Veterinary Clinical Pathology, Vol.19, No.74, Summer 2025

"Research article" DOI: 10.71499/jvcp.2025.3111443

Comparison of antibacterial effects of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and basil (*Ocimum basilicum*) and some antibiotics on standard bacterial isolates of bovine mastitis

Rahchamani, R.[1]*, Zarooni, S.[2], Ghanbari, F.[3]

1- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran.
2- M.Sc. Graduate, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran.
3- Associated Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran.
*Corresponding author's email: Rahchamani@gonbad.ac.ir
(Received: 2024/11/10 Accepted: 2025/3/16)

Extended Abstract

Background and Objective: Mastitis is one of the most prevalent and costly diseases affecting dairy cattle worldwide, primarily caused by bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli*. The conventional treatment for this disease involves the use of intramammary antibiotics; however, the widespread use of these drugs has led to adverse consequences, including the induction of antibiotic resistance in bacterial populations and the persistence of drug residues in milk and other dairy products. These issues have raised serious concerns in the fields of public health and organic production. In response to this challenge, identifying safe, natural alternatives with effective antimicrobial properties has become an unavoidable necessity. Among these, essential oils derived from medicinal plants have emerged as attractive candidates for replacing antibiotics, owing to their broad-spectrum antibacterial activity, low toxicity, and lack of induction of long-term resistance. Rosmarinus officinalis (rosemary) and Ocimum basilicum (basil) have received particular attention due to their abundant bioactive compounds and well-documented antibacterial properties. Nevertheless, comprehensive studies comparing the antibacterial effects of these two essential oils against standard strains of the primary bovine mastitis pathogens, particularly Streptococcus agalactiae, have not yet been conducted. Therefore, the objective of this study was to evaluate and compare the antibacterial effects of rosemary and basil essential oils against standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli*, as well as to compare their efficacy with the commonly used antibiotics gentamicin and amoxicillin/clavulanate.

Materials and Methods: This experimental study was conducted in 2020 at Gonbad Kavous University. Initially, rosemary and basil essential oils were procured from Darian Golab Company (Kashan, Iran). Following sterile filtration, their chemical constituents were identified

using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). Standard bacterial strains, *Staphylococcus aureus* (PTCC 1113), *Streptococcus agalactiae* (PTCC 1768), and *Escherichia coli* (PTCC 1399), were obtained from the Iranian Research Organization for Science and Technology and cultured under standard conditions. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the essential oils were determined using the broth macrodilution method. Additionally, the antibacterial activity of both essential oils and antibiotics was assessed using the agar disk diffusion method (Kirby-Bauer). The effect of the essential oils on bacterial growth curves at sub-inhibitory concentrations (Sub-MIC) was evaluated at 0, 6, 10, and 24 hours post-inoculation by colony counting (CFU/mL). Statistical analysis was performed using SPSS software (version 22), employing one-way ANOVA and Tukey's post hoc test at a significance level of $p<0.05$.

Findings: GC/MS analysis revealed that the major constituents of rosemary essential oil were carvene (45.11%), eucalyptol (20.62%), and levoverbenone (5.91%), while those of basil essential oil were estragole (70.42%), carvene (17.99%), and eucalyptol (8.61%). The MIC and MBC values for rosemary essential oil against the tested bacteria ranged from 0.078% to 0.312% and from 0.312% to 0.625%, respectively. For basil essential oil, these values ranged from 0.039% to 0.312% (MIC) and from 0.078% to 0.625% (MBC). In the disk diffusion assay, the antibacterial effects of both rosemary and basil essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* showed no significant difference compared to gentamicin ($p>0.05$). However, both essential oils exhibited significantly lower efficacy against *Escherichia coli* compared to gentamicin and amoxicillin/clavulanate ($p<0.05$). Growth curve analysis at 24 hours demonstrated that both rosemary and basil essential oils significantly reduced the counts of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, while only basil essential oil showed a significant inhibitory effect against *Streptococcus agalactiae* ($p<0.05$).

Conclusion: The findings of this study indicate that rosemary and basil essential oils possess considerable antibacterial activity against the primary causative agents of bovine mastitis. Notably, their performance against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*) was comparable to that of gentamicin. These results highlight the high potential of these essential oils as safe, natural alternatives for managing mastitis in organic dairy farms or as complementary agents in combination therapies. However, given the variability in production methods, cultivation conditions, and chemical composition of essential oils, it is recommended that future studies be conducted in vivo using appropriate formulations in mastitic animals to confirm the clinical efficacy and safety of these compounds.

Keywords: mastitis, antibacterial activity, essential oil, rosemary, basil.

Conflict of interest: None declared.

"مقاله پژوهشی"
DOI: 10.71499/jvcp.2025.3111443

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[1*]، سامان ضرونی[2]، فرزاد قنبری[3]

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.
۳- دانشیار 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 مبسوط

زمینه و هدف: ورم پستان یکی از شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری‌های گاوهای شیری در سطح جهانی محسوب می‌شود که عمدتاً توسط باکتری‌هایی همچون *استافیلوکوکوس آرئوس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *اشریشیاکولای* ایجاد می‌گردد. درمان رایج این بیماری، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های داخل‌پستانی است؛ با این حال، مصرف گسترده این داروها منجر به بروز پیامدهای نامطلوبی از جمله القای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جمعیت‌های باکتریایی و باقیماندن دارو در شیر و سایر محصولات لبنی شده است. این مسائل، نگرانی‌های جدی در حوزه سلامت عمومی و تولیدات ارگانیک ایجاد کرده‌اند. در پاسخ به این چالش، یافتن جایگزین‌های طبیعی و ایمن با اثر ضدمیکروبی مؤثر، ضرورتی اجتناب‌ناپذیر محسوب می‌شود. در این میان، اسانس‌های گیاهان دارویی به‌دلیل طیف گسترده فعالیت ضدباکتریایی، سمیت پایین و عدم القای مقاومت طولانی‌مدت، به‌عنوان گزینه‌های جذابی برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شده‌اند. گیاهان رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) به‌دلیل ترکیبات فعال زیستی فراوان و خواص ضدباکتریایی شناخته‌شده، مورد توجه قرار گرفته‌اند. با این وجود، مطالعات جامعی در خصوص اثرات مقایسه‌ای این دو اسانس علیه سویه‌های استاندارد عوامل اصلی ورم پستان گاو، به‌ویژه *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، انجام نشده است. از این رو، هدف از این مطالعه، ارزیابی و مقایسه اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های رزماری و ریحان در برابر سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس آرئوس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *اشریشیاکولای* و همچنین مقایسه آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های رایج جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۹ در دانشگاه گنبد کاووس انجام شد. ابتدا اسانس‌های رزماری و ریحان از شرکت درین گلاب کاشان تهیه و پس از فیلتراسیون استریل، ترکیبات شیمیایی آن‌ها با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) شناسایی گردید. سویه‌های استاندارد باکتریایی *استافیلوکوکوس آرئوس* (PTCC 1113)، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* (PTCC 1768) و *اشریشیاکولای* (PTCC 1399) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران دریافت و تحت شرایط استاندارد کشت داده شدند. حداقل

غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس‌ها با روش رقیق‌سازی لوله‌ای تعیین شد. همچنین، فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها با روش انتشار دیسک در آگار (کربی-بائر) مورد ارزیابی قرار گرفت. تأثیر اسانس‌ها بر منحنی رشد باکتری‌ها در غلظت زیر مهاری (Sub-MIC) در ساعات صفر، ٦، ١٠ و ٢٤ پس از تلقیح با شمارش کلنی‌ها (CFU/mL) بررسی گردید. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ٢٢، آزمون‌های One-way ANOVA و Tukey در سطح معنی‌داری $p<٠/٠٥$ انجام شد.

یافته‌ها: آنالیز GC/MS نشان داد که مهم‌ترین ترکیبات اسانس رزماری شامل کارن (٤٥/١١٪)، اکالیپتول (٢٠/٦٢٪) و لووربنون (٥/٩١٪) و در اسانس ریحان شامل استراگول (٧٠/٤٢٪)، کارن (١٧/٩٩٪) و اکالیپتول (٨/٦١٪) بودند. مقادیر MIC و MBC اسانس رزماری در برابر باکتری‌های مورد مطالعه به‌ترتیب در محدوده ٠/٣١٢-٠/٠٧٨٪ و ٠/٦٢٥-٠/٣١٢٪ و برای اسانس ریحان در محدوده ٠/٣١٢-٠/٠٣٩٪ و ٠/٦٢٥-٠/٠٧٨٪ به‌دست آمد. در روش انتشار دیسک، اثر ضدباکتریایی اسانس‌های رزماری و ریحان علیه استافیلوکوکوس آرئوس و استرپتوکوکوس آگالاکتیه تفاوت معنی‌داری با جنتامایسین نداشت ($p>٠/٠٥$)، اما هر دو اسانس در برابر اشریشیاکولای اثر کمتری نسبت به جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات داشتند ($p<٠/٠٥$). بررسی منحنی رشد در ساعت ٢٤ نشان داد که اسانس‌های رزماری و ریحان به‌طور معنی‌داری تعداد اشریشیاکولای و استافیلوکوکوس آرئوس را کاهش دادند، و اسانس ریحان تنها در مورد استرپتوکوکوس آگالاکتیه اثر معنی‌داری از خود نشان داد ($p<٠/٠٥$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس‌های رزماری و ریحان دارای فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی علیه عوامل اصلی ورم پستان گاو هستند، به‌طوری‌که در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت (*استافیلوکوکوس آرئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*) عملکردی مشابه جنتامایسین داشتند. این نتایج حاکی از پتانسیل بالای این اسانس‌ها به‌عنوان جایگزین‌های طبیعی و ایمن در مدیریت ورم پستان در دامداری‌های ارگانیک یا به‌عنوان مکمل در درمان‌های ترکیبی است. با این حال، با توجه به تفاوت در فرآیند تولید، شرایط کشت گیاهی و ترکیب شیمیایی اسانس‌ها، توصیه می‌شود مطالعات آینده به‌صورت *in vivo* و با فرمولاسیون‌های مناسب در دام‌های مبتلا به ورم پستان انجام شود تا کارایی بالینی و ایمنی این ترکیبات تأیید گردد.

واژگان کلیدی: ورم پستان، خاصیت ضدباکتریایی، اسانس، رزماری، ریحان.

مقدمه

بیماری‌های مختلفی توسط باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *اشریشیاکولای* 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 ورم‌پستان در دامداری‌ها تزریق داخل‌پستانی 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 داخل‌پستانی مهمترین درمان ورم‌پستان‌ها هستند ولی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به مقاوم شدن باکتری‌های معمول و همچنین نگرانی‌های بهداشت عمومی شده‌است. در سال‌های اخیر، ظهور سریع سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و کاهش اثرات نسل‌های جدید آنتی‌بیوتیک‌ها، منجر به تلاش‌های زیادی برای یافتن منابع جدید مواد ضدمیکروبی مثل اسانس‌های گیاهان شده‌است (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 نشده‌است، 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 شده‌است. 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 شده‌است (Al Abbasy *et al*., 2015) و در چندین مطالعه هم اثرات ضدباکتریایی آن نشان داده شده‌است (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 ۱و۸-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 این‌که طبق بررسی نویسندگان مقاله حاضر، درباره اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاهان ریحان و رزماری بر باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* پژوهش‌های بسیار کمی انجام شده است، لذا در تحقیق حاضر باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشریشیاکولای* نیز برای بررسی مورد نظر انتخاب

شدند تا با توجه به این که هر سه باکتری از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده ورم‌پستان گاو هستند، احتمالا 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 شده‌است.

- آنالیز شیمیایی اسانس‌ها:

ابتدا اسانس گیاهان رزماری و ریحان از شرکت درین گلاب کاشان تهیه شدند و برای اطمینان از عدم آلودگی اسانس‌ها به میکروارگانیسم‌های 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) (chromatography/mass spectrophotometry Gas) (Model 5977A, Agilent Technologies, USA) با ستون موئینهDB 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 ٤ درجه سلسیوس در دقیقه تنظیم شد و دمای محفظه تزریق ۲٦۰ 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 آرئوس* (*Staphylococcus aureus*; PTCC:1113) و *اشریشیاکولای* (*Escherichia coli*; PTCC:1399) از طریق سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران- ایران) تهیه شد و پس از انتقال استاندارد به آزمایشگاه میکروب‌شناسی، هر سه باکتری دوبار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه (BD115, Binder, Germany) به مدت ٢٤ 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 گلیسیرین 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 ٢٤ ساعت و تهیه جمعیت میکروبی جوان، نهایتا کشت چندخطی منطقه‌ای در محیط کشت شیبدار 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 ٤ 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 براث انتقال داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری (BD115, Binder, Germany) شد. در ادامه، عمل تجدید کشت از نتیجه کشت اول نیز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ٢٤ ساعت و عینا 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 براث 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 ٦۰۰ نانومتر، به ۰/۱ برسد. در ادامه و بعد از تهیه رقت‌های متوالی با استفاده از آب پپتونه ۰/۰۱ درصد استریل و انتقال جداگانه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی محیط کشت تریپتیک سوی آگار و گرمخانه گذاری آن‌ها به‌مدت ٢٤ 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 *اشریشیاکولای* معادل cfu/ml $۳/٦ \times ۱۰^{٦}$، *استافیلوکوکوس آرئوس* معادل cfu/ml $۱/۲ \times ۱۰^{۸}$ و برای *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* معادل cfu/ml $٤/۱ \times ۱۰^{۷}$ محاسبه‌شد. لازم به ذکر است که با مشخص شدن مقادیر مذکور، در طی تحقیق حاضر زمانی که سوسپانسیون باکتریایی هر یک از باکتری‌های تحقیق برمبنای جذب نوری ۰/۱ تهیه می‌شد، تعداد باکتری در هر یک از آن‌ها معادل اعداد محاسبه‌شده 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) استفاده‌شد که برای انجام آن ماده دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) هم به عنوان امولسیفایر بکار گرفته‌شد. بدین منظور بعد ازتهیه محیط کشت تریپتیک سوی‌براث حاوی ۵ درصد دی متیل سولفوکساید، ابتدا غلظت‌های کاهشی از اسانس‌های رزماری و ریحان در ۱۰ لوله آزمایش شامل مقادیر ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/٦۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵٦، ۰/۰۷۸، ۰/۰۳۹ و ۰/۰۱۹ درصد در محیط کشت مذکور تهیه شد. سپس به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۲۵۰ سوسپانسیون میکروبی(با غلظت نهایی مشخص شده با طول موج ٦۰۰ نانومتر و جذب ۰/۱ برای هر یک از باکتری‌های تحقیق) تلقیح شد و بعد از آن همه لوله‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای۳۷ 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 هرکدام از اسانس‌ها آخرین رقتی که در آن هیچ گونه کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد باکتری مورد تحقیق) به‌عنوان 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 ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ٣٧ درجه سلسیوس، بالاترین رقتی از هر اسانس که قادر به مرگ ٩٩ درصد از هر یک باکتری‌های زنده اولیه مورد تحقیق بود، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی هر اسانس ثبت می‌گردید (CLSI, 2015).

- بررسی خاصیت ضدباکتریائی 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 هریک از باکتری‌های مورد تحقیق (با غلظت نهایی مشخص‌شده با طول موج ٦٠٠ نانومتر و جذب ٠/١ برای هر باکتری)، در سطح محیط کشت تریپتیک سوی آگار، کشت بصورت پخش‌کردن (کشت چمنی) انجام شد. در ادامه مقدار ٢٠ میکرولیتر از محلول رقیق نشده هر اسانس و رقیق‌شده با نسبت ١:١ با DMSO از هر اسانس، جداگانه بر روی دیسک‌های کاغذی استریل بلانک ساخت شرکت پادتن طب (تهران-ایران) ریخته‌شد که بعد از مدت ٢٠ تا ٤٠ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای حدود ٤٠ 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 ٢٠/١٠ میکروگرم/دیسک، با شماره ٢٠١٠٣ و جنتامایسین با غلظت١٠ میکروگرم/دیسک، با شماره ٢٠٣٠٩ (پادتن طب- تهران-ایران) تهیه و به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. بعد از گرمخانه‌گذاری همه محیط کشت‌های حاوی باکتری‌های تحقیق به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سلسیوس، قطر منطقه عدم رشد مربوط به هریک 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-minimum concentration inhibitory) (یک رقت کمتر از MIC) اسانس مورد نظر اضافه شد، سپس ١٠٠ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی هر یک از باکتری‌های تحقیق (با غلظت نهایی مشخص‌شده با طول موج٦٠٠ نانومتر و جذب٠/١) جداگانه به هر لوله آزمایش اضافه می‌شد. بعد از گرمخانه‌گذاری لوله‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سلسیوس در ساعت‌های

صفر، ٦، ۱۰ و ٢٤، رقت‌های متوالی تهیه و با شمارش تعداد پرگنه‌های حاصله، تعداد کل باکتری‌ها محاسبه و نمودار رشد هر باکتری بصورت جداگانه و بر اساس $\log_{10}^{cfu/ml}$ 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 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 شیمیائی اسانس رزماری نشان داد که از بین ترکیبات شناسایی‌شده، کارن با ٤٥/١١ درصد، اکالیپتول با ٢٠/٦٢ درصد و لووربنون با ٥/٩١ درصد، عمده‌ترین ترکیبات موجود در آن را تشکیل داده‌اند (جدول ۱).

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس رزماری

ردیف	نام ترکیب موجود	زمان بازداری (دقیقه)	درصد ترکیب
۱	3-Caren	٤/١١	٤٥/١١
۲	Camphen	٤/٤١	٤/٣٤
۳	Cymene	٥/٨٩	٣/١٥
٤	D-Limonen	٦/٠٠	٣/٩٤
٥	Eucalyptol	٦/٠٨	٢٠/٦٢
٦	Linalool	٧/٦٣	٢/٢٩
٧	(+)-2-Bornanone	٨/٨٧	٥/٠١
٨	Endo-borneol	٩/٥٢	٥/٢
٩	L-alpha-terpineol	١٠/١١	٢/٢٢
١٠	Levoverbenone	١٠/٤٢	٥/٩١
١١	Thymol	١٢/٨٠	٢/٢١

- اجزای شیمیایی اسانس ریحان: با توجه به نتایج آنالیز شیمیائی، عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس ریحان هم شامل استراگول با ٧٠/٤٢ درصد، کارن با ١٧/٩٩ درصد و اکالیپتول با ٨/٦١ درصد بودند (جدول ۲).

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی اسانس ریحان

ردیف	نام ترکیب موجود	زمان بازداری (دقیقه)	درصد ترکیب
۱	3-Caren	٤/١٠	١٧/٩٩
۲	O-Cymene	٥/٨٩	٠/٩٧
۳	D-Limonen	٦/٠٠	١/٢٩
٤	Eucalyptol	٦/٠٧	٨/٦١
٥	Linalool	٧/٦٤	٠/٧١
٦	Estragole	١٠/٢٤٦	٧٠/٤٢

- 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 ۰/۳۱۲–۰/۰۷۸ و ۰/۶۲۵–۰/۳۱۲ 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* بوده‌است.

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	*استافیلوکوکوس آرئوس*	۰/۳۱۲	۰/۶۲۵
	اشریشیاکولای	۰/۳۱۲	۰/۶۲۵
	استرپتوکوکوس آگالاکتیه	۰/۰۷۸	۰/۳۱۲
اسانس گیاه ریحان	*استافیلوکوکوس آرئوس*	۰/۱۵۶	۰/۳۱۲
	اشریشاکولای	۰/۰۳۹	۰/۰۷۸
	استرپتوکوکوس آگالاکتیه	۰/۳۱۲	۰/۶۲۵

- نتایج آزمون انتشار دیسک در آگار: اثر اسانس‌های رزماری، ریحان و دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاوولانات علیه باکتری‌های مورد آزمایش در جدول ٤ 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 آموکسی سیلین/کلاولونات بود ($p<۰/۰۵$). اثر هر دو اسانس بر *استافیلوکوکوس آرئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* به طور معنی‌داری کمتر از آموکسی‌سیلین/کلاولونات ($p<۰/۰۵$) و بدون تفاوت معنی‌دار با جنتامایسین بود ($p>۰/۰۵$). ولی اثر ضد باکتریایی بر *اشریشیاکولای* بطور معنی‌داری کمتر از جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات بود ($p<۰/۰۵$). اثر اسانس رقیق شده رزماری بر هر سه باکتری تفاوت معنی‌داری با جنتامایسین نداشت ($p>۰/۰۵$) ولی اثر اسانس رقیق شده ریحان بر هر سه باکتری کمتر از جنتامایسین بود ($p<۰/۰۵$).

جدول ٤- اثر اسانس‌ها و آنتی بیوتیک‌ها بر قطر منطقه عدم رشد باکتری‌های تحقیق برحسب میلی‌متر (میانگین± انحراف معیار)

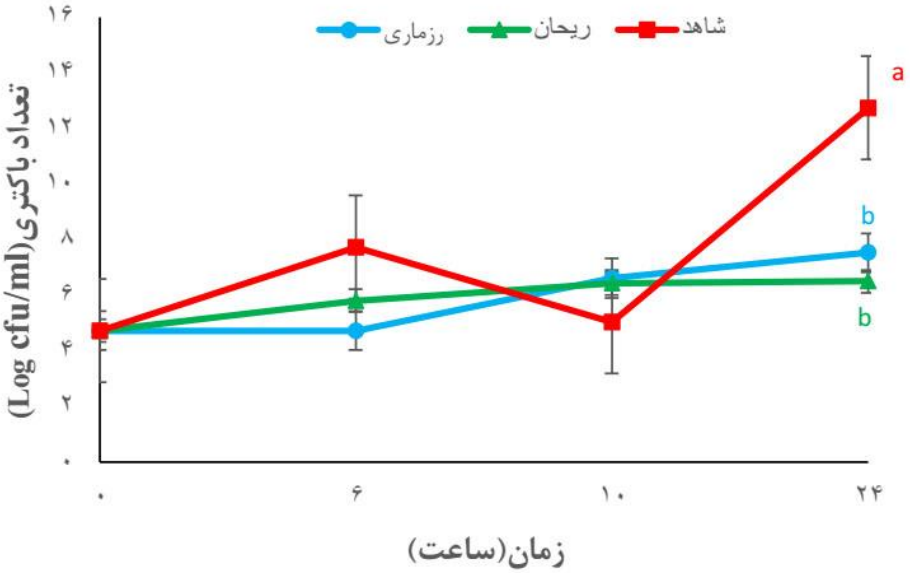
ترکیب آزمایش شده	قطر منطقه عدم رشد هر یک از باکتری‌های مورد آزمایش(میلی‌متر)		
	اشریشیاکولای	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*استرپتوکوکوس آگالاکتیه*
اسانس خالص رزماری	۱۲/۰±۹۷/۳۷^{d}	۱۸/۱±۳٦/۹۰^{b}	۱۷/۰±۸۰/٤۹^{c}
***اسانس رقیق شده رزماری(۱:۱)**	۱۹/۱±۱۰/۵۵^{bc}	۱٦/۱±۱۱/۸۲^{bd}	۱٦/۱±۰۸/۸۹^{dc}
اسانس خالص ریحان	۱۳/۰±۳۱/۳۷^{d}	۱۵/۰±۹۵/٦۹^{bd}	۱۵/۱±۹۵/٤۰^{dc}
***اسانس رقیق شده ریحان (۱:۱)**	۱۱/۰±٦۸/٤٤^{d}	۱۱/۰±۲۹/۲۰^{dc}	۱۳/۰±۰٦/۵۳^{d}
جنتامایسین	۱۷/۰±٦۰/۵۱^{c}	۱۸/۰±۱٦/٦۵^{b}	۱۹/۰±۷۵/۳٦^{bc}
آموکسی‌سیلین/کلاولونات	۲۲/۰±٦۰/۲٦^{a}	۲٤/۰±۰٦/۳۷^{a}	۲۵/۰±٤٤/۵۱^{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<۰/۰۵).

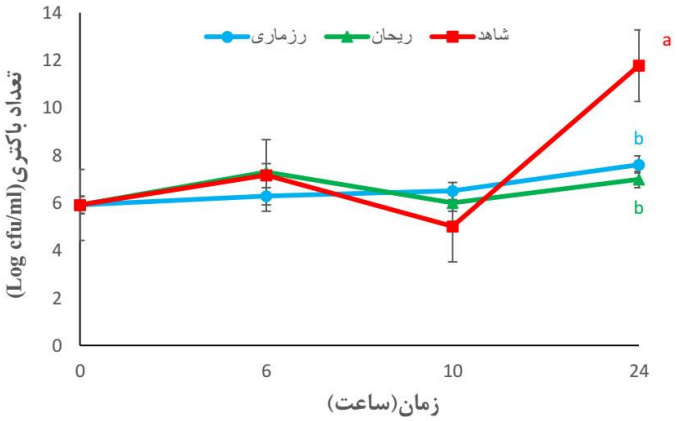
*: اسانس رقیق شده به نسبت مساوی با دی متیل سولفوکساید.

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

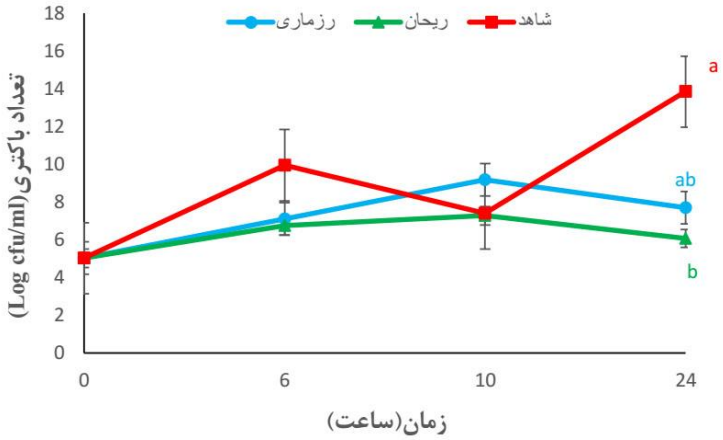
در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ اثرات اسانس گیاهان رزماری و ریحان بر تعداد کلی باکتری‌های *اشریشیاکولای*، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، طی زمان‌های صفر، ٦، ۱۰ و ۲٤ ساعت ارائه شده‌است. مشاهده می‌شود که در ساعات ٦ و ۱۰ بین تیمار شاهد و اسانس‌ها تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشته‌است. اما در ساعت ۲٤ آزمایش، اسانس گیاهان رزماری و ریحان تعداد باکتری‌های *اشریشیاکولای* و *استافیلوکوکوس آرئوس* و فقط اسانس گیاه ریحان تعداد باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* را به‌صورت معنی‌داری کاهش دادند (p<۰/۰۵).



نمودار ۱- نشان‌دهنده اثر غلظت‌های صفر (شاهد:■) و Sub-MIC اسانس گیاهان ریحان (▲) و رزماری (●) بر منحنی رشد باکتری *اشریشیاکولای* می‌باشد.
a,b,... حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در زمان مورد نظر دوره آزمایش می‌باشد($p<۰/۰۵$).



نمودار ۲- نشان‌دهنده اثر غلظت‌های صفر (شاهد: ■) و Sub-MIC اسانس گیاهان ریحان (▲) و رزماری (●) بر منحنی رشد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* می‌باشد.
a,b,... حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در زمان مورد نظر دوره آزمایش می‌باشد($p<۰/۰۵$).



نمودار ۳- نشان‌دهنده اثر غلظت‌های صفر (شاهد: ■) و Sub-MIC اسانس ریحان (▲) و رزماری (●) بر منحنی رشد باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* می‌باشد.
a,b,...: حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در زمان مورد نظر دوره آزمایش می‌باشد($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر ۱۱ ترکیب در اسانس گیاه رزماری شناسایی شد که کارن با ٤٥/١١ درصد، اکالیپتول با ٢٠/٦٢ درصد و لووربنون با ٥/٩١ درصد عمده‌ترین ترکیبات موجود بودند. در این ارتباط در طی مطالعه‌ای در اسپانیا، ترکیبات عمده اسانس رزماری، کامفور (٢١/٩ درصد)، آلفا-پینن (١٤/٨ درصد)، اکالیپتول (١١/٦ درصد) (Melero-Bravo *et al.*, 2022) و در مطالعه دیگری مربوط به نواحی مختلف مراکش، کامفور (٥٣/٨-٤١/٧ درصد)، اکالیپتول (١٣/٥-١/٢ درصد) و آلفا-ترپینن (٥/١ درصد) اعلام شده‌است (Diass *et al.*, 2021). همچنین در پژوهشی در این خصوص در ایتالیا، بیشترین ترکیبات اسانس گیاه مذکور شامل آلفا-پینن (٢/٤-١١/٧٥ درصد) و اکالیپتول (١٥/٦-٣/٥ درصد) گزارش شده‌است (Serralutzu *et al.*, 2020). در یک گزارش از ایران نیز فراوان‌ترین ترکیبات اسانس رزماری، پیپریتون (٢٣/٧ درصد)، لینانول (١٤/٩ درصد) و آلفا-پینن (١٤/٩ درصد) (Gachkar *et al.*, 2007) و در مطالعه دیگری از ایران بیشترین ترکیبات موجود در اسانس رزماری، اکالیپتول (٢٦/٨٩-٥/٦٣ درصد)، کامفور (٢٤/٨٢- ١/٦٦ درصد) و آلفا-پینن (٦٩/٨١-١٤/٢٠ درصد) اعلام شده‌است (Bajalan *et al.*, 2017). ملاحظه می‌شود که در پژوهش حاضر (جدول۱) 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 ٧٠/٤٢ درصد، کارن با ١٧/٩٩ درصد و اکالیپتول (متیل‌کاویکول) با ٨/٦١ درصد، عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس ریحان را تشکیل داده‌اند که این نتایج متفاوت با گزارش دیگری از ایران است که ترکیبات عمده را متیل کاویکول (٥٢/٤ درصد) و لینالول (٢٠/١ درصد) در اسانس رقم‌های ارغوانی گیاه ریحان و متیل کاویکول (٤٠/٥ درصد)، گرانیال (٢٧/٦

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 متیل‌کاویکول (۵۷/۳ درصد)، در رقم دیگر لینالول (٦٨ 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 (٤٨/١ درصد) و اگنول (٧٦/٨ 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 ۰/۳۱۲–۰/۰۷۸ و ۰/۶۲۵–۰/۳۱۲ درصد و در مورد اسانس ریحان ۰/۳۱۲–۰/۰۳۹ و ۰/۶۲۵–۰/۰۷۸ درصد 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 میکرودایلوشن استفاده می‌شود که به درجات بسیار موثر (کمتر از ۱۰۰ µg/m)، موثر (۱۰۰–۵۰۰ µg/ml)، متوسط (۵۰۰–۱۰۰۰ µg/ml)، کم اثر (۱۰۰۰–۲۰۰۰ µg/ml) و غیرموثر (بیشتر از ۲۰۰۰µg/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. مثلا در یک مطالعه مقدار MIC وMBC برای اسانس رزماری علیه باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* مقاوم به چند دارو، ١٥٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیترگزارش شده‌است (Esmael *et al*., 2020). اما در یک مطالعه دیگر مقادیر MIC و MBC اسانس رزماری علیه *استافیلوکوکوس آرئوس* مقاوم به چند دارو به ترتیب ۰/۰۳ درصد و ۰/۱ درصد و علیه *اشریشیاکولای* ۰/۳ درصد و ۰/۵ درصد بوده‌است (Jiang *et al*., 2011). همچنین مقدار MIC و MBC اسانس ریحان بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشریشیاکولای* در یک پژوهش، ۱۲۸میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اعلام شده‌است (Rezzong *et al*., 2019). در پژوهشی دیگر هم از ارمنستان، MIC اسانس دو واریته متفاوت از گیاه ریحان بر باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* ۳/۱۲۵ و ٦/٢٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و علیه باکتری *اشریشیاکولای*، ۱۳ و ٢٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده‌است (Avetisyan *et al*., 2017). همچنین در یک مطالعه دیگر هم در ایتالیا، مقدارMIC اسانس ریحان جمع آوری شده در ماه‌های می و اکتبر بر باکتری *اشریشیاکولای*، ٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و علیه

باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس*، ٤و٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده‌است (De Martino *et al*., 2021).

به‌نظر می‌رسد که مقادیر متفاوت گزارش شده برای 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).

ازطرف‌دیگر در مطالعه حاضر، نتایج حاصله از آزمون آنتی‌بیوگرام (جدول ٤) 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 *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، تفاوت آماری معنی‌داری با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نداشت ولی اثر مذکور بر سویه استاندارد باکتری *اشریشیاکولای* بطور معنی‌داری کمتر از جنتامایسین بود (p=۰/۰۰۲). 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 *اشریشیاکولای*) بود (جدول ٤). 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 *اشریشیاکولای* 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، به‌طوری که در مورد *استافیلوکوکوس* آرئوس ۵-۱٤ میلی‌متر (Rathore *et al*., 2022)، ٤٤-۲٦ میلی متر (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 *اشریشیاکولای*، ۱۹/۵ میلی‌متر (Irahal *et al*., 2020)، ۱۰-۱۸ میلی‌متر (Bajalan *et al*., 2017) و ۱٦/٦۷ میلی‌متر (Gachkar *et al*., 2007) گزارش شده‌است. به‌نظر 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 آزمایش‌شده، 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

استرپتوکوکوس آگالاکتیه) نسبت به باکتری گرم منفی *اشریشیاکولای* 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 ٢٤، اسانس رزماری و ریحان تعداد کلی باکتری‌های *اشریشیاکولای* (نمودار ١) و *استافیلوکوکوس آرئوس* (نمودار ٢) و اسانس ریحان تعداد کلی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* (نمودار ٣) را به‌صورت معنی‌داری کاهش دادند ($p<$٠/٠٥). در مطالعه جیانگ و همکاران در سال ٢٠١١، گزارش شده که غلظت MIC ½ و MIC اسانس رزماری ابتدا باعث کاهش جمعیت باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* در ساعت هشتم دوره آزمایش شده ولی بعد از آن رشد باکتری تا ساعت ٣٠ 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 ½ وMIC باعث کاهش اندک رشد در ٨-٤ ساعت اول تحقیق شده ولی بعد از آن تا ساعت ٣٠، جمعیت باکتری‌های *استافیلوکوکوس زوایپدرمیکوس* و *اشریشیاکولای* افزایش یافته و تنها غلظت 2MIC اسانس فوق باعث نابودی هر دو باکتری در ساعت ١٢ پژوهش شده‌است (Fu *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد که اختلافات گزارش‌شده 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 مهاری رشد بوده و اگر غلظت مهاری و یا حتی غلظت‌های چند برابر مهاری استفاده می‌شد به احتمال زیاد اثرات ضدباکتریایی، خیلی قوی‌تر می‌بود.

براساس یافته‌های تحقیق حاضرمشخص 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 آرئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* تفاوت آماری معنی‌داری با اثر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نداشت ($p=$٠/٠٠٠ ، جدول ٤). 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 ٦/١٨٣ 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.
- Alekish, 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 o ffi cinalis. 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., Sarmento 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]
- Irahal, 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]
- Serralutzu, 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.