



ارزیابی مقایسه‌ای اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاهان رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) و برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها بر سویه‌های استاندارد باکتری‌های اصلی ایجادکننده ورم‌پستان گاو

رضا راه‌چمنی^{۱*}، سامان ضرونی^۲، فرزاد قنبری^۱

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.
۲- دانش‌آموخته گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: Rahchamani@gonbad.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۶)

چکیده

با توجه به عوارض جانبی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، نیاز به مواد ضدباکتریایی جدید و طبیعی مطرح است که یک دسته از این نوع مواد، اسانس گیاهان دارویی می‌باشد. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاهان رزماری و ریحان و مقایسه آن‌ها با اثرات آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات علیه باکتری‌های اصلی ایجادکننده ورم‌پستان گاو‌ها شامل *استافیلوکوکوس آرنئوس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *اشریشیاکولای* انجام شد. ابتدا شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس‌های مذکور به روش گاز کروماتوگرافی انجام شد. همچنین حداقل غلظت مهاري و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌ها به روش رقیق‌سازی لوله‌ای و حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه به اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک در آگار تعیین گردید. تاثیر اسانس‌ها بر منحنی رشد باکتری‌ها در ساعت‌های ۰، ۶، ۱۰ و ۲۴ بررسی شد. مهمترین ترکیبات گیاه رزماری، شامل کارن (۴۵/۱۱ درصد) و اکالپیتول (۲۰/۶۲ درصد) و مهم‌ترین ترکیبات گیاه ریحان، شامل استراگول (۷۰/۴۲ درصد) و کارن (۱۷/۹۹ درصد) بودند. محدوده حداقل غلظت مهاري و کشندگی به ترتیب در مورد اسانس‌های رزماری ۰/۳۱۲-۰/۷۸ و ۰/۶۲۵-۰/۳۱۲ درصد و ریحان ۰/۳۹-۰/۶۲۵ و ۰/۰۷۸-۰/۶۲۵ درصد تعیین شد. در روش انتشار دیسک در آگار اثر ضدباکتریایی هر دو اسانس بر *استافیلوکوکوس آرنئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* به طور معنی‌داری کمتر از آموکسی‌سیلین / کلاولونات ($p < ۰/۰۵$) و بدون تفاوت معنی‌دار با جنتامایسین بود ($p > ۰/۰۵$) ولی اثرات مذکور بر *اشریشیاکولای* به طور معنی‌داری کمتر از اثر جنتامایسین و آموکسی‌سیلین / کلاولونات بود ($p < ۰/۰۵$). در ساعت ۲۴ منحنی رشد باکتری‌ها، اسانس رزماری و ریحان تعداد باکتری‌های *اشریشیاکولای* و *استافیلوکوکوس آرنئوس* و اسانس ریحان تعداد باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* را به صورت معنی‌داری کاهش دادند ($p < ۰/۰۵$). به طور کلی، اسانس رزماری و ریحان اثرات ضد باکتریایی داشتند و اثر آنها بر *استافیلوکوکوس آرنئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* تفاوت معنی‌داری با جنتامایسین نداشت.

کلیدواژه‌ها: ورم‌پستان، خاصیت ضد باکتریایی، اسانس، رزماری، ریحان.

مقدمه

بیماری‌های مختلفی توسط باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس*، *استرپتوکوکوس آگلانتیه* و *شریشیاکولای* ایجاد می‌شود ولی هر سه باکتری مذکور از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده ورم پستان گاو نیز هستند (Contreras and Rodrigues, 2011). مهمترین و متداول‌ترین درمان ورم پستان در دامداری‌ها تزریق داخل پستانی آنتی‌بیوتیک‌هاست که البته عوارضی مانند ایجاد سویه‌های مقاوم و باقیماندن دارو در شیر دارد (Alekish et al., 2017; Rahimian et al., 2021).

ورم پستان شایع‌ترین بیماری با خسارات اقتصادی زیاد در صنعت گاو شیری در سراسر جهان است (Zhu et al., 2016). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های داخل پستانی مهمترین درمان ورم پستان‌ها هستند ولی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به مقاوم شدن باکتری‌های معمول و همچنین نگرانی‌های بهداشت عمومی شده است. در سال‌های اخیر، ظهور سریع سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و کاهش اثرات نسل‌های جدید آنتی‌بیوتیک‌ها، منجر به تلاش‌های زیادی برای یافتن منابع جدید مواد ضد میکروبی مثل اسانس‌های گیاهان شده است (Sharifi-Rad et al., 2020). گزارش شده که بدنبال استفاده طولانی مدت از اسانس‌های گیاهی، افزایش سویه‌های مقاوم باکتریایی و عوارض جانبی در انسان مشاهده نشده است، بنابراین در حال حاضر استفاده از اسانس‌های مذکور در مبارزه علیه بیماری‌های باکتریایی، به عنوان یک سلاح قوی مطرح می‌باشد (Ananda Baskaran et al., 2009; Hasanpour et al., 2014). گزارش شده که با توجه به

افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌ها و وجود باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی از جمله شیر، تحقیقات زیادی برای استفاده از جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شده است. در این بین اسانس‌های گیاهی با توجه به اثرات ضدباکتریایی وسیع الطیف و عوارض جانبی کمتر یکی از بهترین جایگزین‌ها هستند (Park et al., 2012).

گیاه ریحان (*Basil*) با نام علمی *Ocimum basilicum*، خصوصیات درمانی متعدد داشته و در طب سنتی در موارد مختلف از جمله درمان عفونت‌های تنفسی استفاده شده است (Al Abbasy et al., 2015) و در چندین مطالعه هم اثرات ضدباکتریایی آن نشان داده شده است (De Moraes Peixoto et al., 2015; Rezzoug et al., 2019; De Martino et al., 2021; Da Silva et al., 2022).

قسمت‌های هوایی گیاه رزماری (*Rosemary*) با نام علمی *Rosmarinus officinalis*، دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدویروسی است. ترکیبات مهم اسانس رزماری شامل ۸-سینئول، کامفور و بتاکاریوفیلن می‌باشد (Oliveira et al., 2019; Rathore et al., 2022).

با توجه به مسائل ذکر شده و ممنوع بودن استفاده از آنتی‌بیوتیک در گاوداری‌های ارگانیک، نیاز به سایر روش‌های درمانی احساس می‌شود. از طرف دیگر با توجه به این که طبق بررسی نویسندگان مقاله حاضر، درباره اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاهان ریحان و رزماری بر باکتری *استرپتوکوکوس آگلانتیه* پژوهش‌های بسیار کمی انجام شده است، لذا در تحقیق حاضر باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* و *شریشیاکولای* نیز برای بررسی مورد نظر انتخاب

شدند تا با توجه به این که هر سه باکتری از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده ورم‌پستان گاو هستند، احتمالاً بتوان از نتایج مطالعه حاضر در پژوهش‌های بالینی مربوط به درمان ورم‌پستان گاو و همچنین دیگر بیماری‌های مرتبط با باکتری‌های مذکور استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

تحقیق آزمایشگاهی حاضر از نوع مطالعه تلقیحی (Inoculation study) بوده که در سال ۱۳۹۹ در دانشگاه گنبدکاووس انجام شده است.

- **آنالیز شیمیایی اسانس‌ها:** ابتدا اسانس گیاهان رزماری و ریحان از شرکت درین گلاب کاشان تهیه شدند و برای اطمینان از عدم آلودگی اسانس‌ها به میکروارگانیزم‌های قارچی و باکتریایی، بلافاصله اسانس‌های مذکور، در آزمایشگاه از فیلترهای مخصوص با اندازه ۰/۲ میکرومتر (BT103001, Membrane solution, USA) عبور داده شدند. در ادامه برای آنالیز اسانس‌ها از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) (Gas chromatography/mass spectrophotometry) (Model 5977A, Agilent Technologies, USA) با ستون موئینه DB 60 به طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه دمایی ستون از ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سلسیوس با سرعت ۴ درجه سلسیوس در دقیقه تنظیم شد و دمای محفظه تزریق ۲۶۰ درجه سلسیوس و گاز حامل هلیوم بود. پس از تزریق اسانس به محل مربوطه در دستگاه GC/MS و مشاهده طیف کروماتوگرام، با استفاده از زمان بازداری (Retention time)، اندیس

کواتس (Kovats index)، طیف جرمی و مقایسه با ترکیب‌های استاندارد موجود در کتابخانه اطلاعات کامپیوتری، شناسایی ترکیبات اسانس و تعیین درصد کمی در آن‌ها انجام گردید.

- **آماده‌سازی باکتری‌های تحقیق:** سویه‌های استاندارد باکتری‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* (*Streptococcus agalactiae*; PTCC:1768)، *استافیلوکوکوس آرنئوس* (*Staphylococcus aureus*; PTCC:1113) و *شریشیاکولای* (*Escherichia coli*; PTCC:1399) از طریق سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران- ایران) تهیه شد و پس از انتقال استاندارد به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی، هر سه باکتری دوبار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه (BD115, Binder, Germany) به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت تریپتیک سوی‌براث (Biolife, Milano, Italy) کشت داده شدند. در ادامه از محتویات لوله‌های مذکور به مقدار لازم، جداگانه برداشت کرده و به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرین استریل مخلوط کرده و در حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب‌های استریل در دمای ۲۰- درجه سلسیوس فریزر آزمایشگاهی (مدل FRZNF170، پارس، ایران) ذخیره‌سازی شد. همچنین برای تهیه نمونه‌های کار هم پس از یخ‌زدائی استاندارد از کشت ذخیره و انجام دوبار تجدید کشت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت و تهیه جمعیت میکروبی جوان، نهایتاً کشت چندخطی منطقه-ای در محیط کشت شیدار تریپتیک سوی آگار (Biolife, Milano, Italy) انجام می‌شد تا پرگنه‌های جدا و خالص از هر یک از باکتری‌های مورد تحقیق حاصل شود. در طول انجام تحقیق، کشت‌های مذکور

در دمای ۴ درجه سلسیوس یخچال آزمایشگاهی (مدل R-1298، سایوان، ایران) نگهداری شده و در صورت نیاز، هر ماه یکبار تجدید کشت می‌شدند (Basti et al., 2007).

- تعیین و تنظیم میزان تلقیح از هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه: بدین منظور ابتدا از کشت ذخیره هریک از باکتری‌های تحقیق، جداگانه به داخل محیط کشت تریپتیک سوی برای انتقال داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری (BD115, Binder, Germany) شد. در ادامه، عمل تجدید کشت از نتیجه کشت اول نیز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت و عیناً مطابق با شرایط کشت اول انجام گردید. سپس مقادیر مختلفی از نتایج کشت دوم هریک از باکتری‌های تحقیق، جداگانه به لوله کووت حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیک سوی برای استریل، تا مادامی انتقال داده شد که میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه طیف‌سنج جرمی (Spectrophotometry) (Libra S12, Biochrom Ltd., Cambridge, London) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به ۰/۱ برسد. در ادامه و بعد از تهیه رقت‌های متوالی با استفاده از آب پیتونه ۰/۰۱ درصد استریل و انتقال جداگانه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی محیط کشت تریپتیک سوی آگار و گرمخانه‌گذاری آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، تعداد کلی باکتری‌ها شمارش شد. کارهای آزمایشگاهی ذکر شده ۲ مرتبه تکرار شد و میانگین تعداد باکتری در کووت با جذب نوری ۰/۱ برای *شریشیاکولای* معادل 10^6 cfu/ml و 10^8 cfu/ml معادل 10^6 cfu/ml برای *استافیلوکوکوس آرنئوس* معادل 10^8 cfu/ml

۱/۲ و برای *استرپتوکوکوس آگلالتیه* معادل cfu/ml $10^7 \times 1/4$ محاسبه شد. لازم به ذکر است که با مشخص شدن مقادیر مذکور، در طی تحقیق حاضر زمانی که سوسپانسیون باکتریایی هر یک از باکتری‌های تحقیق بر مبنای جذب نوری ۰/۱ تهیه می‌شد، تعداد باکتری در هر یک از آن‌ها معادل اعداد محاسبه شده بود و می‌توانستیم از این سوسپانسیون‌ها غلظت‌های دلخواه و لازم را تهیه نمائیم (Basti et al., 2007).

- نحوه تعیین حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی اسانس گیاهان مورد تحقیق: بدین منظور از روش تهیه رقت‌های سریال در لوله آزمایش (ماکرودایلوشن براث) استفاده شد که برای انجام آن ماده دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) هم به عنوان امولسیفایر بکار گرفته شد. بدین منظور بعد از تهیه محیط کشت تریپتیک سوی براث حاوی ۵ درصد دی‌متیل سولفوکساید، ابتدا غلظت‌های کاهشی از اسانس‌های رزماری و ریحان در ۱۰ لوله آزمایش شامل مقادیر ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶، ۰/۰۷۸، ۰/۰۳۹ و ۰/۰۱۹ درصد در محیط کشت مذکور تهیه شد. سپس به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۲۵۰:۱ سوسپانسیون میکروبی (با غلظت نهایی مشخص شده با طول موج ۶۰۰ نانومتر و جذب ۰/۱ برای هر یک از باکتری‌های تحقیق) تلقیح شد و بعد از آن همه لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. لازم به ذکر است که در این مرحله، برای آزمایش رقت‌های مختلف هر اسانس، ۱۰ لوله و برای کنترل منفی (حاوی اسانس و محیط کشت)، کنترل مثبت (حاوی باکتری و محیط کشت) و شاهد (محیط کشت خالی)، هر کدام یک لوله جداگانه

در نظر گرفته می‌شد. نهایتاً هم برای هر کدام از اسانس‌ها آخرین رقتی که در آن هیچ گونه کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد باکتری مورد تحقیق) به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی هر اسانس نسبت به هر یک از باکتری‌ها، جداگانه در نظر گرفته می‌شد. در ادامه هم از محتویات تمام لوله‌های بدون کدورت، در محیط کشت تریپتیک سوی آگار کشت داده شد. پس از گذشت مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، بالاترین رقتی از هر اسانس که قادر به مرگ ۹۹ درصد از هر یک باکتری‌های زنده اولیه مورد تحقیق بود، به عنوان حداقل غلظت کشندگی هر اسانس ثبت می‌گردید (CLSI, 2015).

- بررسی خاصیت ضدباکتریایی اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های تحقیق به روش انتشار دیسک در آگار: طبق روش انتشار در آگار به صورت دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) به شیوه کربی بائر (Kirby- Bauer)، ابتدا با استفاده از سوسپانسیون میکروبی مربوط به هر یک از باکتری‌های مورد تحقیق (با غلظت نهایی مشخص شده با طول موج ۶۰۰ نانومتر و جذب ۰/۱ برای هر باکتری)، در سطح محیط کشت تریپتیک سوی آگار، کشت بصورت پخش کردن (کشت چمنی) انجام شد. در ادامه مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول رقیق نشده هر اسانس و رقیق شده با نسبت ۱:۱ با DMSO از هر اسانس، جداگانه بر روی دیسک‌های کاغذی استریل بلانک ساخت شرکت پادتن طب (تهران-ایران) ریخته شد که بعد از مدت ۲۰ تا ۴۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای حدود ۴۰ درجه (BD115, Binder, Germany)، دیسک‌ها خشک شدند. سپس دیسک‌ها با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت، روی محیط

کشت مذکور قرار داده شدند. برای مقایسه فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌ها هم دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین / کلاوولونات با غلظت ۲۰/۱۰ میکروگرم/دیسک، با شماره ۲۰۱۰۳ و جنتامایسین با غلظت ۱۰ میکروگرم/دیسک، با شماره ۲۰۳۰۹ (پادتن طب- تهران-ایران) تهیه و به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. بعد از گرمخانه‌گذاری همه محیط کشت‌های حاوی باکتری‌های تحقیق به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر منطقه عدم رشد مربوط به هر یک از اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها که در محیط کشت هر یک از باکتری‌های تحقیق حاصل می‌شد اندازه‌گیری گردیده (Fu et al., 2007) و نتایج با جداول CLSI مقایسه می‌گردید. لازم به ذکر است که جهت حصول اطمینان بیشتر، آزمایشات مذکور برای هر باکتری دو بار تکرار شده و میانگین حاصله ثبت می‌گردید.

- بررسی اثر اسانس‌های تحقیق بر منحنی رشد هر یک باکتری‌ها: بدین منظور، به محیط کشت استریل حاوی پنج درصد DMSO، غلظت Sub-MIC (sub-concentration minimum inhibitory) (یک رقت کمتر از MIC) اسانس مورد نظر اضافه شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی هر یک از باکتری‌های تحقیق (با غلظت نهایی مشخص شده با طول موج ۶۰۰ نانومتر و جذب ۰/۱) جداگانه به هر لوله آزمایش اضافه می‌شد. بعد از گرمخانه‌گذاری لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در ساعت‌های صفر، ۶، ۱۰ و ۲۴، رقت‌های متوالی تهیه و با شمارش تعداد پرگنه‌های حاصله، تعداد کل باکتری‌ها محاسبه و نمودار رشد هر باکتری بصورت

معنی داری $p < 0.05$ انجام شد. اختلاف میانگین‌ها نیز توسط آزمون توکی (Tukey) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

- اجزای شیمیایی اسانس رزماری: نتایج آنالیز شیمیایی اسانس رزماری نشان داد که از بین ترکیبات شناسایی‌شده، کارن با ۴۵/۱۱ درصد، اکالیپتول با ۲۰/۶۲ درصد و لووربنون با ۵/۹۱ درصد، عمده‌ترین ترکیبات موجود در آن را تشکیل داده‌اند (جدول ۱).

جداگانه و بر اساس $\log_{10} \text{cfu/ml}$ در واحد زمان (ساعت) رسم می‌شد (Jiang et al., 2011). در این مرحله هم آزمایشات مذکور برای هر باکتری دو بار تکرار شده و میانگین حاصله ثبت می‌گردید.

- تحلیل آماری داده‌ها: تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده، با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) با سطح

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس رزماری

ردیف	نام ترکیب موجود	زمان بازداری (دقیقه)	درصد ترکیب
۱	3-Caren	۴/۱۱	۴۵/۱۱
۲	Camphen	۴/۴۱	۴/۳۴
۳	Cymene	۵/۸۹	۳/۱۵
۴	D-Limonen	۶/۰۰	۳/۹۴
۵	Eucalyptol	۶/۰۸	۲۰/۶۲
۶	Linalool	۷/۶۳	۲/۲۹
۷	(+)-2-Bornanone	۸/۸۷	۵/۰۱
۸	Endo-borneol	۹/۵۲	۵/۲
۹	L-alpha-terpineol	۱۰/۱۱	۲/۲۲
۱۰	Levoverbenone	۱۰/۴۲	۵/۹۱
۱۱	Thymol	۱۲/۸۰	۲/۲۱

- اجزای شیمیایی اسانس ریحان: با توجه به نتایج آنالیز شیمیایی، عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس ریحان هم شامل استراگول با ۷۰/۴۲ درصد، کارن با ۱۷/۹۹ درصد و اکالیپتول با ۸/۶۱ درصد بودند (جدول ۲).

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی اسانس ریحان

ردیف	نام ترکیب موجود	زمان بازداری (دقیقه)	درصد ترکیب
۱	3-Caren	۴/۱۰	۱۷/۹۹
۲	O-Cymene	۵/۸۹	۰/۹۷
۳	D-Limonen	۶/۰۰	۱/۲۹
۴	Eucalyptol	۶/۰۷	۸/۶۱
۵	Linalool	۷/۶۴	۰/۷۱
۶	Estragole	۱۰/۲۴۶	۷۰/۴۲

- حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی اسانس گیاهان رزماری و ریحان: در تحقیق حاضر، محدوده حداقل غلظت مهاری (minimum inhibitory concentration; MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (minimum bactericidal concentration; MBC) علیه باکتری‌های مورد مطالعه مطابق جدول ۳، به ترتیب در مورد اسانس رزماری ۰/۰۷۸-۰/۳۱۲ و

۰/۳۱۲-۰/۶۲۵ درصد و در مورد اسانس ریحان ۰/۳۱۲-۰/۰۳۹ و ۰/۶۲۵-۰/۰۷۸ درصد محاسبه گردید. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین تأثیر اسانس رزماری بر باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و بیشترین تأثیر اسانس ریحان بر باکتری *اشریشیاکولای* بوده است.

جدول ۳- حداقل غلظت‌های مهاری و کشندگی اسانس‌های تحقیق بر باکتری‌های مورد آزمایش برحسب درصد

ماده تحقیق	باکتری مورد نظر	حداقل غلظت مهاری (درصد)	حداقل غلظت کشندگی (درصد)
اسانس گیاه رزماری	<i>استافیلوکوکوس آرنئوس</i>	۰/۳۱۲	۰/۶۲۵
	<i>اشریشیاکولای</i>	۰/۳۱۲	۰/۶۲۵
	<i>استرپتوکوکوس آگالاکتیه</i>	۰/۰۷۸	۰/۳۱۲
اسانس گیاه ریحان	<i>استافیلوکوکوس آرنئوس</i>	۰/۱۵۶	۰/۳۱۲
	<i>اشریشیاکولای</i>	۰/۰۳۹	۰/۰۷۸
	<i>استرپتوکوکوس آگالاکتیه</i>	۰/۳۱۲	۰/۶۲۵

- نتایج آزمون انتشار دیسک در آگار: اثر اسانس‌های رزماری، ریحان و دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات علیه باکتری‌های مورد آزمایش در جدول ۴ نشان داده شده است. طبق جداول CLSI هر سه باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند. اثر ضدباکتریایی هر دو اسانس (رقیق نشده و رقیق شده ۱:۱) و جنتامایسین بطور معنی‌داری کمتر از آموکسی‌سیلین/کلاولونات بود ($p < 0/05$). اثر هر دو اسانس بر *استافیلوکوکوس آرنئوس* و *استرپتوکوکوس*

آگالاکتیه به طور معنی‌داری کمتر از آموکسی‌سیلین/کلاولونات ($p < 0/05$) و بدون تفاوت معنی‌دار با جنتامایسین بود ($p > 0/05$). ولی اثر ضد باکتریایی بر *اشریشیاکولای* بطور معنی‌داری کمتر از جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات بود ($p < 0/05$). اثر اسانس رقیق شده رزماری بر هر سه باکتری تفاوت معنی‌داری با جنتامایسین نداشت ($p > 0/05$) ولی اثر اسانس رقیق شده ریحان بر هر سه باکتری کمتر از جنتامایسین بود ($p < 0/05$).

جدول ۴- اثر اسانس‌ها و آنتی بیوتیک‌ها بر قطر منطقه عدم رشد باکتری‌های تحقیق برحسب میلی‌متر (میانگین $\pm$ انحراف معیار)			
ترکیب آزمایش شده			قطر منطقه عدم رشد هر یک از باکتری‌های مورد آزمایش (میلی‌متر)
اشریشیاکولای	استافیلوکوکوس اورئوس	استرپتوکوکوس آگلالتیه	
اسانس خالص رزماری	۱۲/۰ $\pm$ ۹۷/۳۷ ^d	۱۸/۱ $\pm$ ۳۶/۹۰ ^b	۱۷/۰ $\pm$ ۸۰/۴۹ ^c
*اسانس رقیق شده رزماری (۱:۱)	۱۹/۱ $\pm$ ۱۰/۵۵ ^{bc}	۱۶/۱ $\pm$ ۱۱/۸۲ ^{bd}	۱۶/۱ $\pm$ ۰۸/۸۹ ^{dc}
اسانس خالص ریحان	۱۳/۰ $\pm$ ۳۱/۳۷ ^d	۱۵/۰ $\pm$ ۹۵/۶۹ ^{bd}	۱۵/۱ $\pm$ ۹۵/۴۰ ^{dc}
*اسانس رقیق شده ریحان (۱:۱)	۱۱/۰ $\pm$ ۶۸/۴۴ ^d	۱۱/۰ $\pm$ ۲۹/۲۰ ^{dc}	۱۳/۰ $\pm$ ۰۶/۵۳ ^d
جنتامایسین	۱۷/۰ $\pm$ ۶۰/۵۱ ^c	۱۸/۰ $\pm$ ۱۶/۶۵ ^b	۱۹/۰ $\pm$ ۷۵/۳۶ ^{bc}
آموکسی‌سیلین/کلاولونات	۲۲/۰ $\pm$ ۶۰/۲۶ ^a	۲۴/۰ $\pm$ ۰۶/۳۷ ^a	۲۵/۰ $\pm$ ۴۴/۵۱ ^a
سطح معنی‌داری	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
میانگین استاندارد	۰/۸۷	۰/۹۳	۰/۸۰

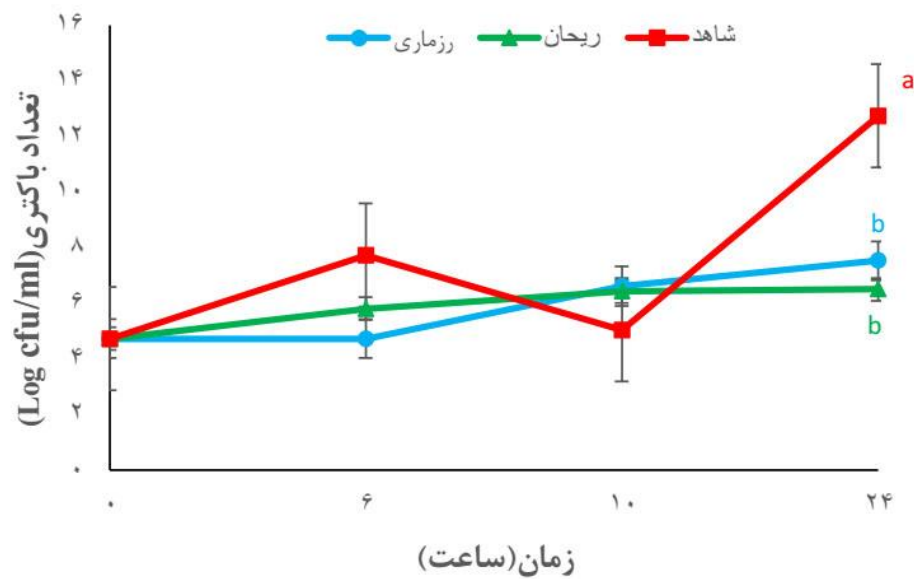
abcd: حروف نامشابه، نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ($p < 0.05$).

*: اسانس رقیق شده به نسبت مساوی با دی متیل سولفوکساید.

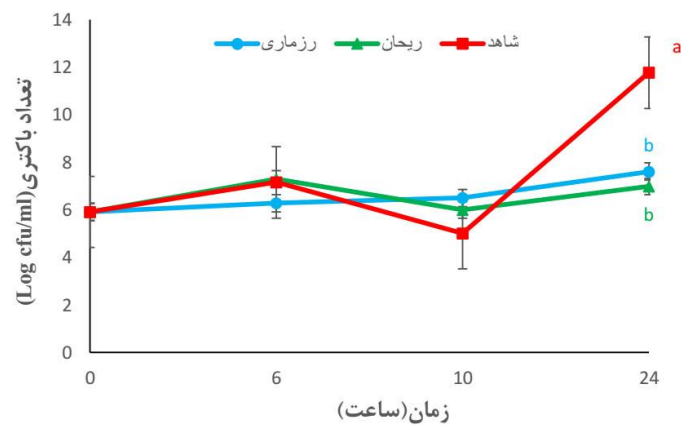
– اثر اسانس گیاهان رزماری و ریحان بر نمودار رشد باکتری‌های مورد مطالعه:

در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ اثرات اسانس گیاهان رزماری و ریحان بر تعداد کلی باکتری‌های اشریشیاکولای، استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس آگلالتیه، طی زمان‌های صفر، ۶، ۱۰ و ۲۴ ساعت ارائه شده‌است. مشاهده می‌شود که در ساعات ۶ و ۱۰ بین تیمار شاهد و اسانس‌ها تفاوت

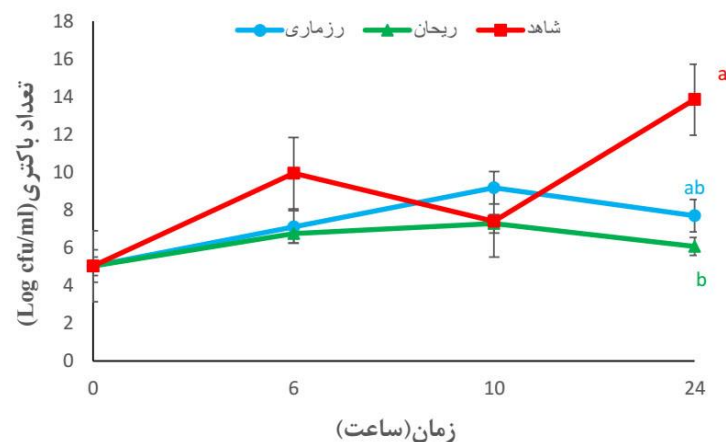
آماري معنی‌داری وجود نداشته‌است. اما در ساعت ۲۴ آزمایش، اسانس گیاهان رزماری و ریحان تعداد باکتری‌های اشریشیاکولای و استافیلوکوکوس اورئوس و فقط اسانس گیاه ریحان تعداد باکتری استرپتوکوکوس آگلالتیه را به‌صورت معنی‌داری کاهش دادند ($p < 0.05$).



نمودار ۱- نشان‌دهنده اثر غلظت‌های صفر (شاهد: ■) و Sub-MIC اسانس گیاهان ریحان (▲) و رزماری (●) بر منحنی رشد باکتری/شریشیاکولای می‌باشد. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در زمان مورد نظر دوره آزمایش می‌باشد ($p < 0.05$).



نمودار ۲- نشان‌دهنده اثر غلظت‌های صفر (شاهد: ■) و Sub-MIC اسانس گیاهان ریحان (▲) و رزماری (●) بر منحنی رشد باکتری/استافیلوکوکوس آرنئوس می‌باشد. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در زمان مورد نظر دوره آزمایش می‌باشد ($p < 0.05$).



نمودار ۳- نشان‌دهنده اثر غلظت‌های صفر (شاهد: ■) و Sub-MIC اسانس ریحان (▲) و رزماری (●) بر منحنی رشد باکتری استرپتوکوکوس آگلالتیه می‌باشد. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در زمان مورد نظر دوره آزمایش می‌باشد ($p < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر ۱۱ ترکیب در اسانس گیاه رزماری شناسایی شد که کارن با ۴۵/۱۱ درصد، اکالیپتول با ۲۰/۶۲ درصد و لووربنون با ۵/۹۱ درصد عمده‌ترین ترکیبات موجود بودند. در این ارتباط در طی مطالعه‌ای در اسپانیا، ترکیبات عمده اسانس رزماری، کامفور (۲۱/۹ درصد)، آلفا-پینن (۱۴/۸ درصد)، اکالیپتول (۱۱/۶ درصد) (Melero-Bravo et al., 2022) و در مطالعه دیگری مربوط به نواحی مختلف مراکش، کامفور (۵۳/۸-۴۱/۷ درصد)، اکالیپتول (۱۳/۵-۱/۲ درصد) و آلفا-ترپینن (۵/۱ درصد) اعلام شده‌است (Diass et al., 2021). همچنین در پژوهشی در این خصوص در ایتالیا، بیشترین ترکیبات اسانس گیاه مذکور شامل آلفا-پینن (۱۱/۷۵-۲/۴ درصد) و اکالیپتول (۱۵/۶-۳/۵ درصد) گزارش شده‌است (Serralutzu et al., 2020). در یک گزارش از ایران نیز فراوان‌ترین ترکیبات اسانس رزماری، پیریتون (۲۳/۷ درصد)، لینانول (۱۴/۹

درصد) و آلفا-پینن (۱۴/۹ درصد) (Gachkar et al., 2007) و در مطالعه دیگری از ایران بیشترین ترکیبات موجود در اسانس رزماری، اکالیپتول (۲۶/۸۹-۵/۶۳ درصد)، کامفور (۲۴/۸۲-۱/۶۶ درصد) و آلفا-پینن (۶۹/۸۱-۱۴/۲۰ درصد) اعلام شده‌است (Bajalan et al., 2017). ملاحظه می‌شود که در پژوهش حاضر (جدول ۱) و نیز مطالعات فوق، اکالیپتول به عنوان یکی از ترکیبات اصلی گزارش شده ولی کامفور و آلفا-ترپینن که در اکثر مطالعات گزارش شده، در پژوهش حاضر دیده نشد.

همچنین در مطالعه حاضر مشخص گردید که استراگول با ۷۰/۴۲ درصد، کارن با ۱۷/۹۹ درصد و اکالیپتول (متیل‌کاویکول) با ۸/۶۱ درصد، عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس ریحان را تشکیل داده‌اند که این نتایج متفاوت با گزارش دیگری از ایران است که ترکیبات عمده را متیل‌کاویکول (۵۲/۴ درصد) و لینالول (۲۰/۱ درصد) در اسانس رقم‌های ارغوانی گیاه ریحان و متیل‌کاویکول (۴۰/۵ درصد)، گرانیال (۲۷/۶

درصد) و نرال (۱۸/۵ درصد) را در اسانس رقم‌های سبز گیاه مذکور اعلام کرده‌است (Sajjadi, 2006). همچنین در پژوهشی از اردن، ترکیبات عمده اسانس ریحان، لینالول (۵۲/۱ درصد) و لینالیل استات (۱۹/۱ درصد) (Rezzong et al., 2019) و در پژوهش دیگری از ارمنستان که در مورد اسانس سه رقم مختلف گیاه ریحان انجام گرفته، در یک رقم متیل‌کاوایکول (۵۷/۳ درصد)، در رقم دیگر لینالول (۶۸ درصد) و در رقمی دیگر نرول (۲۳ درصد) بیشترین ترکیب تشکیل دهنده بوده‌است (Avetisyan et al., 2017). در تحقیقی در کشور ایتالیا هم در اسانس ریحان‌های جمع‌آوری شده در ماه می و اکتبر بیشترین ترکیب به ترتیب لینالول (۴۸/۱ درصد) و اگنول (۷۶/۸ درصد) گزارش شده‌است (De Martino et al., 2021).

به احتمال زیاد اختلافات مشاهده شده در ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس‌ها در مطالعات مختلف، می‌تواند ناشی از شرایط آب و هوایی، جغرافیایی و نور آفتاب باشد (Bajalan et al., 2017). در تحقیق حاضر، MIC و MBC علیه باکتری‌های مورد مطالعه، به ترتیب در مورد اسانس رزماری ۰/۳۱۲-۰/۶۲۵ و ۰/۰۷۸-۰/۳۱۲ اسانس ریحان ۰/۰۳۹-۰/۳۱۲ و ۰/۰۷۸-۰/۶۲۵ درصد و در مورد محاسبه گردید (جدول ۳) و با توجه به این‌که برای طبقه‌بندی قدرت ضدباکتریایی عصاره‌های گیاهی از MIC (میکروگرم/ میلی لیتر) به‌دست‌آمده به روش ماکرودیلوشن یا میکرودیوشن استفاده می‌شود که به درجات بسیار موثر (کمتر از ۱۰۰ $\mu\text{g}/\text{m}$)، موثر (۱۰۰-۵۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$)، متوسط (۵۰۰-۱۰۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$)، کم

اثر (۱۰۰۰-۲۰۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$) و غیرموثر (بیشتر از ۲۰۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$) تقسیم می‌شوند (Sharifi-Rad et al., 2020)، لذا طبق این تقسیم‌بندی و با توجه به نتایج حاصله در این خصوص در تحقیق حاضر (جدول ۳) اسانس‌های مطالعه حاضر بر باکتری‌های تحقیق، بسیار موثر بوده‌اند.

در مورد حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) اسانس گیاهان رزماری و ریحان علیه باکتری‌ها در مطالعات مختلف مقادیر متفاوتی گزارش شده‌است. مثلاً در یک مطالعه مقدار MIC و MBC برای اسانس رزماری علیه باکتری *استافیلوکوکوس آئروس* مقاوم به چند دارو، ۱۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شده‌است (Esmael et al., 2020). اما در یک مطالعه دیگر مقادیر MIC و MBC اسانس رزماری علیه *استافیلوکوکوس آئروس* مقاوم به چند دارو به ترتیب ۰/۰۳ درصد و ۰/۱ درصد و علیه *شریشیاکولای* ۰/۳ درصد و ۰/۵ درصد بوده‌است (Jiang et al., 2011). همچنین مقدار MIC و MBC اسانس ریحان بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس آئروس* و *شریشیاکولای* در یک پژوهش، ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر اعلام شده‌است (Rezzong et al., 2019). در پژوهشی دیگر هم از ارمنستان، MIC اسانس دو واریته متفاوت از گیاه ریحان بر باکتری *استافیلوکوکوس آئروس* ۳/۱۲۵ و ۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و علیه باکتری *شریشیاکولای*، ۱۳ و ۲۶ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شده‌است (Avetisyan et al., 2017). همچنین در یک مطالعه دیگر هم در ایتالیا، مقدار MIC اسانس ریحان جمع‌آوری شده در ماه‌های می و اکتبر بر باکتری *شریشیاکولای*، ۶ میلی گرم بر میلی لیتر و علیه

۱۴-۵ میلی‌متر (Rathore et al., 2022)، ۲۶-۴۴ میلی‌متر (Jordan et al., 2013)، ۸/۳۳ میلی‌متر (Gachkar et al., 2007) و در مورد سویه‌های مقاوم به چند دارو باکتری /استافیلوکوکوس آرئوس، ۱۲/۵ میلی‌متر (Esmael et al., 2020)، ۲۲ میلی‌متر (Irahal et al., 2020) و در مورد باکتری /شریشیاکولای، ۱۹/۵ میلی‌متر (Irahal et al., 2020)، ۱۰-۱۸ میلی‌متر (Bajalan et al., 2017) و ۱۶/۶۷ میلی‌متر (Gachkar et al., 2007) گزارش شده‌است. به نظر می‌رسد که اختلافات مشاهده شده در خصوص قطر منطقه عدم رشد باکتری‌ها در مطالعات مختلفی که بر اساس روش انتشار دیسک در آگار انجام شده، می‌تواند به علت سویه‌های مختلف باکتری‌های آزمایش شده، اختلاف در مقدار و غلظت اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های موجود در هر دیسک و همچنین اختلاف در ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس‌ها باشد (Burt, 2004). البته در مورد این‌که کدام ترکیب یا ترکیبات عامل اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی هستند، نظرات مختلفی بیان شده، به‌طوری‌که در بعضی مطالعات گزارش گردیده که فقط ترکیبات اصلی عامل اثرات ضدباکتریایی اسانس‌ها نبوده و تمام ترکیبات در اعمال این اثرات نقش دارند و برای اثرات ضدباکتریایی وجود ترکیبات با مقدار کم هم ضروری بوده و اثر سینرژیست دارند و اثر کل اسانس بیشتر از اثر انفرادی ترکیبات اصلی می‌باشد (Bouyahya et al., 2017; Moosavi-Nasab et al., 2016).

نکته قابل توجه دیگر در مطالعه حاضر، مشاهده اثر ضد باکتریایی قوی‌تر از اسانس‌های تحقیق بر باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس آرئوس و

باکتری /استافیلوکوکوس آرئوس، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده‌است (De Martino et al., 2021).

به نظر می‌رسد که مقادیر متفاوت گزارش شده برای MIC MIC و MBC اسانس گیاهان ریحان و رزماری در مطالعات مختلف می‌تواند به علت سویه‌های مختلف باکتریایی و ترکیبات مختلف موجود در اسانس‌ها باشد (Burt, 2004).

از طرف دیگر در مطالعه حاضر، نتایج حاصله از آزمون آنتی‌بیوگرام (جدول ۴) که به روش انتشار دیسک در آگار انجام گرفته، مشخص کرد که اثرات ممانعت از رشد هر دو اسانس تحقیق بر سویه استاندارد باکتری‌های /استافیلوکوکوس آرئوس و /ستریپتوکوکوس آگلاکتیه، تفاوت آماری معنی‌داری با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نداشت ولی اثر مذکور بر سویه استاندارد باکتری /شریشیاکولای بطور معنی‌داری کمتر از جنتامایسین بود ($p=0/002$). از طرف دیگر مشاهده گردید که اثرات ممانعت از رشد اسانس‌های رقیق نشده، به مراتب قوی‌تر از اثرات اسانس‌های رقیق شده (۱:۱) (البته به غیر از اثر اسانس رزماری بر باکتری /شریشیاکولای) بود (جدول ۴). در این ارتباط، در طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵، قطر منطقه عدم رشد باکتری /استافیلوکوکوس آرئوس در قبال اسانس ریحان ۹ میلی‌متر و برای باکتری /شریشیاکولای ۱۱ میلی‌متر گزارش شده‌است (Al Abbasy et al., 2015). همچنین در مطالعات مختلف که به روش انتشار دیسک در آگار انجام شده، اعداد متفاوتی برای قطر منطقه عدم رشد باکتری‌ها در قبال اسانس رزماری ذکر شده، به‌طوری‌که در مورد /استافیلوکوکوس آرئوس

استرپتوکوکوس آگلالتیه) نسبت به باکتری گرم منفی /شریشیاکولای بود که البته با توجه به نتایج تحقیقات گذشته، مورد انتظار ما بود به‌طوری که علت اصلی آن ممانعت از نفوذ اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل سلول توسط غشای خارجی (پرده بیرونی) دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی اعلام شده و همچنین علاوه بر آن گزارش شده که آنزیم‌های ناحیه پری‌پلاسم باکتری‌های گرم منفی ممکن است ترکیبات شیمیائی با خاصیت ضدباکتریایی که در اسانس‌ها موجود هستند را غیرفعال کنند (Bouyahya et al., 2017).

اما در مورد اثرات اسانس‌های تحقیق حاضر بر منحنی رشد باکتری‌های آزمایش شده، مشاهده گردید که فقط در ساعت ۲۴، اسانس رزماری و ریحان تعداد کلی باکتری‌های /شریشیاکولای (نمودار ۱) و /استافیلوکوکوس آرنوس (نمودار ۲) و اسانس ریحان تعداد کلی /استرپتوکوکوس آگلالتیه (نمودار ۳) را به صورت معنی‌داری کاهش دادند ($p < 0.05$). در مطالعه جیانگ و همکاران در سال ۲۰۱۱، گزارش شده که غلظت MIC و $1/2 MIC$ اسانس رزماری ابتدا باعث کاهش جمعیت باکتری /استافیلوکوکوس آرنوس در ساعت هشتم دوره آزمایش شده ولی بعد از آن رشد باکتری تا ساعت ۳۰ افزایش یافته، درحالی‌که غلظت $2MIC(MBC)$ اسانس مذکور در ساعت هشتم، جمعیت باکتریایی را به صفر رساند (Jiang et al., 2011). در مطالعه دیگری اسانس رزماری در غلظت MIC و $1/2 MIC$ باعث کاهش اندک رشد در ۸-۴ ساعت اول تحقیق شده ولی بعد از آن تا ساعت ۳۰، جمعیت باکتری‌های /استافیلوکوکوس زو/پیدرمیکوس و

/شریشیاکولای افزایش یافته و تنها غلظت $2MIC$ اسانس فوق باعث نابودی هر دو باکتری در ساعت ۱۲ پژوهش شده‌است (Fu et al., 2007). به نظر می‌رسد که اختلافات گزارش شده در ساعت‌های مهار رشد باکتری‌ها می‌تواند به علت اختلاف در ترکیبات اسانس در مطالعات مختلف باشد. البته بایستی توجه کرد که اثرات ذکر شده در تحقیق حاضر، مربوط به مقادیر تحت حداقل غلظت مهاري رشد بوده و اگر غلظت مهاري و یا حتی غلظت‌های چند برابر مهاري استفاده می‌شد به احتمال زیاد اثرات ضدباکتریایی، خیلی قوی‌تر می‌بود.

براساس یافته‌های تحقیق حاضر مشخص گردید که به‌طور کلی اسانس رزماری و ریحان در مطالعه آزمایشگاهی (*in vitro*) حاضر، اثرات ضد باکتریایی قابل قبولی داشتند، به‌طوری‌که اثرات آن‌ها بر /استافیلوکوکوس آرنوس و /استرپتوکوکوس آگلالتیه تفاوت آماری معنی‌داری با اثر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نداشت ($p = 0.000$ ، جدول ۴). لذا پیشنهاد می‌گردد اثرات اسانس‌های فوق در درمان بیماری ورم پستان باکتریایی، بر روی دام‌های زنده (*in vivo*) مطالعه گردد.

سپاسگزاری

یافته‌های ارائه‌شده در تحقیق حاضر برگرفته از طرح پژوهشی مصوب دانشگاه گنبد کاووس با کد ۶/۱۸۳ می‌باشد که با حمایت معاونت محترم پژوهشی انجام شده‌است، لذا نویسندگان بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده‌است.

منابع

- Al Abbasy, D.W., Pathare, N., Al-Sabahi, J.N. and Khan, S.A. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.). Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 5(8): 645–649.
- Aleksh, M.O., Ismail, Z.B., Awawdeh, M.S. and Shatnawi, S. (2017). Effects of intramammary infusion of sage (*Salvia officinalis*) essential oil on milk somatic cell count, milk composition parameters and selected hematology and serum biochemical parameters in Awassi sheep with subclinical mastitis. Veterinary World, 10(8): 895–900.
- Ananda Baskaran, S., Kazmer, G. W., Hinckley, L., Andrew, S.M. and Venkitanarayanan, K. (2009). Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. Journal of Dairy Science, 92(4): 1423–1429.
- Avetisyan, A., Markosian, A., Petrosyan, M., Sahakyan, N., Babayan, A., Aloyan, S., et al. (2017). Chemical composition and some biological activities of the essential oils from basil *Ocimum* different cultivars. BMC Complementary and Alternative Medicine, 17(1): 1–8.
- Bajalan, I., Rouzbahani, R., Ghasemi, A. and Maggi, F. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. Industrial Crops and Products, 107(February): 305–311.
- Basti, A.A., Misaghi, A. and Khaschabi, D. (2007). Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, pH and temperature on *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. LWT - Food Science and Technology, 40(6): 973–981.
- Bouyahya, A., Et-Touys, A., Abrini, J., Talbaoui, A., Fellah, H., Bakri, Y., et al. (2017). *Lavandula stoechas* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 12(September): 179–184.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 119 (1): 223–253.
- CLSI. (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement (M100-S25). 9th ed., Wayne, pp:44-90.
- Contreras, G. A. and Rodríguez, J. M. (2011). Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 16(4): 339–356.
- Da Silva, W.M.F., Kringel, D.H., de Souza, E.J.D., da Rosa Zavareze, E. and Dias, A.R.G. (2022). Basil Essential Oil: Methods of Extraction, Chemical Composition, Biological Activities, and Food Applications. Food and Bioprocess Technology, 15(1): 1–27.
- De Martino, L., Amato, G., Caputo, L., Nazzaro, F., Scognamiglio, M.R. and De Feo, V. (2021). Variations in composition and bioactivity of *Ocimum basilicum* cv ‘Aroma 2’ essential oils. Industrial Crops and Products, 172: 114068.
- de Moraes Peixoto, R., de Moraes Peixoto Araújo, R., e Silva Peixoto, L.J., Gonçalves Bomfim, S.A., Guedes da Silva, T.M., Sarmiento Silva, T.M., et al. (2015). Treatment of goat mastitis experimentally induced by *Staphylococcus aureus* using a formulation containing *Hymenaea martiana* extract. Small Ruminant Research, 130(2015): 229–235.
- Diass, K., Brahmi, F., Mokhtari, O., Abdellaoui, S. and Hammouti, B. (2021). Biological and pharmaceutical properties of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. And *Lavandula officinalis* L. In Materials Today: Materials Today Proceedings, 45(2): 7768–7773.
- Esmael, A., Hassan, M.G., Amer, M.M., Abdelrahman, S., Hamed, A.M., Abd-raboh, H.A., et al. (2020).

- Antimicrobial activity of certain natural-based plant oils against the antibiotic-resistant acne bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1): 448–455.
- Fu, Y.J., Zu, Y.G., Chen, L.Y., Shi, X.G., Wang, Z., Sun, S., et al. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21(10): 989–994.
 - Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. and Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102(3): 898–904.
 - Hasanpour, A., Zakhireh, S. and Ebadi, A.R. (2014). Investigating the antibacterial effects of the non-polar extract of *Malva sylvestis* L. with methods of diffusion from wells and tube dilution. *Journal of Clinical Pathology*, 8(4): 645–651. [In Persian]
 - Irahah, N., Fouzia, H., Fatima, L., Ahmed, E., Santé, L., Esmaeil, G., et al. (2020). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against multidrug resistant bacteria. *European Journal of Integrative Medicine*, 35: 101074.
 - Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.J., et al. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(1): 63–68.
 - Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S. and Sotomayor, J.A. (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control*, 30(2): 463–468.
 - Melero-Bravo, E., Ortiz de Elguea-Culebras, G., Sánchez-Vioque, R., Fernández-Sestelo, M. and Herraiz-Peñalver, D. (2022). Variability of essential oil in cultivated populations of *Rosmarinus officinalis* L. in Spain. *Euphytica*, 218(6): 1–12.
 - Moosavi-Nasab, M., Saharkhiz, M.J., Ziaee, E., Moayedi, F., Koshani, R. and Azizi, R. (2016). Chemical compositions and antibacterial activities of five selected aromatic plants essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria. *Essential Oil Research*, 83(3): 607–613.
 - Oliveira, J. R. De, Esteves, S. and Oliveira, L. (2019). *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *Journal of Biomedical Science*, 29(5): 1–22.
 - Park, Y.K., Fox, L.K., Hancock, D.D., McMahan, W. and Park, Y.H. (2012). Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. *Journal of Veterinary Science*, 13(1): 103–105.
 - Rahimiyan, J., Shayegh, J. and Golzari, A. (2021). Therapeutic effect of marbofloxacin on *Escherichia coli*-induced mastitis in dairy cows. *Journal of Clinical Pathology*, 14(56): 381–388. [In Persian]
 - Rathore, S., Mukhia, S., Kapoor, S., Bhatt, V., Kumar, R. and Kumar, R. (2022). Seasonal variability in essential oil composition and biological activity of *Rosmarinus officinalis* L. accessions in the western Himalaya. *Scientific Reports*, 12(1): 1–13.
 - Rezzoug, M., Bakchiche, B., Gherib, A., Roberta, A., Guido, F., Kilincarslan, et al. (2019). Chemical composition and bioactivity of essential oils and ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut. from the Algerian Saharan Atlas. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1): 1–10.
 - Sajjadi, S.E. (2006). Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *Daru*, 14(3): 128–130. [In Persian]
 - Serrallutzu, F., Stangoni, A. Pietro, Amadou, B., Tijan, D., Re, G.A., et al. (2020). Essential oil composition and yield of a *Rosmarinus officinalis* L. natural population with an extended flowering season in a coastal Mediterranean environment and perspectives for exploitations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67(7): 1777–1793.
 - Sharifi-Rad, J., Ezzat, S.M., El Bishbishy, M.H., Mnayer, D., Sharopov, F., Kılıç, C.S., et al. (2020). *Rosmarinus* plants: Key farm concepts towards food applications. *Phytotherapy Research*, 34(7): 1474–1518.
 - Zhu, H., Du, M., Fox, L. and Zhu, M.J. (2016). Bactericidal effects of Cinnamon cassia oil against bovine mastitis bacterial pathogens. *Food Control*, 66 (2016): 291–299.