

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷

وب سایت نشریه: <https://jab.alzahra.ac.ir>

doi:10.22051/JAB.2021.34309.1398

مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) بر باکتری های بیماری زای گیاهی (زانتوموناس کامپستریس و سودوموناس سیرینگه) و بیماری زای انسانی (استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی)

مسعود حیدری زاده*! مهدیه همتی!، مراحم آشنگرف^۲

چکیده

مقدمه: رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) گیاهی دارویی با ارزش است. این پژوهش با هدف مقایسه ترکیبات شیمیایی و اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی و اسانس برگ گیاه رزماری در برابر پاتوژن های گیاهی و انسانی انجام گرفت. روش ها: ترکیبات عصاره متانولی و اسانس برگ رزماری با GC-Mass شناسایی و اثرات ضد باکتری اسانس و عصاره با روش انتشار دیسک و همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس و عصاره ی رزماری اندازه گیری شد. برای ارزیابی آماری داده ها از آنالیز واریانس و آزمون دانکن استفاده شد. نتایج و بحث: نتایج نشان داد آلفا-پینن، ورنون، بورنیل استات، کامفور، کامفن، کاریوفیلین، ال- بورنیول، لیمونن، بتامیرسین، بتاپینن ترکیبات اصلی عصاره و آلفا-پینن، کامفور، بورنیل استات، اوکالیپتول، کامفن، کاریوفیلین، لیمونن، بتاپینن، ترکیبات اصلی اسانس برگ رزماری هستند. عصاره رزماری بیشترین و کمترین اثر مهارکنندگی را به ترتیب در برابر اشرشیاکلی و زانتوموناس کامپستریس نشان داد. در مورد استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس سیرینگه و زانتوموناس کامپستریس نتایج نشان دهنده توانایی

۱. استادیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران (* نویسنده مسئول: haidarizadeh@uok.ac.ir)
۲. کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۳. دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجو مهدیه همتی با راهنمایی دکتر مسعود حیدری زاده و مشاوره دکتر مراحم آشنگرف اعضای هیئت علمی دانشگاه کردستان می باشد.

مهارکنندگی تقریباً یکسان اسانس در برابر این سه سویه بوده و توانایی مهارکنندگی عصاره در برابر پاتوژن های انسانی بطور معنی دار بیشتر از پاتوژن های گیاهی است. می توان از عصاره و اسانس گیاه رزماری به عنوان راهکاری برای کنترل عوامل بیماری زای گیاهی و انسانی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: آلفا پینن، اثرات ضد باکتریایی، مهارکنندگی، کافور

مقدمه

گیاهان دارویی به عنوان یک ظرفیت بسیار ارزشمند برای تولید بسیاری از داروها، آفت کش ها و نگهدارنده های طبیعی در فرآورده های غذایی، جایگزین مناسبی برای فرآورده های شیمیایی آسیب رسان و با عوارض جانبی متعدد هستند. گیاهان زیادی به دلیل ویژگی های ضد میکروبی آنها مورد استفاده قرار گرفته اند. رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) گیاهی دارویی از خانواده Lamiaceae است که به طور گسترده در سراسر جهان کشت می شود (شکل ۱). اخیراً استفاده از برخی گیاهان دارویی مانند رزماری و اسطوخودوس در فضای سبز شهری به عنوان گیاه زینتی متداول شده است (Saharkhiz et al. 2010). رزماری در تولید ترکیبات نگهدارنده مواد غذایی، مواد معطر و همچنین طعم دهنده مورد توجه و مورد استفاده است. اسانس و عصاره رزماری حاوی ترکیبات فعال بیولوژیکی منحصر به فردی است که این ترکیبات شیمیایی و متابولیت های ثانویه بسته به شرایط محیطی به طور قابل توجهی متفاوت هستند (Hamidpour et al. 2017).

تحقیقات متمرکز بر شناسایی و معرفی ترکیبات ضدباکتریایی طبیعی با منشا گیاهی و کاربردهای احتمالی آنها برای کنترل بیماری های باکتریایی در انسان و همچنین در گیاهان در حال افزایش است. بیماری های ناشی از باکتری های بیماری زای گیاهی تهدیدی برای امنیت غذایی جهانی هستند. *Xanthomonas* یک جنس بزرگ از باکتری های گرم منفی است که باعث ایجاد بیماری در چندین گیاه شده و موجب تلفات قابل توجهی در بهره وری و کیفیت برداشت می شوند (Bajpai et al. 2011). لکه برگ باکتریایی (BLS) ناشی از *Xanthomonas campestris pv* یکی از بیماری های مهم اقتصادی کاهو است. اولین نشانه های BLS عموماً در حاشیه برگ ظاهر و منجر به تشکیل بافت آبکی می شود که در نهایت به بافت نکروتیک تبدیل می شود. بنابراین علائم BLS بر ارزش بازاری، کاهش کیفیت و افزایش تلفات پس از برداشت کاهو تأثیر می گذارد. کنترل BLS کاهو بسیار دشوار است زیرا تعداد کمی آفت کش برای درمان آن ثبت شده است (Nicolas et al. 2018).

گونه پاتوژن گیاهی *Pseudomonas syringae* باعث ایجاد بیماری در صدها گونه از گیاهان تک‌لپه‌ای (گندم، ذرت)، گیاهان علفی و گیاهان چوبی در سراسر جهان می‌شود (Lamichhane et al. 2018). گره سیاه باکتری یک بیماری جو و گندم ناشی از سودوموناس سیرینگیه است که از طریق بذر آلوده منتقل می‌شود (Mori et al. 2019). معرفی و شناسایی ترکیبات طبیعی مهار کننده این باکتری یک هدف پژوهشی با ارزش است.

شکل ۱- تصاویری از گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*)
Figure 1. Pictures of Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*)



اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است. بیشتر سویه‌های اشریشیاکلی، بی‌آزار هستند اما برخی از سروتیپ‌ها مانند $Q_{157}:H_7$ موجب مسمومیت غذایی و اسهال می‌شوند (Malakar, 2014). استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که مهم‌ترین گونه در جنس (سرده) استافیلوکوک از نظر پزشکی محسوب می‌شود. استافیلوکوکوس اورئوس، گستره وسیعی از عفونت‌ها از عفونت‌های ساده پوستی (مانند جوش‌دانه، کورک، کفگیرک، گل‌مژه و آبسه) گرفته تا بیماری‌های تهدید کننده مانند پنومونی، مننژیت، استئومیلیت، اندوکاردیت را ایجاد می‌نماید. استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از پنج عامل شایع ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است. هر سال ۵۰۰ هزار نفر در بیمارستان‌های ایالات متحده آمریکا به عفونت‌های استافیلوکوک اورئوس مبتلا می‌شوند (Kluytmans et al. 1997). با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی که بتدریج در این میکروارگانیسم‌ها بوجود آمده است و همچنین به دلیل اهمیت و ضرورت شناسایی و معرفی منابع جدید طبیعی ضد باکتریایی در برابر این عوامل بیماری‌زا مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس گیاه رزماری انجام گرفت.

هدف از این پژوهش مقایسه اثرات ضد باکتریایی و همچنین مقایسه حساسیت و یا مقاومت پاتوژن های گیاهی (*زانتوموناس کامپستریس* و *سودوموناس سیرینگه*) و انسانی (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی*) به اسانس و عصاره برگ گیاه رزماری است. در این زمینه گزارشی مشاهده نگردید. مقایسه ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس و عصاره برگ گیاه رزماری نیز از اهداف این تحقیق است.

در این پژوهش از برگ های گیاه رزماری (*Rosmarinus Officinalis*) اسانس و عصاره متانولی تهیه شد و ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره و اسانس برگ گیاه رزماری با استفاده از روش GC-Mass آنالیز گردید. فعالیت ضد میکروبی عصاره و اسانس رزماری در برابر گونه های مختلف باکتریایی از طریق اندازه گیری هاله عدم رشد و به روش انتشار دیسک بر سطح آگار بررسی و برای انجام آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC (Minimum inhibitory concentration از محیط لوریا برتانی براث و غلظت های مختلف عصاره و اسانس برگ رزماری استفاده شد.

جدول ۱- ویژگیها و بیماریزایی سویه های باکتریایی مورد استفاده در آزمایش اثرات ضد میکروبی
Table 1- Characteristics and pathogenicity of bacterial strains used in antimicrobial testing

بیماریزایی	ویژگی	سویه باکتریایی
مسمومیت غذایی، کفگیرک، سندرم پوستی فلسی شونده استافیلوکوکی (Kluytmans et al.1997)	کوکسی گرم مثبت	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>
عفونت ادراری، اسهال خونی (Malakar,2014)	باسیل گرم منفی	<i>اشریشیا کلی</i>
گره سیاه باکتری، بلایت (لکه های درشت و نامنظم بافت مرده به رنگ سفید تا زرد روی برگ)باکتریایی گندم (Mori et al., 2019)	باکتری گرم منفی	<i>سودوموناس سیرینگه</i>
پوسیدگی سیاه در گیاهان رده براسیکا (Bajpai et al. 2011)	میله ای گرم منفی	<i>زانتوموناس کمپستریس</i>

مواد و روش ها

روش عصاره گیری از رزماری (*Rosmarinus Officinalis*)

برگ رزماری در فصل رویشی سال ۹۶ از محوطه دانشگاه کردستان، سنندج در موقعیت (E ۷۲'۹۹"، ۴۶° N & ۳۳'۲۷"، ۳۵°) با ارتفاع ۱۵۱۲ متر از سطح دریا جمع آوری شد. بعد از شستشوی کامل در سایه خشک و برگ های گیاه آسیاب شده و با نسبت ۱۰ گرم در ۱۰۰ سی سی متانول خالص (Merck) به روش سوکسله عصاره گیری شد. عصاره ها به کمک دستگاه تقطیر دوار (مدل Tecan sunrise) در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد تغلیظ شده، برای حذف کامل حلال، عصاره در یک ظرف شیشه ای و در زیر هود قرار داده شده تا حلال به طور کامل تبخیر شود. سپس از رسوب باقیمانده

غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، گرم بر لیتر) تهیه گردید. برای هر یک از آزمایش‌ها عصاره تازه تهیه شد (Haidarizadeh et al. 2020).

روش اسانس گیری از رزماری

اسانس از طریق تقطیر آبی از برگ گیاه رزماری با استفاده از دستگاه Clevenger با روش زیر به دست آمد. گونه رزماری در فصل رویشی سال ۹۶ از محوطه دانشگاه کردستان جمع آوری شد. بعد از شستشوی کامل در سایه خشک شد. برگ‌های گیاه آسیاب شده و با نسبت ۱۰ گرم در ۱۰۰ سی سی آب مقطر در بالن دستگاه ریخته شده سپس اجزای دستگاه وصل شد. با اعمال حرارت از طریق هیتر به مدت چهار تا پنج ساعت اسانس گیاه به طور کامل استخراج شد. پس از پایان کار اسانس استخراج شده، آبگیری شد. به منظور آبگیری اسانس از سولفات سدیم انیدرید استفاده شد (Haidarizadeh et al. 2020).

شناسایی و اندازه گیری ترکیبات برگ رزماری با استفاده از روش GC-Mass

جداسازی و شناسایی ترکیب‌های عصاره

مقدار ۰/۲ میکرولیتر از عصاره یا اسانس به دستگاه GC-Mass تزریق و درصد ترکیب‌های تشکیل‌دهنده پس از جداسازی به همراه شاخص بازداری محاسبه شد. در نهایت شناسایی ترکیب‌های موجود در عصاره با استفاده از اندیس بازداری (Retention Index)، بررسی طیف‌های جرمی و پیشنهادی کتابخانه کامپیوتر دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی و مقایسه آن‌ها با ترکیب‌های استاندارد انجام شد (Haidarizadeh et al. 2018).

دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی GC/MS فوق سریع Agilent مدل cA ۷۸۹ متصل به طیف-سنج جرمی با ستون HP5 به طول ۳۰ متر قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون مورد استفاده قرار گرفت. برنامه‌ریزی حرارتی از ۴۵ تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه بود. درجه حرارت محفظه تزریق ۲۸۰ درجه و درجه حرارت ترانسفرلین ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل مورد استفاده قرار گرفت (Haidarizadeh et al. 2018).

اثرات ضد باکتریایی عصاره رزماری

بررسی فعالیت ضد میکروبی، پس از تهیه محیط کشت مولر هینتون آگار، بررسی آنتی باکتریال به روش انتشار دیسک (Disk diffusion) انجام گرفت. قبل از انجام آزمایش، عصاره متانولی برگ گیاه رزماری در غلظت های مختلف (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵) به گرم بر لیتر) به روش سوکسله تهیه شد. متانول در درصدهای مختلف (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵) به عنوان کنترل منفی تهیه شد. سوسپانسیون میکروبی از تک کلونی باکتری های مورد مطالعه (*استافیلوکوکوس اورئوس* IBRC-M 10690، *شریشیا کلی* IBRC-M 10871، *زانتوموناس کامپستریس* IBRC-M 10644 و *سودوموناس سیرینگه* IBRC-M 10702) با کدورت معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$) ($10^8 \times 1/5$) تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آنها بطور مجزا و به صورت کشت چمنی بر روی محیط کشت مولر هینتون، کشت داده شدند. پس از آماده سازی محیط کشت و استریل کردن آن و قبل از سرد شدن کامل، حدود ۲۰ میلی لیتر محیط کشت در پلیت های استریل ریخته شد. از عصاره متانولی برگ گیاه رزماری، غلظت های هیدروالکلی مختلف (۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، گرم بر لیتر) تهیه شد. از متانول خالص درصدهای (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ متانول) به عنوان کنترل منفی گذاشته شدند. دیسک های بلانک استریل به مدت ۳۰ دقیقه در غلظت های مختلف عصاره و کنترل منفی قرار داده شدند. از سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند به صورت کشت چمنی یکنواخت کشت داده شدند. دیسک ها به مدت ۵ دقیقه از غلظت ها بیرون آورده شدند تا آب اضافی آن ها تبخیر و خشک شود. سپس، با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح محیط کشت قرار داده شدند. پلیت های آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس قطر هاله عدم رشد در مقابل نور اندازه گیری شد. کشت باکتری و دیسک گذاری در سه تکرار انجام شد. درصد قطر نسبی ناحیه مهار به عنوان یک شاخص فعالیت ضد میکروبی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد که در آن RIZD (Relative inhibitory zone diameter) ، درصد قطر نسبی ناحیه مهار و IZD قطر ناحیه مهار (inhibitory zone diameter) بر حسب میلی متر است (Haidarizadeh et al. 2020).

$$\text{RIZD (درصد)} = (\text{IZD}_{\text{zon diameter}} - \text{IZD}_{\text{negative control}}) / \text{IZD}_{\text{zon diameter}}$$

سویه های باکتریایی مورد مطالعه به صورت کشت فعال از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران خریداری شدند.

آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC)

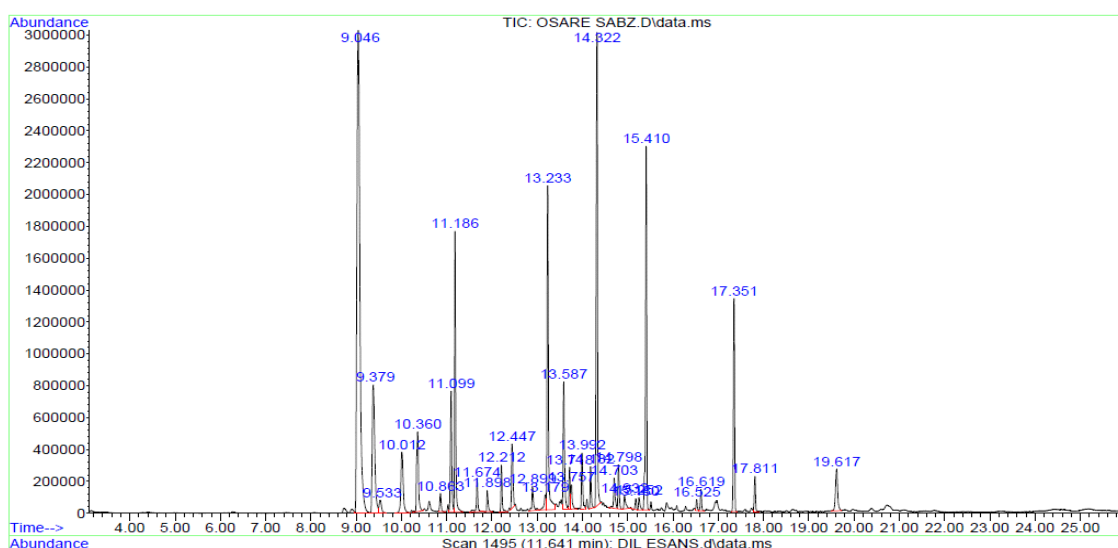
برای انجام آزمون MIC از محیط لوریا برتانی برات Luria Bertani broth در میکروپلیت ۹۶ خانه و همچنین غلظت های مختلفی از عصاره و اسانس استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده (با تراکم ۰/۵ مک فارلند) به چاهک های الیزا حاوی ۱۴۰ میکرولیتر لوریا برتانی برات شامل غلظت های مشخصی از اسانس و عصاره ی رزماری

(۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ گرم در لیتر) و همچنین غلظت یک گرم در لیتر کلرامفنیکل (به عنوان کنترل مثبت) اضافه گردید. کلرامفنیکل در برابر طیف گسترده ایی از باکتریهای متنوع مورد استفاده قرار می گیرد به دلیل تنوع باکتریهای مورد بررسی در این پژوهش از این آنتی بیوتیک عنوان کنترل استفاده شد. پلیت‌های حاوی باکتری‌های پاتوژن انسانی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و باکتری‌های پاتوژن گیاهی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بعد از پایان دوره ی گرماگذاری به تمام خانه‌های هر پلیت، ۱۰ میکرولیتر محلول ۲، ۳ و ۵ تری فنیل تترازولیوم کلراید با غلظت اولیه ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر اضافه و به مدت سه ساعت گرمخانه گذاری شد. در خانه‌هایی که رشد میکروبی اتفاق افتاده باشد ظرف مدت کمتر از ۳ ساعت رنگ قرمز ایجاد می‌شود. دلیل این امر این است که باکتری‌های فعال و زنده به کمک آنزیم هیدروژناز خود تری فنیل تترازولیوم کلراید را به نمک‌های فورمازان با رنگ قرمز احیاء می‌نمایند. پس از گذشت سه ساعت گرماگذاری، میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج و از نظر ایجاد رنگ قرمز بررسی شد. اولین غلظتی که در آن رشد میکروبی رخ نداد و رنگ قرمز تشکیل نشد، به عنوان MIC برای باکتری‌های مورد بررسی در نظر گرفته شد (Eloff, 1998).

نتایج و بحث

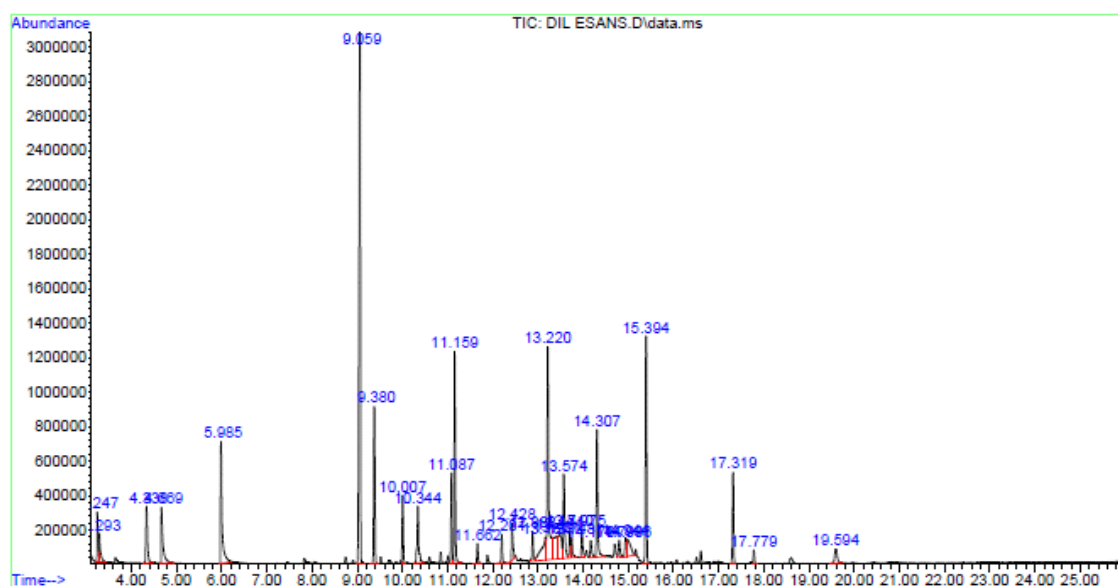
نتایج حاصل از GC – Mass در نمودار شکل ۲ دیاگرام به دست آمده از آنالیز GC-Mass عصاره متانولی

رزماری و در نمودار شکل ۳ آنالیز اسانس رزماری نشان داده شده است.



شکل ۲ - دیاگرام به دست آمده از آنالیز GC-Mass عصاره متانولی برگ گیاه رزماری

Figure 2. Diagram obtained from GC-Mass analysis of methanolic extract of rosemary leaves



شکل ۳- دیاگرام به دست آمده از آنالیز GC-Mass اسانس برگ گیاه رزماری

Figure 3. Diagram obtained from GC-Mass analysis of rosemary leaf essential oil

جدول ۲- ترکیبات احتمالی موجود در عصاره متانولی برگ گیاه رزماری به دست آمده از آنالیز GC-Mass

Table 2: Possible compounds in methanolic extract of rosemary leaves obtained from GC-Mass analysis

شماره پیک	فرمول مولکولی	زمان بازداری (دقیقه)	درصد (درصد)	ترکیب احتمالی
۱	C ₁₀ H ₁₆	۹/۰۴۶	۲۷/۲۷۵	alpha.Pinene
۲	C ₁₀ H ₁₆	۹/۳۷۹	۶/۰۸۳	Camphene
۳	C ₁₀ H ₁₄	۹/۵۳۳	۰/۵۸۰	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
۴	C ₁₀ H ₁₆	۱۰/۰۱۲	۲/۶۹۱	beta.Pinene
۵	C ₁₀ H ₁₆	۱۰/۳۶۰	۲/۸۴۹	beta.Myrcene
۶	C ₁₀ H ₁₆	۱۰/۸۶۳	۰/۴۷۶	alpha.Terpinen
۷	C ₁₀ H ₁₆	۱۱/۰۹۹	۳/۱۰۵	Limonene
۸	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۱/۱۸۶	۵/۶۸۹	Eucalyptol
۹	C ₁₀ H ₁₆	۱۱/۶۷۶	۰/۸۹۱	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
۱۰	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۱/۸۹۸	۰/۴۹۲	beta. Terpeneol, cis.
۱۱	C ₁₀ H ₁₆	۱۲/۲۱۲	۱/۰۶۱	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
۱۲	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۲/۴۴۷	۱/۷۰۱	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
۱۳	C ₉ H ₁₆ O	۱۲/۸۹۹	۰/۷۱۱	3,5-Heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl-
۱۴	C ₁₀ H ₁₆ O	۱۳/۱۷۹	۰/۷۹۰	Verbenol (2-pine-4-ol)

Camphor, (1R,4R)-(+)-	۷/۸۰۰	۱۳/۲۳۳	C ₁₀ H ₁₆ O	۱۵
.L-borneol	۳/۳۱۸	۱۳/۵۸۷	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۶
Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one, 2,6,6-trimethyl, (1.alpha.2.beta.5.alpha.)-	۰/۸۹۳	۱۳/۷۱۸	C ₁₀ H ₁₆ O	۱۷
Terpineol	۰/۶۱۴	۱۳/۷۵۷	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۸
p-menth-1-en-8-ol	۱/۳۷۶	۱۳/۹۹۲	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۹
3-Cyclopentene-1-ethanol, 2,2,4-trimethyl-	۰/۹۲۳	۱۴/۱۸۲	C ₁₀ H ₁₈ O	۲۰
Verbenone	۱۱/۹۴۴	۱۴/۳۲۲	C ₁₀ H ₁₄ O	۲۱
Bicyclo[4.1.0]heptan-3-ol, 4,7,7-trimethyl, (1.alpha.3.alpha.4.alpha.6.alpha.)-	۰/۸۶۶	۱۴/۷۰۳	C ₁₀ H ₁₈ O	۲۲
Bicyclo[3.1.1]heptane-2-methanol, 6,6-dimethyl, acetate	۱/۰۱۳	۱۴/۷۹۸	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	۲۳
Nerol	۰/۴۳۰	۱۴/۹۳۲	C ₁₀ H ₁₈ O	۲۴
3,6-Octadienoic acid, 3,7-dimethyl, methyl ester, (Z)-	۰/۲۲۱	۱۵/۱۸۰	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	۲۵
2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethenyl), (S)-	۰/۳۴۸	۱۵/۲۵۲	C ₁₀ H ₁₄ O	۲۶
Bornyl acetate	۸/۰۲۰	۱۵/۴۱۰	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	۲۷
trans-Shisool	۰/۲۴۸	۱۶/۵۲۵	C ₁₀ H ₁₈ O	۲۸
trans-Shisool	۰/۵۱۰	۱۶/۶۱۹	C ₁₀ H ₁₈ O	۲۹
Caryophyllene	۴/۷۹۵	۱۷/۳۵۱	C ₁₅ H ₂₄	۳۰
alpha.Caryophyllene	۰/۸۶۰	۱۷/۸۱۱	C ₁₅ H ₂₄	۳۱
Caryophyllene oxide	۱/۷۲۹	۱۹/۶۱۷	C ₁₅ H ₂₄ O	۳۲

جدول ۳- ترکیبات احتمالی موجود در اسانس برگ گیاه رزماری به دست آمده از آنالیز GC-Mass

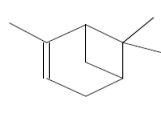
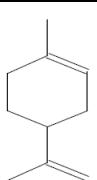
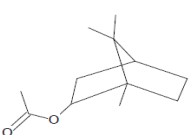
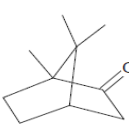
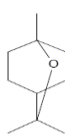
Table 3: Possible compounds in rosemary leaf essential oil obtained from GC-Mass analysis

ترکیب احتمالی	درصد (درصد)	زمان بازداری (دقیقه)	فرمول مولکولی	شماره پیک
Propanoic acid, ethyl ester	۱/۳۴۹	۳/۲۴۷	C ₅ H ₁₀ O ₂	۱
n-Propyl acetate	۱/۱۱۳	۳/۲۹۳	C ₅ H ₁₀ O ₂	۲
Toluene	۲/۵۱۱	۴/۳۳۸	C ₇ H ₈	۳
Acetic acid, 2-methylpropyl ester	۲/۷۰۳	۴/۶۶۹	C ₆ H ₁₂ O ₂	۴
Acetic acid, butyl ester	۵/۵۷۱	۵/۹۸۵	C ₆ H ₁₂ O ₂	۵
.alpha.Pinene	۲۰/۱۰۷	۹/۰۵۹	C ₁₀ H ₁₆	۶
Camphene	۴/۹۷۲	۹/۳۸۰	C ₁₀ H ₁₆	۷
.beta.-pinene	۲/۰۸۳	۱۰/۰۰۷	C ₁₀ H ₁₆	۸
.beta.Myrcene	۲/۴۴۰	۱۰/۳۴۴	C ₁₀ H ₁₆	۹
Limonene	۲/۷۶۹	۱۱/۰۸۷	C ₁₀ H ₁₆	۱۰
Eucalyptol	۶/۲۶۶	۱۱/۱۵۹	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۱
1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	۰/۶۱۹	۱۱/۶۶۲	C ₁₀ H ₁₆	۱۲
Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	۰/۹۷۰	۱۲/۲۰۱	C ₁₀ H ₁₆	۱۳
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	۱/۳۵۳	۱۲/۴۲۸	C ₁₀ H ₁₈ O	۱۴
Bicyclo[3.1.1]hept-2-en-6-one, 2,7,7-trimethyl-	۰/۹۸۲	۱۲/۸۸۳	C ₁₀ H ₁₄ O	۱۵

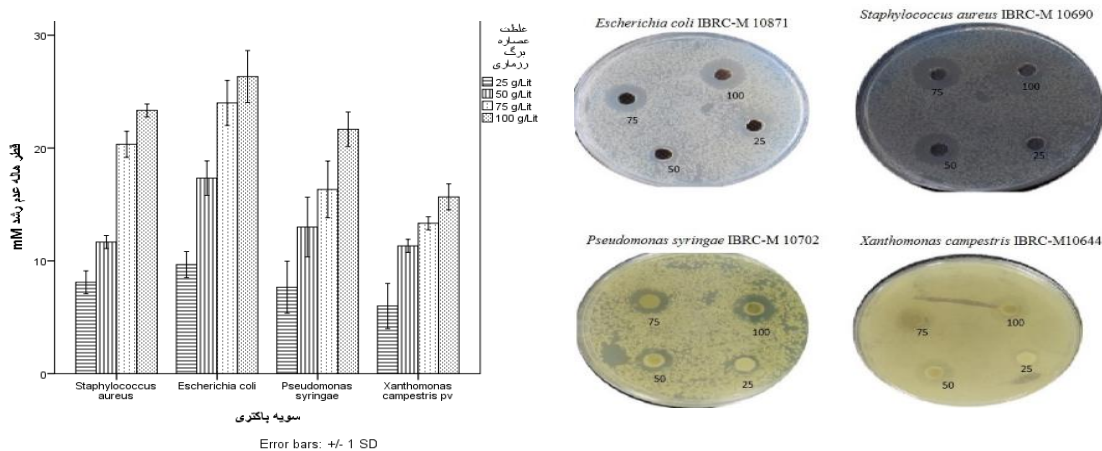
1,2,3-Propanetriol, monoacetate	۲/۸۵۷	۱۳/۱۶۷	C ₅ H ₁₀ O ₄	۱۶
camphor	۹/۸۹۱	۱۳/۲۲۰	C ₁₀ H ₁₆ O	۱۷
1,2,3-Propanetriol, monoacetate	۲/۳۶۱	۱۳/۴۲۱	C ₅ H ₁₀ O ₄	۱۸
1,2,3-Propanetriol, monoacetate	۲/۴۶۶	۱۳/۴۸۱	C ₅ H ₁₀ O ₄	۱۹
Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl, (1S-endo)-	۳/۵۷۶	۱۳/۵۷۴	C ₁₀ H ₁₈ O	۲۰
Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one, 2,6,6-trimethyl, (1.alpha.2.beta.5.alpha.)-	۰/۸۹۰	۱۳/۷۱۰	C ₁₀ H ₁₆ O	۲۱
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	۰/۷۴۰	۱۳/۷۴۸	C ₁₀ H ₁₈ O	۲۲
p-menth-1-en-8-ol	۱/۰۷۷	۱۳/۹۷۵	C ₁₀ H ₁₈ O	۲۳
Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl, (1S-endo)-	۰/۷۵۳	۱۴/۱۷۰	C ₁₀ H ₁₈ O	۲۴
Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	۴/۷۴۸	۱۴/۳۰۷	C ₁₀ H ₁₄ O	۲۵
Bicyclo[3.1.1]heptane-2-methanol, 6,6-dimethyl, acetate	۰/۷۵۰	۱۴/۷۹۹	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	۲۶
Decanoic acid, 3-hydroxy, methyl ester	۰/۸۸۹	۱۴/۹۴۴	C ₁₁ H ₂₂ O ₃	۲۷
1,2,3-Propanetriol, monoacetate	۱/۶۸۲	۱۴/۹۸۶	C ₅ H ₁₀ O ₄	۲۸
Bornyl acetate	۷/۱۰۲	۱۵/۳۹۴	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	۲۹
Caryophyllene	۲/۹۲۴	۱۷/۳۱۹	C ₁₅ H ₂₄	۳۰
alpha.Caryophyllene	۰/۴۸۲	۱۷/۷۹۹	C ₁₅ H ₂₄	۳۱
Caryophyllene oxide	۱/۰۰۳	۱۹/۵۹۴	C ₁₅ H ₂₄ O	۳۲

بر اساس نتایج جدول ۲ ترکیبات اصلی تشکیل دهنده عصاره رزماری شامل آلفا-پینن (۲۷/۲۷۵ درصد)، ورنون (۱۱/۹۴۴ درصد)، بورنیل استات (۸/۰۲ درصد)، کافور (۷/۰۰۸ درصد) و ترکیبات اصلی اسانس بر اساس نتایج جدول ۳ شامل: آلفا-پینن (۲۰/۱۰۷ درصد)، کافور (۹/۸۹۱ درصد)، بورنیل استات (۷/۱۰۲ درصد) و اکالیپتول (۶/۲۶۶ درصد) است. آلفا-پینن هم در عصاره و هم در اسانس بالاترین میزان درصد را داشته و بورنیل استات و کافور هم از اجزاء اصلی تشکیل دهنده هر دو بوده ولی درصد آنها متفاوت است. در جدول ۳ ترکیبات احتمالی موجود در اسانس برگ گیاه رزماری بر اساس آنالیز GC-Mass نشان داده شده است. در جدول ۴ مقایسه ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در عصاره و اسانس انجام شده است.

جدول ۴- مقایسه ترکیبات عصاره و اسانس رزماری
Table 4- Comparison of rosemary extract and essential oil compositions

ترکیبات اصلی	آلفا پینن	لیمونن	بورنیل استات	کامفور	اکالیپتول
عصاره (درصد)	۲۷/۲۷۵	۳/۱۰۵	۸/۰۲	۷/۸	۵/۶۸۹
اسانس (درصد)	۲۰/۱۰۷	۲/۷۶۹	۷/۱۰۳	۹/۸۹	۶/۲۶
ساختار شیمیایی					
فرمول مولکولی	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₀ H ₁₄ O	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	C ₁₀ H ₁₆ O	C ₁₀ H ₁₈ O
	(ترکیبات ترپنی، مونوترپن)	(ترکیبات ترپنی، مونوترپن)	(استر)	(کتون)	(ترکیبات مونوترپنی، اتری)

نتایج اثر ضد باکتریایی عصاره و اسانس برگ رزماری بر روی گونه‌های باکتریایی بیماری‌زای انسانی و گیاهی
نتایج اثر عصاره رزماری علیه سویه‌های باکتریایی به روش انتشار در دیسک



شکل ۴- اثر مهاري عصاره رزماری در برابر سویه‌های باکتریایی به روش انتشار دیسک

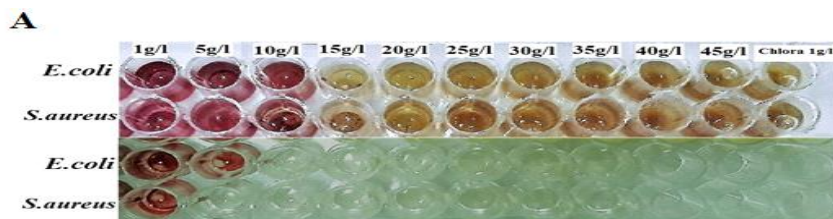
Figure 4. Inhibitory effect of rosemary extract against bacterial strains by Disk diffusion methods

شکل ۴، اثر مهاري عصاره رزماری را در برابر سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه به روش انتشار در دیسک نشان می‌دهد. نتایج به‌دست‌آمده، نشان‌دهنده اثر مهاري عصاره رزماری در برابر سویه‌های مختلف باکتری‌های بیماری‌زا است. در این نمودار اثر چهار غلظت (۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، گرم بر لیتر) عصاره رزماری بر درصد قطر نسبی ناحیه مهار به عنوان یک شاخص فعالیت ضد میکروبی در مورد چهار سویه باکتری مورد مطالعه نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره در مورد هر چهار سویه، قطر ناحیه مهار افزایش نشان می‌دهد. عصاره رزماری بیشترین اثر مهاري

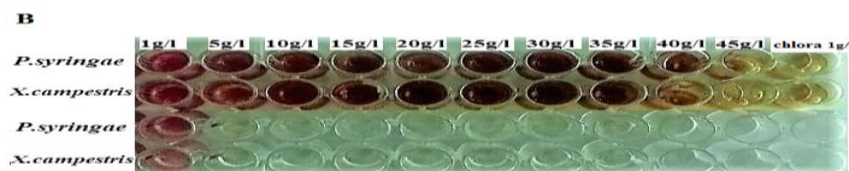
را در برابر باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۳ تا ۲۶ میلی متر) نشان داد. کمترین میزان مهارکنندگی در برابر *زانتوموناس کامپستریس* (با میانگین قطر هاله عدم رشد ۷ میلی متر) بود. اثر مهاری در برابر سایر سویه های باکتریایی مورد مطالعه نیز با میانگین قطر هاله عدم رشد به اندازه ۸ تا ۲۴ میلی متری نشان داده شد. نتایج آنالیز واریانس مقایسه میانگین ها در مورد فاکتور باکتری های مورد بررسی (چهار باکتری) با F برابر ۴۵/۸۷۰ و در مورد فاکتور غلظت عصاره (چهار غلظت) با F برابر ۱۶۵/۲۰۴، فرضیه معنی دار بودن تفاوت میانگین ها را در مورد هر دو عامل کاملا تایید نموده و نشان می دهد از نظر آماری غلظت های مختلف عصاره متانولی برگ رزماری بر مهار رشد هر چهار باکتری مورد مطالعه اثر معنی دار در هر دو سطح یک درصد و پنج درصد نشان می دهد. آزمون تعقیبی دانکن برای گروه بندی میانگین ها، باکتری ها را در سه سطح گروه بندی می نماید. *اشریشیا کلی* بیشترین حساسیت و *زانتوموناس کامپستریس* بیشترین مقاومت را در برابر عصاره نشان می دهد. آزمون دانکن *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس سیرینگه* را در یک سطح گروه بندی می نماید. از نظر فاکتور غلظت عصاره نیز آزمون دانکن میانگین ها را در چهار سطح گروه بندی نموده و اثرات ضد میکروبی وابسته به غلظت عصاره برگ رزماری را تایید می نماید.

نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره و اسانس برگ رزماری

همان گونه که در شکل ۵ و ۶ مشخص است، هر کدام از سویه های باکتریایی دارای MIC مختص به خود بوده که مقادیر آن در جدول ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵- تعیین میزان MIC عصاره و اسانس رزماری علیه سویه های باکتریایی بیماری زای انسانی
Figure 5. Determination of MIC of rosemary extract and essential oil against human pathogenic bacterial strains



شکل ۶ - تعیین میزان MIC عصاره و اسانس رزماری علیه سویه های باکتریایی بیماری زای گیاهی

Figure 6. Determination of MIC of rosemary extract and essential oil against plant pathogenic bacterial strains

جدول ۵ - مقایسه MIC عصاره و اسانس رزماری علیه سویه‌های باکتریایی بیماری‌زا

Table 5. Comparison of MIC of rosemary extract and essential oil against pathogenic bacterial strains

Pathogenic bacteria	MIC (mg/ml) Extract	MIC (v/v) Essential oil
IBRC-M 10871 <i>E. coli</i>	۱۰	۵
IBRC-M 10690 <i>S. aureus</i>	۱۰	۱
IBRC-M 10702 <i>P. syringae</i>	۴۰	۱
IBRC-M 10644 <i>X. campestris</i>	۴۰	۱

ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس و عصاره گونه‌های مختلف گیاهی با استفاده از طیف سنجی جرمی کروماتوگرافی گاز (GC-MS) در پژوهش‌های متعددی گزارش شده است (Hcini *et al.*, 2013). در یک تحقیق سه ترکیب ۱ و ۸ سینول، کافور و آلفا پینن به عنوان ترکیبات اصلی اسانس رزماری گزارش شده است (Takayama *et al.*, 2016). در یک پژوهش دیگر در اسانس رزماری جمع‌آوری شده از (Taizhou, China) ۲۲ ترکیب شناسایی شده که ۸ سینول (درصد ۲۶/۵۴)، آلفا-پینن (۲۰/۱۴ درصد)، کامفور (۱۲/۸۸ درصد) کامفن (۱۱/۳۸ درصد) ترکیبات اصلی معرفی شده‌اند (Jiang *et al.*, 2011). در پژوهشی دیگر در اسانس رزماری جمع‌آوری شده از Ouezzane (North-West of Morocco) ۲۹ ترکیب شناسایی شده که مونوترپن‌های اکسیژنه (درصد ۶۳/۷۴) و مونوترپن‌های هیدروکربن (۲۱/۲۳ درصد)، شامل ۱ و ۸ سینول (درصد ۲۳/۶۷)، آلفا-پینن (۱۴/۰۷ درصد)، کامفور (۱۸/۷۴ درصد) و بورنیل (۵/۴۶ درصد) ترکیبات اصلی معرفی شده‌اند (Bouyahya *et al.*, 2017). نکته حائز اهمیت این است که نوع و میزان ترکیبات و به تبع آن میزان فعالیت ضد میکروبی اسانس به محل کاشت گیاه وابسته است (Jordán *et al.* 2013).

شکل‌های (۲) و (۳) دیگرام و آنالیز ترکیبات اسانس و عصاره برگ رزماری بدست آمده توسط دستگاه آنالیز GC-Mass را نشان می‌دهند. جداول (۲) و (۳) نیز ساختار مولکولی و ترکیبات احتمالی برآورد شده برای این اجزای شیمیایی شناسایی شده را نشان می‌دهند. در جدول (۴) مقایسه ترکیبات اصلی عصاره و اسانس از نظر مقدار و ساختار نشان داده شده است.

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که ۳۲ ترکیب شیمیایی موجود در عصاره متانولی برگ رزماری براساس بیشترین شباهت احتمالی به ترکیبات استاندارد معرفی شده در کتابخانه نرم افزار دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی، شناسایی و درصد و مقدار آنها نیز محاسبه شده است. آلفا-پینن (۲۷/۲۷۵ درصد)، وربنون (۱۱/۹۴۴ درصد)، بورنیل استات (۸/۰۲ درصد)، کامفور (۷/۰۰۸ درصد)، کامفن (۶/۰۸۳ درصد)، اوکالیپتول (۵/۶۸۹ درصد)، کاریوفیلین (۴/۷۹۵ درصد)،

البورنیول (۳/۲۱۸ درصد)، لیمونن (۳/۱۰۵ درصد)، امیرسین (۲/۸۴۹ درصد)، بتا پینن (۲/۶۹۱ درصد)، ده ترکیب اصلی و شناخته شده موجود در عصاره متانولی برگ رزماری به ترتیب درصد و مقدار است.

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که ۳۲ ترکیب شیمیایی در اسانس برگ رزماری بر اساس بیشترین شباهت به ترکیبات استاندارد موجود در کتابخانه نرم افزار دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی شناسایی و درصد و مقدار آنها نیز محاسبه شده است. آلفا-پینن (۲۰/۱۰۷ درصد)، کامفور (۹/۸۹۱ درصد)، بورنیل استات (۷/۱۰۲ درصد)، اوکالیپتول (۶/۲۶۶ درصد)، کامفن (۴/۹۷۲ درصد)، کاریوفیلین (۲/۹۲۴ درصد)، لیمونن (۲/۷۶۹ درصد)، بتاپینن (۲/۰۸۳ درصد)، و چندین مشتق ترکیبات دو حلقه ایی ده ترکیب اصلی و شناخته شده موجود در اسانس برگ رزماری به ترتیب درصد و مقدار است.

مقایسه ترکیبات شناسایی شده در اسانس و عصاره رزماری در جدول ۴ نشان می‌دهد که آلفا-پینن، کامفور، کامفن، اوکالیپتول، کاریوفیلین، بتاپینن، لیمونن و بورنیل استات ترکیبات عمده و شناخته شده در عصاره و اسانس رزماری هستند هر چند درصد آنها با هم متفاوت است.

هر چند تشابه قابل توجهی بین ترکیبات گزارش شده اسانس رزماری در این پژوهش با دیگر پژوهش های مرتبط مشاهده می‌شود تفاوت در نوع و درصد ترکیبات گزارش شده را می‌توان به شرایط اقلیمی، عرض و طول جغرافیایی، ارتفاع محل رویش و کشت و همچنین تا حدودی ژنوتیپ وارته و گونه مورد مطالعه مرتبط دانست.

فراورده‌های گیاهی طبیعی و فعال بیولوژیکی مانند اسانس و عصاره می‌توانند جایگزین سموم غیرطبیعی و شیمیایی سنتزی باشند و به عنوان ترکیبات جدید و مؤثر در کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای گیاهی استفاده گردند. اسانس-ها، فراورده‌های معطر و فرار نتیجه متابولیسم ثانویه یک گیاه معطر بوده و به طور معمول در سلول یا گروه های سلولی خاص تشکیل می‌شوند. اسانس‌ها عمدتاً از مونوترپن‌ها، سزکوئی‌ترپن‌ها و مشتقات اکسیژنه آنها (الکل، آلدئید، استر، کتون، فنل و اکسید) تشکیل شده‌اند. اثرات ضد میکروبی، ضدباکتریایی، ضدقارچی، آنتی‌لیشمانیا (*antileishmania*)، آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره رزماری در پژوهش های متعددی ارزیابی شده است. در یک بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس رزماری در برابر سه باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اپیدرمیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس*) و سه باکتری گرم منفی (*پروتئوس و لگاریس*، *پسدموناس ائروجینوزا* و *اشریشیا کلی*) و دو قارچ (*کاندیدا آلبیکانس* و *آسپیرژیلوس نایزر*) ارزیابی گردید. در مقایسه با اسانس چند گیاه مورد مطالعه و پنی‌سیلین، اسانس رزماری بیشترین اثر مهارکنندگی را در برابر همه سویه های باکتریایی نشان داد. همچنین اسانس رزماری در برابر قارچ *کاندیدا آلبیکانس* اثر ضد قارچی قابل توجه نشان داد. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس رزماری در برابر همه میکرو ارگانیسم ها در محدوده ۰/۰۳ - ۱ درصد (v/v) گزارش گردیده است. بر اساس نتایج این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی

اسانس رزماری ۰/۱ است در صورتی که حداقل غلظت مهارکنندگی اجزای اصلی اسانس یعنی آلفا-پینن و ۱ و ۸ سینوئول ۰/۵ است (Jiang et al. 2011). در پژوهشی دیگر حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس رزماری در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲mg/mL و در برابر *اشریشیا کلی* 1mg/mL گزارش شده است (Bouyahya et al. 2017). در یک مطالعه دیگر میانگین قطر ناحیه مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* تحت تاثیر اسانس رزماری با روش انتشار دیسک به ترتیب ۸/۳۳ و ۱۶/۶۷ میلی متر گزارش گردیده است (Gachkar et al. 2007).

شکل ۴ اثر مهاری عصاره‌ی رزماری را در برابر سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه به روش انتشار در دیسک نشان می‌دهد. با افزایش غلظت عصاره در مورد هر چهار سویه باکتری قطر هاله عدم رشد افزایش نشان می‌دهد که تایید کننده این است که توانایی مهارکنندگی عصاره رزماری وابسته به غلظت بوده و نسبت مستقیم با آن دارد. یعنی هرچه غلظت عصاره بیشتر می‌شود توانایی مهار رشد و اثر ضد باکتریایی آن افزایش می‌یابد. هم در غلظت‌های کم و هم در غلظت‌های زیاد عصاره رزماری بیشترین اثر مهاری را در برابر *اشریشیا کلی* نشان می‌دهد. در مقابل در غلظت‌های کم و زیاد در مقایسه با چهار سویه باکتری مورد مطالعه عصاره رزماری کمترین اثر مهارکنندگی رشد را در برابر *زانتوموناس کمپستریس* نشان می‌دهد.

اسانس رزماری غنی از آلفا پینن بوده و طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد باکتریایی را در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت به نمایش گذاشته است (Ojeda-Sana et al. 2013). ۱ و ۸ سینوئول با ایجاد اختلال در غشای سلولی فعالیت ضدباکتریایی را در برابر باکتری‌های بیماری‌زا گرم منفی نشان می‌دهند. پتانسیل ضد میکروبی شدید اوژنول، آلفا و بتا پینن نشان می‌دهد که قادر به مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت هستند (Leite et al. 2007). گزارش شده است که هیدروکربن‌های مونوترپن از نوع آلفا و بتا پینن از مواد شیمیایی شناخته شده‌ای هستند که دارای پتانسیل ضد میکروبی هستند (Bajpai et al. 2011). اگر چه مکانیسم عملکرد ترپن‌ها کاملاً درک نشده است، اما تصور می‌شود که اختلال غشایی توسط ترکیبات لیپوفیلی را شامل شود (Chudasama & Thaker, 2012). این ترکیبات عوامل ضد میکروبی شناخته شده‌ای هستند که می‌توانند برای کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی استفاده شوند (Silva et al, 2012). بیماری‌های گیاهی با کاهش کیفیت و کمیت گیاهان و محصولات گیاهی در بازار باعث خسارت اقتصادی جهانی و از بین رفتن محصولات زراعی می‌شوند (Vu et al. 2017). پاتوواره‌های از *زانتوموناس* شناخته شده‌اند که باعث ایجاد تعداد زیادی از بیماری‌ها در بسیاری از گیاهان مهم زراعی می‌شوند (De Britto et al. 2011; Babu et al., 2007). اثر ۱۱ اسانس به عنوان تیمار بذر برای کنترل *Xanthomonas perforans* در گوجه فرنگی و اثر آن بر جوانه زنی بذر و رشد گیاهچه مورد بررسی قرار گرفت. در روش‌های آزمایشگاهی تیمار بذر با روغن‌های اکالیپتوس و رزماری به طور همزمان، باعث مهار

رشد *Xanthomonas perforans* و کاهش میزان و شدت BLS در تست های گیاهی شد. بنابراین، روغن های اکالیپتوس و رزماری را می توان در تیمار بذر برای کنترل BLS در گوجه فرنگی استفاده کرد (تیمار دانه ها با روغن رزماری، نیولی و روغن اوکالیپتوس میزان و شدت BLS را در گیاهان گوجه فرنگی کاهش داد (Mbega et al. 2012)). روغن اسانس رزماری فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی نسبت به آلفا پینن و ۸، ۱- سینئول، خصوصا در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد. به نظر می رسد روغن های اسانسی در غلظت های پایین به سطح باکتری ها متصل شده اند و با افزایش غلظت، دیواره های سلولی به تدریج آسیب دیده و سپس محتوای سلولی به بیرون نشت پیدا کرده است. این تفاوت ها در حساسیت میکروارگانیزم های مورد آزمایش به نمونه های آزمایشی می تواند به تغییر در میزان نفوذ نمونه ها از دیواره سلولی و ساختار غشای سلولی نسبت داده شود (Jiang et al. 2011). نتایج این مطالعه نیز با یافته های قبلی مطابقت دارد که نشان داده شده است که عصاره رزماری در غلظت های مختلف به روش چاهک، بر روی رشد باکتری های گرم مثبت و منفی اثر بازدارنده دارد. با افزایش غلظت، قطر هاله عدم رشد نیز افزایش می یابد که بیشترین قطر هاله عدم رشد در هر دو باکتری مربوط به غلظت ۱۰۰ گرم بر لیتر، و کمترین مربوط به غلظت ۲۵ گرم بر لیتر است. عصاره رزماری اثر ضد باکتریایی بیشتری علیه پاتوژن های انسانی در مقایسه با پاتوژن های گیاهی نشان داده است.

میزان MIC اسانس رزماری بر روی سویه های مورد مطالعه در این تحقیق در مورد *اشرشیاکلی* پنج میلی گرم بر میلی لیتر بوده و نسبت به دیگر سویه ها کمترین توانایی مهارکنندگی را نشان می دهد. در مورد دیگر سویه ها یعنی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس سیرینگه* و *زانتوموناس کمپستریس* حداقل غلظت مهارکنندگی در یک میلی گرم بر میلی لیتر بوده و نشان دهنده توانایی مهارکنندگی تقریبا یکسان اسانس در برابر این سه سویه است. میزان MIC عصاره رزماری بر روی سویه های مورد مطالعه در این تحقیق در مورد *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* یکسان و برابر و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر است. در مورد دیگر سویه ها یعنی، *سودوموناس سیرینگه* و *زانتوموناس کمپستریس* نیز حداقل غلظت مهارکنندگی یکسان و برابر و در محدوده ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر است که نشان دهنده توانایی مهارکنندگی تقریبا یکسان عصاره در برابر این سویه ها است. مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره رزماری در برابر پاتوژن های گیاهی و انسانی نشان می دهد که توانایی مهارکنندگی عصاره در برابر پاتوژن های انسانی بطور معنی دار بیشتر از پاتوژن های گیاهی است.

به طور کلی در این بررسی با توجه به نتایج حاصل از دیسک و همچنین تعیین MIC (جدول ۴) می توان نتیجه گرفت فعالیت ضد باکتریایی اسانس رزماری در برابر هر چهار سویه باکتریایی مورد مطالعه بیشتر از عصاره رزماری است. نتایج بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس رزماری در برابر باکتری های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس* نشان می دهد اسانس

رزماری منبع خوب دارویی و مواد نگهدارنده غذا در برابر میکروارگانیسم‌ها است. در محصولات با ارزش بیماری‌های باکتریایی در برخی شرایط منجر به کاهش محصول و یا محصولات معیوب می‌شود. اقدامات مختلفی برای کنترل بیماری‌های باکتریایی صورت گرفته است اما با کارایی محدود بوده و هر یک از اقدامات دارای مزایا و معایبی است. این مطالعه نشان داد که استفاده از اسانس رزماری می‌تواند راه حلی برای مقابله با پاتوژن‌های گیاهی و سازگار با محیط زیست باشد. پیشنهاد می‌شود اثرگذاری و اثر ضد قارچی اسانس و عصاره رزماری بر انواع بیشتری از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی و انسانی مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش آلفا-پینن، کامفور، بورنیل استات، اوکالیپتول، کامفن، کاریوفیلن، لیمونن، بتاپینن و چندین مشتق ترکیبات دو حلقه‌ای، ده ترکیب اصلی و شناخته شده موجود در اسانس برگ رزماری به ترتیب درصد و مقدار هستند. آلفا-پینن، وربنون، بورنیل استات، کامفور، کامفن، اوکالیپتول، کاریوفیلن، ال بورنیول، لیمونن، امیرسین، بتا پینن، ده ترکیب اصلی و شناخته شده موجود در عصاره متانولی برگ رزماری به ترتیب درصد و مقدار هستند. این ترکیبات ویژگی‌های آللوپاتی، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی دارند. تفاوت قابل توجهی در درصد و نوع ترکیبات شناسایی شده در اسانس و عصاره رزماری مشاهده می‌شود که این تفاوت می‌تواند به روش‌های متمایز جداسازی و استخراج و تهیه اسانس و عصاره مرتبط باشد. بررسی اثر ضد باکتری به روش انتشار دیسک نشان داد که عصاره گیاه در غلظت‌های مختلف اثر ضد میکروبی علیه باکتری‌های پاتوژن گیاهی و انسانی دارد، هم در غلظت‌های کم و هم در غلظت‌های زیاد عصاره رزماری بیشترین اثر مهاری را در برابر *اشرشیاکلی* نشان داد. در مقابل هم در غلظت‌های کم و هم در غلظت‌های زیاد در مقایسه با چهار سویه باکتری مورد مطالعه عصاره رزماری کمترین اثر مهارکنندگی رشد را در برابر *زانتوموناس کمپستریس* نشان می‌دهد. عصاره گیاه اثر مهاری بیشتری بر روی پاتوژن‌های انسانی نسبت به پاتوژن گیاهی نشان داد. میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد اسانس رزماری بر روی سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در مورد *اشرشیاکلی* نسبت به دیگر سویه‌ها کمترین توانایی مهارکنندگی را نشان می‌دهد. در مورد دیگر سویه‌ها یعنی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس سیرینگه* و *زانتوموناس کمپستریس* حداقل غلظت مهارکنندگی نشان دهنده توانایی مهارکنندگی تقریباً یکسان اسانس در برابر این سه سویه است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره رزماری بر روی سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در مورد *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* یکسان است. در مورد دیگر سویه‌ها یعنی

سودوموناس سیرینگه و زانتوموناس کمپستریس نیز حداقل غلظت مهارکنندگی یکسان و نشان دهنده توانایی مهار کنندگی تقریباً یکسان عصاره در برابر این سویه‌ها است. مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره رزماری در برابر پاتوژن‌های گیاهی و انسانی نشان می‌دهد که توانایی مهارکنندگی عصاره در برابر پاتوژن‌های انسانی بطور معنی‌دار بیشتر از پاتوژن‌های گیاهی است. به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از دیسک و همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی می‌توان نتیجه گرفت فعالیت ضد باکتریایی اسانس رزماری در برابر هر چهار سویه باکتریایی مورد مطالعه در این بررسی بیشتر از عصاره رزماری است. در این مطالعه در مقایسه با مطالعات پیشین فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره علاوه بر پاتوژن‌های انسانی بر روی پاتوژن‌های گیاهی نیز مورد بررسی قرار گرفت. پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی ترکیبات عصاره و اسانس برگ، گل و ریشه گیاه رزماری با روش‌های جداسازی و شناسایی دقیق‌تر مانند HPLC و NMR بررسی شود. اثرات عصاره و اسانس رزماری در برابر طیف گسترده‌تری از عوامل بیماری‌زای انسانی، دامی و گیاهی و اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد آفات و ضد حشرات، بررسی شده و در نهایت این اثرات ضد میکروبی در مرحله بالینی ارزیابی و زمینه ساخت و سنتز آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی بر پایه این گیاه دارویی فراهم گردد.

منابع

- Babu, S., Satish, S., Mohana, D., Raghavendra, M. and Raveesha, K. (2007). Anti-bacterial evaluation and phytochemical analysis of some Iranian medicinal plants against plant pathogenic *Xanthomonas* pathogens. *Journal of Agricultural Technology*, 3(2), pp.307-16.
- Bajpai, V.K., Kang, S.R., Xu, H., Lee, S.G., Baek, K.H. and Kang, S.C. (2011). Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* species: a review. *The Plant Pathology Journal*, 27(3), pp.207-224
- Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Talbau, A., Fellah, H., Abrini, J. and Dakka, N. (2017). Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial pathogenesis*, 111, pp.41-49.
- Chudasama, KS. and Thaker, VS. (2012) Screening of potential antimicrobial compounds against *Xanthomonas campestris* from 100 essential oils of aromatic plants used in India: an ecofriendly approach. *Archives of phytopathology and plant protection*, 45(7), pp.783-95.
- De Britto, AJ., Gracelin, DHS and Sebastian, SR. (2011). Antibacterial activity of a few medicinal plants against *Xanthomonas campestris* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Biopesticides*, 4(1), pp.57.
- Eloff, JN. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64(08), pp.711-3
- 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), pp.898-904.

- Haidarizadeh, M., Lotfi, V. and Ghanei alvar, M. (2018). Evaluation of chemical compounds, antibacterial and allelopathic properties of cedar leaf extract (*Cupressus arizonica*). Journal of Plant Research, 31, (1), pp.72-81
- Haidarizadeh, M., Zareie, S., Ashengroph, M., and Maroofi, H. (2020). Chemical Composition and Biological effects of (Koma) *Ferula oopoda*. Journal of Plant Research, 33, (4), pp.854-863
- Hamidpour, R., Hamidpour, S. and Elias, G. (2017). *Rosmarinus officinalis* (Rosemary): a novel therapeutic agent for antioxidant, antimicrobial, anticancer, antidiabetic, antidepressant, neuroprotective, anti-inflammatory, and anti-obesity treatment. Biomed J Sci Tech Res.;1(4), pp.1-6.
- Hcini, K., Sotomayor, J.A., Jordan, M.J. and Bouzid, S. (2013). Chemical composition of the essential oil of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) of Tunisian origin. Asian Journal of Chemistry, 25(5), p.2601.
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y-J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.J. and *et al.* (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environmental toxicology and pharmacology.;32(1), pp.63-8
- 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), pp.463-468.
- Kluytmans, J., Van, Belkum A. and Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clinical microbiology reviews.;10(3)), pp.505-20
- Lamichhane, JR., Messéan, A. and Morris, CE. (2015). Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. Journal of general plant pathology; 81(5), pp.331-50.
- Leite, AM., Lima, EdO., Souza, ELd., Diniz, MdFFM., Trajano, VN. and Medeiros, IAd. (2007). Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.;43(1), pp.121-6.
- Malakar, M. (2014). Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* isolated from urine and stool samples of aninfected patient's in theLakhimpur district of Assam, India.
- Mbega, E.R., Mabagala, R.B., Mortensen, C.N. and Wulff, EG. (2012). Evaluation of essential oils as a seed treatment for the control of *Xanthomonas* spp. associated with the bacterial leaf spot of tomato in Tanzania. Journal of Plant Pathology, pp.273-281.
- Mori, M., Sogou, K. and Inoue, Y. (2019). Development of a selective medium and antisera for *Pseudomonas syringae* PV. syringe from seeds of barley and wheat. Journal of General Plant Pathology.;85(3), pp.211-20.
- Nicolas, O., Charles, MT., Jenni, S., Toussaint, V. and Beaulieu, C. (2018). Relationships between *Xanthomonas campestris* PV. vitians population sizes, stomatal density, and lettuce resistance to bacterial leaf spot. Canadian Journal of plant pathology.:(3)40 , pp 407-39

- Ojeda-Sana, AM., van Baren, CM., Elechosa, MA., Juárez, MA. and Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control.*;31(1) , pp.189-95.
- Saharkhiz, MJ. Smaeili, S. and Merikhi, M. (2010). Essential oil analysis and phytotoxic activity of two ecotypes of *Zataria multiflora Boiss.* Growing in Iran. *Natural Product Research*, 24(17), pp.1598-1609.
- Takayama, C., de-Faria, FM., de Almeida, ACA., Dunder, RJ., Manzo, LP. and Socca, EAR. (2016). Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine.*;6(8) , pp:677-81.
- Vu, TT., Choi, GJ. and Kim, JC. (2017). Plant-derived Antibacterial Metabolites Suppressing Tomato Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Research in Plant Disease.*;23(2) , pp:89-98.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T. and Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis L.* varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and chemical toxicology*, 48(11), pp.3144-3152.

*** <https://www.cowellsgc.co.uk/rosmarinus-officinalis-miss-jessopps-upright-3l>

(Rosmarinus officinalis L.) extract and essential oil on plant pathogens (Xanthomonas compestris and Pseudomonas syringe) and human pathogens (Staphylococcus aureus and Escherichia coli)

M. Haidarizadeh^{1*}, M. Hemati², M. Ashengroph³

Received: 2021.02.16

Accepted: 2021.05.21

Abstract

Introduction: Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) is a valuable medicinal plant. This study aimed to compare the chemical composition and antimicrobial effects of rosemary metabolic extract and essential oil against plant and human pathogens. Methods: the compounds of methanolic extract and rosemary leaf essential oil were identified by GC-Mass, the antibacterial effects of essential oil and extract were measured by disk diffusion method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of rosemary essential oil and extract was measured. Analysis of variance and Duncan's test were used for statistical evaluation of data. Results and discussion: Alpha-Pinene, Verbonone, Bornyl acetate, Camphor, Limonene, Caryophyllene, beta-pinene, beta-Myrcene, L-borneol, Camphene are the main constituents of the extract and alpha-pinene, camphor, bornyl acetate and eucalyptol, Camphene, Caryophyllene, Limonene, beta-pinene were the main essential oil of rosemary leaf. Rosemary extract showed the highest and lowest inhibitory effect against Escherichia coli and Xanthomonas compestris. In the case of Staphylococcus aureus, Pseudomonas syringe, and Xanthomonas compestris, the results show that the essential oil has the same inhibitory ability against these three strains, and the ability of the extract to inhibit human pathogens is significantly higher than that of plant pathogens. Rosemary extract and essential oil can be used as a solution to control plant and human diseases.

Keywords: Alpha-Pinene, Antibacterial effects, Camphor, inhibition

¹Assistant Professor of Plant Physiology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran (* Corresponding Author: m.haidarizadeh@uok.ac.ir)

²M.Sc in Cellular and Molecular Biology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

³Associated Professor of Microbiology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran