان دارویی با خواص میکروبی می‌تواند مشکلات رایج در استفاده از آنتی بیوتیک‌ها را خصوصا به علت عوارض جانبی، مرتفع سازد. اسانس و عصاره‌های گیاهان به عنوان عوامل مهم ضد میکروبی طبیعی سال‌هاست که مورد پژوهش قرارگرفته‌اند. اکلیل کوهی یا رزماری گیاهی علفی، با برگ‌های سبز و معطر و نوک تیز می باشد. اسانس رزماری ماده ای ضد میکروبی به شمار می رود و ترکیبات شیمیایی، خواص آنتی اکسیدانی و اثرات ضد میکروبی آن در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است (2، 3). در اسانس این گیاه موادی از قبیل بورنئول، لیمونن، کامفن، کامفر و ترکیبات دیگر گیاهی همچون اسیدهای فنلی از جمله اسید روزماریک، اسید کافئیک و اسید کلروژنیک وجود دارند (3). هدف از این مطالعه بررسی دوز موثر عصاره متانولی برگ رزماری بر روی گونه‌های بیماریزای بیمارستانی و تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و کشندگی آن بر روی این گونه‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان انجام شده است. در هر آزمایش جهت انجام محاسبات آماری از 3 تکرار استفاده گردید. سویه‌های باکتری از کلکسیون میکروبیولوژی مرکز تحقیقات تهران تهیه گردید. نمونه‌های گیاهی با همکاری هرباریوم و مرکز تحقیقات گیاهی استان اصفهان جمع آوری و شناسایی گردید.

تهیه نژادهای باکتریایی: باسیلوس سرئوس(ATCC:1247)استافیلوکوکوس ارئوس(ATCC:25923) اشرشیاکلی(ATCC:25922) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC:1430)که از کلکسیون میکروبی مرکز تحقیقات تهران، به صورت لیوفیلیزه خریداری گردیدند. این نمونه‌ها سپس مطابق روش‌های استاندارد احیا گردیدند.

عصاره گیری: برگ‌های تازه گیاه رزماری جمع‌آوری و در مکانی به دور از آفتاب خشک گردید. سپس برگ‌های خشک شده با آسیاب برقی پودر گردید. 50 گرم از برگ‌های گیاه رزماری توزین و در ارلن استریل ریخته شده و به آن 250 میلی‌لیتر متانول (Merk) 98 درصد اضافه گردید تا کلیه ترکیب‌های گیاه حل گردد. ارلن حاوی الکل و پودر گیاهی به مدت 48 ساعت درون شیکر قرار داده شدند تا در دمای 40 درجه سانتی‌گراد، حلال اثر خود را اعمال کند. از دستگاه روتاری در مرحله بعد جهت حذف حلال استفاده گردید. در نهایت عصاره‌های گیاه رزماری در ظروفی استریل و در یخچال به منظور جلوگیری از اثر نور با پوشش ورق آلومینیوم نگهداری گردیدند (3، 4 و 5). عصاره‌هایی با غلظت‌های 400، 200، 100 و 50 میلی گرم بر میلی لیتر تهیه و درحلال 5 درصد DMSO (Dimethylsulfoxide) حل و در آزمون انتشار چاهک و تعیین MIC استفاده شدند. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، چند کلنی از کشت تازه و 24 ساعته باکتری به محیط کشت مولر هینتون براث منتقل و کدورتی معادل با نیم مک فارلند(کدورت معادل $1/5\times10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر) تهیه گردید. سپس این سوسپانسیون به نسبت 0/01 رقیق شد تا کدورت $1/5\times10^6$ به دست آید. در روش انتشار چاهک با استفاده از سواپ استریل، کشتی یکنواخت از

سوسپانسیون با کدورت $1/5\times10^6$ در سطح پلیت مولر هینتون آگار داده شد. سپس چاهک‌هایی با قطر 6 میلی‌متر و با فاصله 2/5 سانتی‌متر از یکدیگر ایجاد و در هریک از چاهک‌ها 100 میکرولیتر از عصاره متانولی تزریق شد. از محلول DMSO به عنوان کنترل منفی و آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس محیط‌های کشت داده شده به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37 درجه گرم خانه گذاری گردیدند. در نهایت پلیت‌ها از لحاظ هاله عدم رشد مورد بررسی و قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد(5).

سنجش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)به روش میکرودایلوشن: برای این منظور از نژادهای باکتری‌های پاتوژن یاد شده یک کشت 24 ساعته در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و در محیط مولر هینتون براث تهیه شد. سریال‌های رقت معادل 12/5،6/25،۲۵،۵۰،۱۰۰،۲۰۰، 400 میلی‌گرم در میلی‌لیتراز عصاره تهیه و70 میکرولیتر از آنها به میکروپلیت‌های 96 خانه‌ایی که قبلا حاوی 70 میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک فارلند بودند اضافه گردید. سپس آزمایشات مشابه برای کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری و بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) نیز انجام شد. میکروپلیت‌ها سپس به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37 درجه گرم خانه گذاری گردیدند. کم‌ترین رقت از عصاره که کدورتی در آن مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) گزارش شد. آزمایشات تکرار و میانگین ارائه گردید (5، 6).

سنجش میزان حداقل غلظت کشندگی (MBC): با توجه به نتایج(MIC)، حداقل غلظت کشندگی نیز تعیین شد. از تمام خانه‌هایی که رشد باکتری در آنها کاملا متوقف شده بود، به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و 24 ساعت در دمای 37 درجه گرم خانه گذاری شدند. غلظت‌هایی که فاقد رشد باکتری بودند، به عنوان MBC گزارش گردیدند (6، 8، 9 و 10). هریک از آزمون‌ها سه مرتبه تکرار گردید و میانگین نتایج به دست آمد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم افزار آماری SPSS نسخه 14 انجام شد و برای بررسی اختلاف معنی‌دار از آزمون‌های آنالیز واریانس و آزمون X^2 استفاده و اختلاف بین آنها در سطح معنی داری ($p\leq0/001$) به دست آمد(11، 12).

یافته‌ها

نتایج حاصل از غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه رزماری به روش انتشار چاهک در جدول 1 آمده است. همان طور که در جدول مشخص است، عصاره متانولی رزماری از رشد باکتری‌های اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری کرده است، اما روی باسیلوس سرئوس اثری نداشته است. هم‌چنین با افزایش غلظت عصاره منانولی، هاله عدم رشد نیز افزایش داشته است.

جدول 1. قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره بر حسب میلی‌متر

باکتری	50	100	200	400	منفی	مثبت
استافیلوکوکوس اورئوس	8	9	11	15	-	21
باسیلوس سرئوس	-	-	-	-	-	15
اشرشیاکلی	-	8	9	14	-	24
سودوموناس آئروژینوزا	-	15	16	18	-	22

هم‌چنین این نتایج نشان داد عصاره رزماری روی سودوموناس آئروژینوزا، برخلاف مطالعات مشابه تاثیرگذار بوده است. علاوه بر این، غلظت 400mg/ml بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی اثر کمی داشته

است. مقادیر مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) عصاره متانولی برگ‌های رزماری علیه باکتری‌های ذکرشده در جدول 2 آمده است

جدول 2. حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی برحسب mg/ml در غلظت‌های مختلف عصاره متانولی

باکتری	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت کشندگی
استافیلوکوکوس اورئوس	6/ 25	12/5
باسیلوس سرئوس	-	-
اشرشیاکلی	100	200
سودوموناس آئروژینوزا	25	50

این نتایج مشخص کرد که از لحاظ حساسیت به عصاره متانولی در باکتری‌های مورد آزمایش اختلاف معنی داری($p\leq0/001$) وجود دارد. به عبارتی، بیش‌ترین حساسیت در سودوموناس آئروژینوزا و کم‌ترین حساسیت در باسیلوس سرئوس مشاهده شده است. بنابر این همان طور که در جدول مشاهده می‌گردد، حداقل غلظت مهارکنندگی در باکتری‌های مورد مطالعه بین 6/25 تا100 mg/ml و حداقل غلظت کشندگی بین 12/5تا 200mg/ml است.

بحث

نتایج به دست آمده مشخص کرد که هاله عدم رشد عصاره متانولی رزماری بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بین 8 تا 15 میلی‌متر بود و میزان MIC به دست آمده حدود 6/25mg/ml بود. هم‌چنین هاله عدم رشد در مورد سودوموناس آئروژینوزا بین 15 تا 18 میلی‌متر مشاهده گردید. در سال2007 در تحقیقی که Fu روی اثرات ضد میکروبی اسانس رزماری انجام داد، مشخص کرد که میزان هاله عدم رشد این اسانس بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برابر با 18 میلی‌متر وMIC برابر0/125 است (13) که حاکی از تشابه نتایج با مطالعه حاضر را(در قطر هاله عدم رشد)دارد. مطالعات دیگر اثرات اسانس رزماری را بر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس نشان داده اند (13، 14، 15). تسای و همکاران در سال 2007 در مطالعه ای بر روی استرپتوکوکوس سوبرینوس، اثر عصاره اتانولی رزماری را بررسی و میزان MIC را 1/42 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آورد (15). در مطالعه تانژا و همکاران اثر عصاره رزماری روی گونه‌های مختلف لیستریا بررسی و MIC بین 625 تا 5000 میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. هم‌چنین در این مطالعه مشخص شد مقاومت لیستریا به عصاره رزماری، به عصاره انتخاب شده، گونه‌های مختلف لیستریا و غلظت‌های مختلف عصاره بستگی دارد(5). وصال طلب و همکاران در سال 90 با بررسی اثر اسانس و عصاره رزماری و میخک روی قارچ Botrytis cinerea (به عنوان یک میکروب)، گزارش دادند، عصاره اتانولی هر دو گیاه به طور کلی فاقد اثر ضد قارچی بوده است. نتایج این آزمایش نشان داد، فعالیت ضد قارچی به غلظت به کار رفته گیاه، روش کاربرد فرآورده و نوع گیاه بستگی داشت. هم‌چنین در این مطالعه اسانس اثر بیشتری نسبت به عصاره از خود نشان داد (16). در مطالعه سلطان دلال و همکاران اثرات ضد میکروبی اسانس رزماری توسط روش‌های انتشار دیسک و رقت سازی در لوله بر روی استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی سیلین مورد ارزیابی قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد این پاتوژن‌ها در حدود 20 میلی‌متر مشاهده شد. حداقل غلظت مهار کنندگی0 1/4 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشنده رشد 2/8 مشاهده گردید (17). با مقایسه این نتایج می‌توان گفت اثر اسانس رزماری در مقایسه با عصاره به مراتب بیشتر بوده و هم‌چنین نتایج این مطالعه با نتایج سلطان دلال هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش مشخص شد، عصاره متانولی گیاه رزماری بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا اثر دارد ولی روی باسیلوس سرئوس اثر مهاری ندارد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و هم‌چنین سرکار خانم دکتر رنجبر تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. American journal of infection control. 2006;34(5 Suppl 1):S3-10; discussion S64-73.
2. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2008;46(2):446-75.
3. Tiwari TP, Bharti SK, Kaur HD, Dikshit RP, Hoondal GS. Synergistic antimicrobial activity of tea & antibiotics. The Indian journal of medical research. 2005;122(1):80-4.
4. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology. 2009;16(2-3):97-110.
5. Rožman T, Jeršek B. Antimicrobial activity of rosemary extracts (Rosmarinus officinalis L.) against different species of Listeria. Acta agriculturae Slovenica. 2009;93(1):51-8.
6. Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry. 2007;100(2):553-9.
7. Lo AH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. Carcinogenesis. 2002;23(6):983-91.
8. Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free radical research. 2006;40(2):223-31.
9. Matkowski A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants--a review. Biotechnology advances. 2008;26(6):548-60.
10. Baratta MT, Dorman HJD, Deans SG, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour and Fragrance Journal. 1998;13(4):235-44.
11. Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M, et al. chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of Rosmarinus officinalis L. Journal of agricultural and food chemistry. 2004;52(11):3530-5.
12. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Trevino EA. Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM, editors. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology' St Louis, Missouri: Mosby Co; 1990. p. 171-94.
13. Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytotherapy research : PTR. 2007;21(10):989-94.
14. Seydim AC, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food Research International. 2006;39(5):639-44.

15. Tsai P-J, Tsai T-H, Ho S-C. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of Streptococcus sobrinus. Food Chemistry. 2007;105(1):311-6.
16. Vesaltalab Z, Gholami M. The effect of clove buds and rosemary extracts and essences on control of botrytis cinerea growth. Plant Products Technology (Agricultural Research). 2012;11(2):1-11.
17. Soltan Dallal MM, Ghorbanzade Mashkani M, Yazdi MH, Aghamiri S, Mobasseri G, Abedi Mohtasab TP, et al.[Antibacterial effects of rosmarinusofficinalis on methicillin - resistant staphylococcus aureus isolated from patients and foods]. Scientific Journal Of Kurdistan University Of Medical Sciences. 2011;16(1):73-80.