فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره۳، پیاپی ۷۳، پاییز ۱۴۰۱، ص ۶۱ - ۴۱
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.35, No.3, Sering.72, Fall 2022, p. 41- 61
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۹
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
doi:22051/JAB.2021.34309.1398

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

مسعود حیدری زاده*[۱]، مهدیه همتی[۲]، مراحم آشنگرف[۳]

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 پاتوژن‌های 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، وربنون، بورنیل استات، کامفور، کامفن، کاریوفیلن، ال- بورنیول، لیمونن، بتامیرسین، بتاپینن ترکیبات اصلی عصاره و آلفا-پینن، کامفور، بورنیل استات، اوکالیپتول، کامفن، کاریوفیلن، 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 می‌باشد.

مهارکنندگی تقریبا یکسان اسانس در برابر این سه سویه بوده و توانایی مهارکنندگی عصاره در برابر پاتوژن‌های انسانی بطور معنی‌دار بیشتر از پاتوژن‌های گیاهی است. می‌توان از عصاره و اسانس گیاه رزماری به عنوان راهکاری برای کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی و انسانی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: آلفاپینن، اثرات ضد باکتریایی، مهارکنندگی، کافور

مقدمه

گیاهان دارویی به عنوان یک ظرفیت بسیار ارزشمند برای تولید بسیاری از داروها، آفت‌کش‌ها و نگهدارنده‌های طبیعی در فرآورده‌های غذایی، جایگزین مناسبی برای فرآورده‌های شیمیایی آسیب رسان و با عوارض جانبی متعدد هستند. گیاهان زیادی به دلیل ویژگی‌های ضدمیکروبی آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) گیاهی دارویی از خانواده Lamiaceae است که به طور گسترده در سراسر جهان کشت می‌شود (شکل۱). اخیرا استفاده از برخی گیاهان دارویی مانند رزماری و اسطوخدوس 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 متابولیت‌های 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 بیماری‌های باکتریایی در انسان و همچنین در گیاهان در حال افزایش است. بیماری‌های ناشی از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی تهدیدی برای امنیت غذایی جهانی هستند. Xanthomonas یک جنس بزرگ از باکتری‌های گرم منفی است که باعث ایجاد بیماری در چندین گیاه شده و موجب تلفات قابل توجهی در بهره‌وری و کیفیت برداشت می‌شوند (Bajpai *et al*. 2011). لکه برگ باکتریایی (Bacterial leaf spot (BLS ناشی از *Xanthomonas campestris pv* و یکی از بیماری‌های مهم اقتصادی کاهو است. اولین نشانه‌های BLS عموما در حاشیه برگ ظاهر و منجر به تشکیل بافت آبکی می‌شود که در نهایت به بافت نکروتیک تبدیل می‌شود. بنابراین علائم BLS بر ارزش بازاری، کاهش کیفیت و افزایش تلفات پس از برداشت کاهو تأثیر می‌گذارد. کنترل BLS کاهو بسیار دشوار است زیرا تعداد کمی آفت‌کش 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 O_{157}:H_7 موجب مسمویت 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 برگ‌های 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 گونه‌های مختلف باکتریایی از طریق اندازه‌گیری 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 غلظت‌های مختلف عصاره و اسانس برگ رزماری استفاده شد.

جدول ۱- ویژگیها و بیماریزایی سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در آزمایش اثرات ضدمیکروبی

Table 1- Characteristics and pathogenicity of bacterial strains used in antimicrobial testing

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

مواد و روش‌ها

روش عصاره گیری از رزماری (*Rosmarinus Officinalis*)

برگ رزماری در فصل رویشی سال ۹۶ از محوطه دانشگاه کردستان، سنندج در موقعیت (N & °۴۶°،۹۹'،۷۲" E "°۳۵°،۲۷'،۸۳") با ارتفاع ۱۵۱۲ متر از سطح دریا جمع‌آوری شد. بعد از شستشوی کامل در سایه خشک و برگ‌های گیاه آسیاب شده و با نسبت ۱۰ گرم در ۱۰۰ سی‌سی متانول خالص (Merck) به روش سوکسله عصاره‌گیری شد. عصاره‌ها به کمک دستگاه تقطیر دوار (مدل Tecan sunrise) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شده، برای حذف کامل حلال، عصاره در یک ظرف شیشه‌ای و در زیر هود قرار داده شده تا حلال به طور کامل تبخیر شود. سپس از رسوب باقیمانده

غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۵۰،۷۵، 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 سی‌سی 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 پیشنهادهای 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 جرمیGC/MS فوق‌سریع Agilent مدلcA ۷۸۹ متصل به طیف-سنج جرمی با ستون HP_5 به طول ۳۰ متر قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون مورداستفاده 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 ترانسفرلاین ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل مورداستفاده قرارگرفت (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،۷۵، ۲۵، 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، *اشریشیا کلی* IBRC-M 10871، *زانتوموناس کامپستریس* IBRC-M 10644 و *سودوموناس سیرینگه* IBRC-M 10702) با کدورت معادل نیم مک فارلند (۱/۵× ۱۰^{۸} cfu/ml) (۱/۵× ۱۰^{۸}) 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 آماده‌سازی محیط کشت و استریل کردن آن و قبل از سرد شدن کامل، حدود۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت در پلیت های استریل ریخته شد. از عصاره متانولی برگ گیاه رزماری، غلظت های هیدروالکلی مختلف (۱۰۰، ۵۰،۷۵، 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 غلظت‌های مختلف عصاره و کنترل منفی قرار داده شدند. از سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند به صورت کشت چمنی یکنواخت کشت داده شدند. دیسک‌ها به مدت ۵ دقیقه از غلظت‌ها بیرون آورده شدند تا آب اضافی آن‌ها تبخیر و خشک شود. سپس، با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح محیط کشت قرار داده شدند. پلیت‌های 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 میلی‌متر است (Haidarizadeh *et al.* 2020).

(درصد) $RIZD = (IZD_{zon\ diameter} - IZD_{negative\ control}) / IZD_{zon\ diameter}$

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

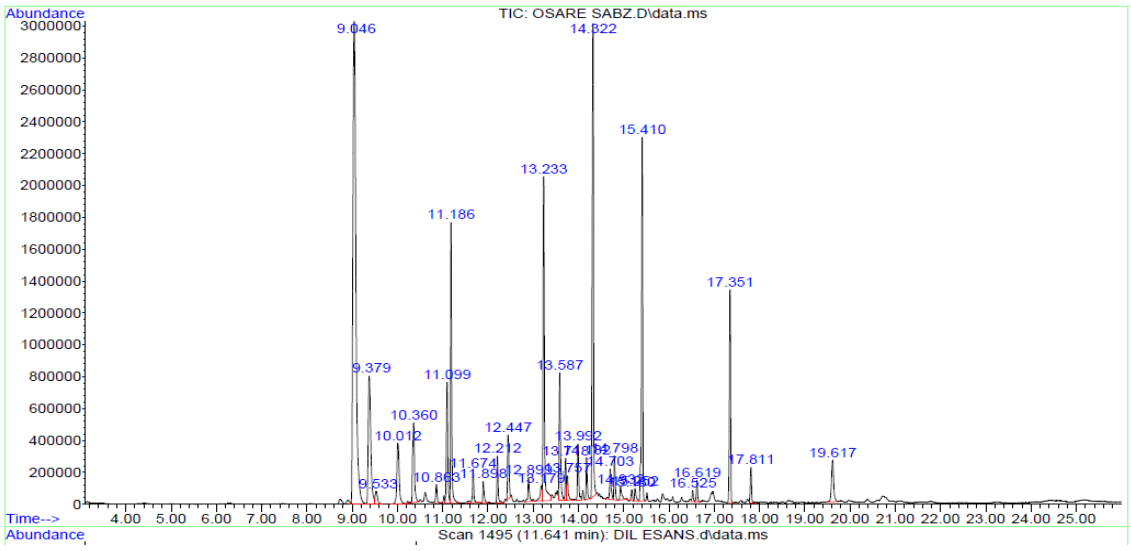
آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC)

برای انجام آزمون MIC از محیط لوریا برتانی براث Luria Bertani broth در میکروپلیت ۹۶ خانه و همچنین غلظت‌های مختلفی از عصاره و اسانس استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده (با تراکم ۰/۵ مک فارلند) به چاهک‌های الایزا حاوی ۱۴۰ میکرولیتر لوریا برتانی براث شامل غلظت‌های 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. کلرامفیکل 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) .

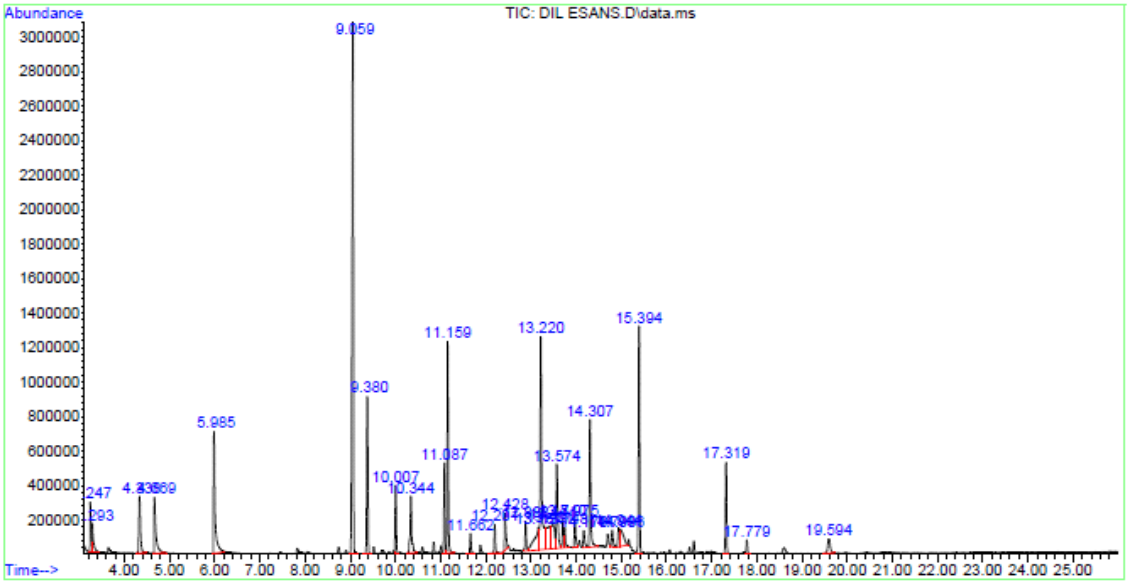
نتایج و بحث

نتایج حاصل از GC – Mass در نمودار شکل۲ دیاگرام به دست آمده از آنالیز GC-Mass عصاره متانولی رزماری و در نمودار شکل ۳ آنالیز اسانس رزماری نشان داده شده است.



شکل۲ – 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 درعصاره 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	./۴۹۲	beta. Terpineol, 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	$C_9H_{16}O$	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)

۱۵	$C_{10}H_{16}O$	۱۳/۲۳۳	۷/۸۰۰	Camphor, (1R,4R)-(+)-
۱۶	$C_{10}H_{18}O$	۱۳/۵۸۷	۳/۳۱۸	.L-borneol
۱۷	$C_{10}H_{16}O$	۱۳/۷۱۸	۰/۸۹۳	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one, 2,6,6-trimethyl, (1.alpha.2.beta.5.alpha.)-
۱۸	$C_{10}H_{18}O$	۱۳/۷۵۷	۰/۶۱۴	Terpineol
۱۹	$C_{10}H_{18}O$	۱۳/۹۹۲	۱/۳۷۶	p-menth-1-en-8-ol
۲۰	$C_{10}H_{18}O$	۱۴/۱۸۲	۰/۹۲۳	3-Cyclopentene-1-ethanol, 2,2,4-trimethyl-
۲۱	$C_{10}H_{14}O$	۱۴/۳۲۲	۱۱/۹۴۴	Verbenone
۲۲	$C_{10}H_{18}O$	۱۴/۷۰۳	۰/۸۶۶	Bicyclo[4.1.0]heptan-3-ol, 4,7,7-trimethyl, (1.alpha.3.alpha.4.alpha.6.alpha.)-
۲۳	$C_{12}H_{20}O_2$	۱۴/۷۹۸	۱/۰۱۳	Bicyclo[3.1.1]heptane-2-methanol, 6,6-dimethyl, acetate
۲۴	C10H18O	۱۴/۹۳۲	۰/۴۳۰	Nerol
۲۵	$C_{11}H_{18}O_2$	۱۵/۱۸۰	۰/۲۲۱	3,6-Octadienoic acid, 3,7-dimethyl, methyl ester, (Z)-
۲۶	$C_{10}H_{14}O$	۱۵/۲۵۲	۰/۳۴۸	2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethenyl), (S)-
۲۷	$C_{12}H_{20}O_2$	۱۵/۴۱۰	۸/۰۲۰	Bornyl acetate
۲۸	$C_{10}H_{18}O$	۱۶/۵۲۵	۰/۲۴۸	trans-Shisool
۲۹	$C_{10}H_{18}O$	۱۶/۶۱۹	۰/۵۱۰	trans-Shisool
۳۰	$C_{15}H_{24}$	۱۷/۳۵۱	۴/۷۹۵	Caryophyllene
۳۱	$C_{15}H_{24}$	۱۷/۸۱۱	۰/۸۶۰	alpha.Caryophyllene
۳۲	$C_{15}H_{24}O$	۱۹/۶۱۷	۱/۷۲۹	Caryophyllene oxide

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

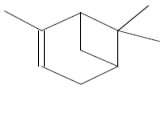
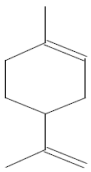
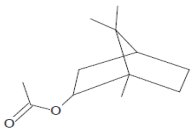
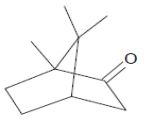
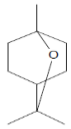
شماره پیک	فرمول مولکولی	زمان بازداری (دقیقه)	درصد (درصد)	ترکیب احتمالی
۱	$C_5H_{10}O_2$	۳/۲۴۷	۱/۳۴۹	Propanoic acid, ethyl ester
۲	$C_5H_{10}O_2$	۳/۲۹۳	۱/۱۱۳	n-Propyl acetate
۳	C_7H_8	۴/۳۳۸	۲/۵۱۱	Toluene
۴	$C_6H_{12}O_2$	۴/۶۶۹	۲/۷۰۳	Acetic acid, 2-methylpropyl ester
۵	$C_6H_{12}O_2$	۵/۹۸۵	۵/۵۷۱	Acetic acid, butyl ester
۶	$C_{10}H_{16}$	۹/۰۵۹	۲۰/۱۰۷	.alpha.Pinene
۷	$C_{10}H_{16}$	۹/۳۸۰	۴/۹۷۲	Camphene
۸	$C_{10}H_{16}$	۱۰/۰۰۷	۲/۰۸۳	.beta.-pinene
۹	$C_{10}H_{16}$	۱۰/۳۴۴	۲/۴۴۰	.beta.Myrcene
۱۰	$C_{10}H_{16}$	۱۱/۰۸۷	۲/۷۶۹	Limonene
۱۱	$C_{10}H_{18}O$	۱۱/۱۵۹	۶/۲۶۶	Eucalyptol
۱۲	$C_{10}H_{16}$	۱۱/۶۶۲	۰/۶۱۹	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
۱۳	$C_{10}H_{16}$	۱۲/۲۰۱	۰/۹۷۰	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
۱۴	$C_{10}H_{18}O$	۱۲/۴۲۸	۱/۳۵۳	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
۱۵	$C_{10}H_{14}O$	۱۲/۸۸۳	۰/۹۸۲	Bicyclo[3.1.1]hept-2-en-6-one, 2,7,7-trimethyl-

1,2,3-Propanetriol, monoacetate	۲/۸۵۷	۱۳/۱۶۷	$C_5H_{10}O_4$	۱۶
camphor	۹/۸۹۱	۱۳/۲۲۰	$C_{10}H_{16}O$	۱۷
1,2,3-Propanetriol, monoacetate	۲/۳۶۱	۱۳/۴۲۱	$C_5H_{10}O_4$	۱۸
1,2,3-Propanetriol, monoacetate	۲/۴۶۶	۱۳/۴۸۱	$C_5H_{10}O_4$	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	$C_5H_{10}O_4$	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 جدول۲ ترکیبات اصلی تشکیل دهنده عصاره رزماری شامل آلفا-پینن (۲۷/۲۷۵ درصد)، وربنون (۱۱/۹۴۴درصد)، 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.

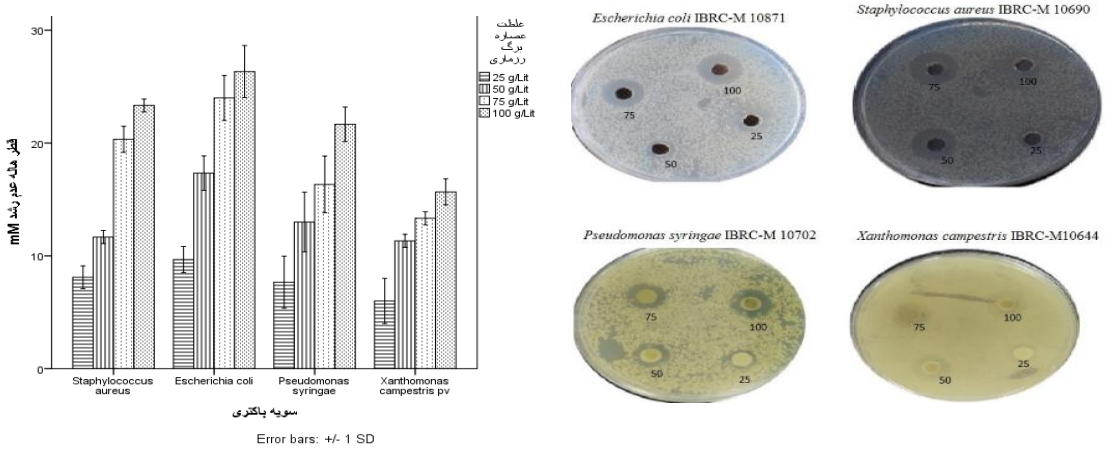
جدول ۴- مقایسه ترکیبات عصاره و اسانس رزماری

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	$C_{10}H_{16}$ (ترکیبات ترپنی، مونوترپن)	$C_{10}H_{14}O$ (ترکیبات ترپنی، مونوترپن،)	$C_{12}H_{20}O_2$ (استر)	$C_{10}H_{16}O$ (کتون)	$C_{10}H_{18}O$ (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 مهاری عصاره رزماری در برابر سویه‌های باکتریایی به روش انتشار دیسک

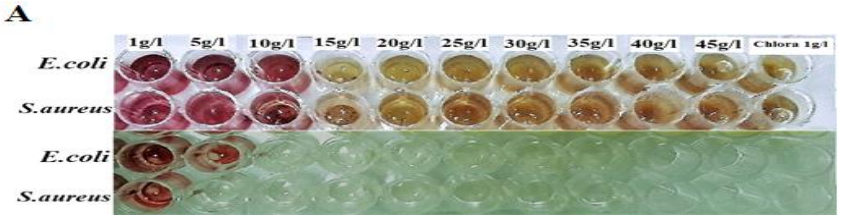
Figure 4. Inhibitory effect of rosemary extract against bacterial strains by Disk diffusion methods

شکل ۴، اثر مهاری عصاره‌ی رزماری را در برابر سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه به روش انتشار در دیسک نشان می‌دهد. نتایج به‌دست‌آمده، نشان‌دهنده‌ی اثر مهاری عصاره‌ی رزماری در برابر سویه‌های مختلف باکتری های بیماری‌زا است. در این نمودار اثر چهار غلظت (۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، گرم بر لیتر) عصاره‌ی متانولی 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. عصاره‌ی متانولی رزماری بیشترین اثر مهاری

را در برابر باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۳ تا ۲۶ میلی‌متر) نشان داد. کمترین میزان مهارکنندگی در برابر *زانتوموناس کامپستریس* (با میانگین قطر هاله عدم رشد ۷ میلی‌متر) بود. اثر مهاری در برابر سایر سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه نیز با میانگین قطر هاله عدم رشد به اندازه ۸ تا ۲۴ میلی‌متری نشان داده شد. نتایج آنالیز واریانس مقایسه میانگین‌ها 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 معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها را در مورد هر دو عامل کاملا تایید نموده و نشان می‌دهد از نظر آماری غلظت‌های مختلف عصاره متانولی برگ رزماری بر مهار رشد هر چهار باکتری مورد مطالعه اثر معنی‌دار در هر دو سطح یک درصد و پنج درصد نشان می‌دهد. آزمون تعقیبی دانکن برای گروه بندی میانگین‌ها، باکتری‌ها را در سه سطح گروه بندی می‌نماید. *اشریشیا کلی* بیشترین حساسیت و *زانتوموناس کامپستریس* بیشترین مقاومت را در برابر عصاره نشان می‌دهد. آزمون دانکن *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس سیرینگه* را در یک سطح گروه بندی می نماید. از نظر فاکتور غلظت عصاره نیز آزمون دانکن میانگین‌ها را در چهار سطح گروهبندی نموده و اثرات ضد میکروبی وابسته به غلظت عصاره برگ رزماری را تایید می‌نماید.

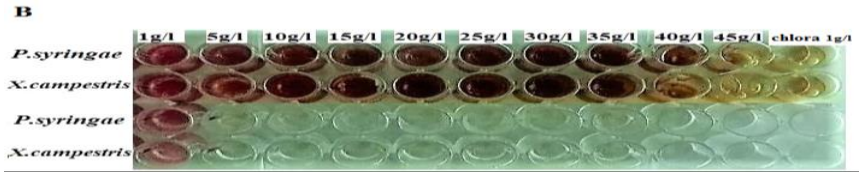
نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره و اسانس برگ رزماری

همان‌گونه که در شکل ۵ و ۶ مشخص است، هر کدام از سویه‌های 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 سویه‌های باکتریایی بیماری‌زای 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 سویه‌های باکتریایی بیماری‌زای گیاهی

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

جدول۵ - 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 *E. coli*	۱۰	۵
IBRC-M 10690 *S. aureus*	۱۰	۱
IBRC-M 10702 *P. syringae*	۴۰	۱
IBRC-M 10644 *X. campestris*	۴۰	۱

ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس و عصاره گونه‌های مختلف گیاهی با استفاده از طیف سنجی جرمی کروماتوگرافی گاز (GC-MS) در پژوهش های متعددی گزارش شده است(Hcini *et al*., 2013). در یک تحقیق سه ترکیب ا و۸ 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 او۸ سینوئل (درصد ۲۶/۵۴)،آلفا-پینن (۲۰/۱۴درصد)، کامفور (۱۲/۸۸درصد) کامفن (۱۱/۳۸درصد) ترکیبات اصلی معرفی شده‌اند (Jiang *et al*., 2011). در پژوهشی دیگر در اسانس رزماری جمع آوری شده از Ouezzane (North-West of Morocco) ۲۹ ترکیب شناسایی شده که مونوترپن‌های اکسیژنه(درصد۶۳/۷۴) و مونوترپن‌های هیدروکربن(۲۱/۲۳درصد)، شامل ۱و۸ سینوئل(درصد ۲۳/۶۷)، آلفا-پینن(۱۴/۰۷درصد)، کامفور(۱۸/۷۴درصد)و بورنیل (۵/۴۶ ۱درصد)ترکیبات اصلی معرفی شده اند (Bouyahya *et al*., 2017). نکته حائز اهمیت این است که نوع و میزان ترکیبات و به تبع آن میزان فعالیت ضدمیکروبی اسانس به محل کاشت گیاه وابسته است (Jordán *et al*. 2013).

شکل های (۲) و (۳) دیاگرام 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)، کاریوفیلن (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)، کاریوفیلن (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 می دهد که آلفا-پینن، کامفور، کامفن، اوکالیپتول، کاریوفیلن، بتاپینن، لیمونن و بورنیل استات ترکیبات عمده و شناخته شده در عصاره و اسانس رزماری هستند هرچند درصد آنها با هم متفاوت است.

هرچند 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 واریته 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، فرآورده‌های معطر و فرار نتیجه متابولیسم ثانویه یک گیاه معطر بوده و به طور معمول در سلول یا گروه های سلولی خاص تشکیل می‌شوند. اسانس‌ها عمدتا از مونوترپن‌ها، سزکوئی‌ترپن‌ها و مشتقات اکسیژنه آنها (الکل، آلدهید، استر، کتون، فنل و اکسید) تشکیل شده‌اند. اثرات ضدمیکروبی، ضدباکتریایی، ضدقارچی، آنتی‌لیشمانیا (antileishmanial)، آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره رزماری در پژوهش های متعددی ارزیابی شده است. در یک بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس رزماری در برابر سه باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اپیدرمیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس*) و سه باکتری گرم منفی (*پروتئوس ولگاریس*، *پسدوموناس ائروجینوزا* و *اشریشیا کلی*) و دو قارچ (*کاندیدا آلبیکانس* و *آسپیرژیلوس نایژر*) 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 ارگانیزم 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 و۱و 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* ۱mg/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 ۱۶/۶۷میلی‌متر 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 *اشرشیاکلی* 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). ا و۸ 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 کاملا درک نشده است، اما تصور می‌شود که اختلال غشایی توسط ترکیبات لیپوفیلی را شامل شود (Chudasama & Thaker, 2012). این ترکیبات عوامل ضدمیکروبی 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). پاتووارهای 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 تست‌های گیاهچه شد. بنابراین، روغن‌های اکالیپتوس و رزماری را می‌توان 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 ۱،۸- سینئول، خصوصا در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد. به نظر می رسد روغن‌های اسانسی در غلظت‌های پایین به سطح باکتری‌ها متصل شده‌اند و با افزایش غلظت، دیواره‌های سلولی به تدریج آسیب دیده و سپس محتوای سلولی به بیرون نشت پیدا کرده است. این تفاوت ها در حساسیت میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش به نمونه‌های آزمایشی می‌تواند به تغییر در میزان نفوذ نمونه‌ها از دیواره سلولی و ساختار غشای سلولی نسبت داده شود (Jiang *et al*. 2011). نتایج این مطالعه نیز با یافته‌های قبلی مطابقت دارد که نشان داده شده است که عصاره رزماری در غلظت‌های مختلف به روش چاهک، بر روی رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی اثر بازدارنده دارد. با افزایش غلظت، قطر هاله عدم رشد نیز افزایش می‌یابد 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 پاتوژن‌های انسانی در مقایسه با پاتوژن‌های گیاهی نشان داده است.

میزان MIC اسانس رزماری بر روی سویه های مورد مطالعه در این تحقیق در مورد *اشرشیاکلی* پنج میلی‌گرم بر میلی لیتر بوده و 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 در یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده و نشان دهنده توانایی مهارکنندگی تقریبا یکسان اسانس در برابر این سه سویه است. میزان MIC عصاره رزماری بر روی سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در مورد *اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس* یکسان و برابر و ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. در مورد دیگر سویه ها یعنی، *سودوموناس سیرینگه و زانتوموناس کمپستریس* نیز حداقل غلظت مهارکنندگی یکسان و برابر و در محدوده ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که نشان دهنده توانایی مهار کنندگی تقریبا 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 در این بررسی با توجه به نتایج حاصل از دیسک و همچنین تعیین MIC (جدول ۴) می‌توان 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 باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس* نشان می‌دهد 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 بیماری های 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 پاتوژن های گیاهی و سازگار با محیط زیست باشد. پیشنهاد می‌شود اثرگذاری و اثر ضد قارچی اسانس و عصاره رزماری بر انواع بیشتری از باکتری‌های بیماری زای 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 حلقه ایی، 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 ویژگی های آللوپاتی، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی دارند. تفاوت قابل توجهی در درصد و نوع ترکیبات شناسایی شده در اسانس و عصاره رزماری مشاهده می شود که این تفاوت می تواند به روش های 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 غلظت های کم و هم در غلظت های زیاد عصاره رزماری بیشترین اثر مهاری را در برابر *اشرشیاکلی* نشان داد. در مقابل هم در غلظت های 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 سویه های 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 تقریبا 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 تقریبا 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، ضدویروسی، ضدآفات و ضدحشرات، بررسی شده و در نهایت این اثرات ضد میکروبی در مرحله بالینی ارزیابی و زمینه ساخت و سنتز آنتی بیوتیک های 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 pathovars. 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., Talbaui, 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, CJ. 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, BelkumA. 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. Hemati[2], M. Ashengroph[3]

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*

---

1 Assistant Professor of Plant Physiology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran (* Corresponding Author: m.haidarizadeh@uok.ac.ir)
2 M.Sc in Cellular and Molecular Biology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3 Associated Professor of Microbiology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran