نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد اول، شماره چهارم، ۱۳۹۲
http://ejrr.gau.ac.ir

تعیین ترکیبات شیمیایی روغن‌های اسانسی سیر و میخک به روش گاز کروماتوگرافی و مقایسه فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها با نانو ذرات نقره و آنتی‌بیوتیک

***فرزاد قنبری[۱]، تقی قورچی[۲]، مریم ابراهیمی[۳] و سمانه اربابی[۴]**

[۱]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع‌طبیعی دانشگاه گنبدکاووس، [۲]استاد و [۴]دانش‌آموخته دکتری تخصصی گروه تغذیه دام و طیور دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]دانشجوی دکتری تخصصی گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۲/۰٤/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۰٤

چکیده

این پژوهش به‌منظور تعیین ترکیبات شیمیایی موجود در روغن‌های اسانسی سیر و میخک، و مقایسه فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها با نانو ذرات نقره و آنتی‌بیوتیک‌های رایج در دامپزشکی انجام گرفت. گیاهان سیر و میخک پس از جمع‌آوری اسانس‌گیری شدند. ترکیب شیمیایی روغن‌های اسانسی با استفاده از گاز کروماتوگرافی تعیین شد. دی‌آلیل دی‌سولفید و اوژنول به‌ترتیب با ۲۵/۵۰ و ٦۳/۳۷ درصد، بیشترین ترکیبات موجود در روغن‌های اسانسی سیر و میخک بودند. روغن‌های اسانسی سیر، میخک و نانو ذرات نقره در ۵ سطح (۰/۵۰، ۱، ۲، ٤ و ۸ میکرولیتر)، و آنتی‌بیوتیک‌های رایج در دامپزشکی به دیسک‌های کاغذی استریل تزریق شدند. دیسک‌ها بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت شده با مایع شکمبه، قرار داده شدند. بعد از ۲٤ ساعت، قطر هاله عدم رشد با ریزسنج اندازه‌گیری شد. بین تیمارهای آزمایشی در قطر هاله عدم رشد اختلاف معنی-داری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). ترکیب نئومایسین+ اکسی تتراسایکلین و اکسی تتراسایکلین به‌ترتیب با قطر هاله عدم رشد برابر با ۳۸/۰۳ و ۲۵/۰۲ میلی‌متر دارای بیشترین خاصیت ضد میکروبی بودند ($P<۰/۰۵$). قطر هاله عدم رشد حاصل از نانو ذرات نقره و روغن اسانسی میخک با غلظت ۸ میکرولیتر به‌صورت معنی‌داری بزرگتر از قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک نئومایسین بود ($P<۰/۰۵$). اثر ضدمیکروبی نانو ذرات نقره تنها در غلظت‌های ۰/۵۰ و ۸ میکرولیتر به‌صورت معنی‌داری از روغن اسانسی میخک بیشتر بود ($P<۰/۰۵$).

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، روغن اسانسی، سیر، میخک، نانو ذرات نقره، آنتی بیوتیک

*نویسنده مسئول: farzadghanbari1976@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بین نشخوارکنندگان و میکروارگانیسم‌های موجود در شکمبه آن‌ها ارتباط همزیستی وجود دارد. حیوان مواد مغذی و شرایط بهینه محیطی را برای تخمیر میکروبی خوراک فراهم کرده و در مقابل، میکروارگانیسم‌ها الیاف را تجزیه کرده و پروتئین میکروبی را سنتز می‌کنند. اما این ارتباط همزیستی، اتلاف انرژی (به‌صورت متان) و پروتئین (به‌صورت نیتروژن آمونیاکی) را به‌دنبال داشته که باعث کاهش عملکرد حیوان و آلودگی محیط زیست می‌گردد (وان نول و دیمیر، ۱۹۸۸). متخصصین تغذیه با هدف بهبود بازدهی انرژی و پروتئین در شکمبه، به‌دنبال تعدیل رقابت جمعیت‌های مختلف میکروبی هستند. یکی از راه‌کارها جهت دستیابی به این اهداف، استفاده از افزودنی‌های خوراکی در تغذیه دام می‌باشد (کالسامیگلیا و همکاران، ۲۰۰۷). آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله افزودنی‌های تجاری هستند که موجب کاهش اتلاف انرژی و پروتئین در تخمیر شکمبه‌ای می‌شوند (وان نول و دیمیر، ۱۹۸۸). مصرف این ترکیبات در تغذیه دام به‌دلیل ابقای آن‌ها در تولیدات دامی و ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مصرف‌کنندگان منع شده است. به‌همین دلیل استفاده از افزودنی‌های تجاری همانند اسیدهای آلی، آنتی‌بادی‌ها، پروبیوتیک‌ها و روغن‌های اسانسی[1] به‌منظور تعدیل تخمیر در شکمبه، مورد توجه قرار گرفته‌اند (کالسیمیگلیا و همکاران، ۲۰۰۷).

در طب سنتی، گیاهان دارویی نقش ویژه‌ای در درمان برخی بیماری‌ها داشته‌اند (سلطانی پور و همکاران، ۲۰۰٤). روغن‌های اسانسی مخلوطی از متابولیت‌های ثانویه فرار گیاه می‌باشند که طی عصاره‌گیری به روش تقطیر به‌دست می‌آیند (سلطانی پور و همکاران، ۲۰۰٤). این ترکیبات دارای فعالیت ضدمیکروبی می‌باشند. این فعالیت بسته به ماده موثر موجود در آن‌ها متفاوت می‌باشد (والرو و سالمرون، ۲۰۰۳). روغن‌های اسانسی با حساس کردن غشاها و دیواره سلولی باکتری‌ها، موجب افزایش نفوذپذیری غشاء سلول و غشاهای بیولوژیک اندامک‌های داخل سلولی می‌شوند. از این‌رو سیستم آنزیمی و تنفس سلولی باکتری دچار اختلال می‌شود (سلیکل و کاواس، ۲۰۰۸). والرو و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی فعالیت ضد باکتریایی روغن‌های اسانسی ۱۱ گیاه مختلف بر روی باکتری *باسیلوس سرئوس*[2]، گزارش کردند که اسانس گیاه آویشن بیش‌ترین تاثیر را بر این باکتری دارد. ایوانز و ساموئل (۲۰۰۲) خواص ضدمیکروبی عصاره برگ، ریشه، ساقه و گل چند گیاه را بررسی و گزارش

1- Essential oils
2- *Bacillus cereus*

Archive of SID

www.SID.ir

نمودند که عصاره گیاه کاسیا اکالیپتوس اثرکشندگی روی باکتری *سالمونلا تیفی*[1] دارد. ساریکا و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که بین آنتی‌بیوتیک فلاوومایسین و دو گیاه دارویی آویشن و سیر بر عملکرد رشد، غلظت کلسترول پلاسما، عملکرد لاشه گرم و سرد، و تعداد باکتری‌های هوازی و *اشرشیاکلی* در روده کوچک جوجه‌های گوشتی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

از سال‌ها پیش، سیر به‌عنوان یک گیاه دارویی با اثرات ضد میکروبی وسیع، مورد توجه بوده است. از مهم‌ترین خواص سیر می‌توان به فعالیت ضد میکروبی، تاثیر بر روی سیستم قلبی عروقی و سیستم ایمنی اشاره نمود (جلالی ندوشن و همکاران، ۲۰۰۷). اسانس این گیاه علیه گروه وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ‌ها، انگل‌ها و ویروس‌ها موثر می‌باشد (روتر و همکاران، ۱۹۹٦). از ترکیبات شیمیایی سیر می‌توان به ارگانوسولفور (آلئین و آلیسین)، اسیدهای آلی، کربوهیدرات‌ها و ویتامین‌ها اشاره کرد. مهم‌ترین خواص سیر مربوط به آلیسین می‌باشد. از متابولیت‌های حاصل از آلیسین می‌توان به دی‌آلیل سولفید اشاره کرد (سلطانی و همکاران، ۲۰۰۸).

روغن اسانسی گیاه میخک علیه باکتری‌های *اشرشیاکلی*[2]، *سالمونلا انتریکا*[3]، *لیستریا منوسایتوژنز*[4]، *سودوموناس فلورسنس*[5]، *سراتیا لیگوفاسینس*[6]، *بروکوتریگس ترموسفاکتا*[7]، *کارنوباکتریوم پیسیکولا*[8] و *لاکتوباسیلوس کورانتوس*[9] موثر است. عصاره اتانولی میخک علیه باکتری‌های بیماریزای گرم منفی *پروپیروموناس گینگیروالیس*[10] و *پرروتلاترمدیا*[11] موثر است (فرد من و همکاران، ۲۰۰۲).

نانو ذرات نقره خاصیت ضدباکتریایی بالایی دارند (اسکات، ۲۰۰۵). پال و همکاران (۲۰۰۷) بیان داشتند که میزان اثرات ضدمیکروبی نانو ذرات نقره به‌شکل هندسی آن بستگی دارد. در پژوهش آن‌ها نانو ذرات نقره مثلثی شکل در غلظت ۱ میکروگرم به‌طورکامل از رشد *اشرشیاکلی* جلوگیری کرد. این در حالی‌است که شکل کروی در غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم تعداد کلنی‌های *اشرشیاکلی* را کاهش داده،

1- *Salmonella typhi*
2- *E.coli*
3- *Salmonella enterica*
4- *Listeria monocytogenes*
5- *Pseudomonas flaorescens*
6- *Serratia liguefaciens*
7- *Brochothrix thermosphacta*
8- *Carnobacterium pisicola*
9- *Lactobacillus currantus*
10- *Prophyromonas gingivallis*
11- *Prerotella termedia*

Archive of SID

www.SID.ir

و در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم به‌طور کامل مانع از رشد *اشرشیاکلی* شد. نانو ذرات نقره میله‌ای شکل و نیترات نقره نسبت به دو شکل قبل دارای عملکرد خوبی نبودند. به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم نیز رشد چندین کلنی گزارش شد. چو و همکاران (۲۰۰۵) با اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی[1] به مقایسه اثر ضدمیکروبی نانو ذرات نقره و نانو ذرات پلاتین بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*[2] پرداختند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که نانو ذرات نقره به‌طور کامل مانع از رشد باکتری گرم مثبت و منفی شد. اما نانو ذرات پلاتین بر روی باکتری‌های مورد آزمایش اثری نداشتند. هدف از انجام این پژوهش تعیین ترکیبات شیمیایی روغن‌های اسانسی سیر و میخک، و مقایسه فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها با نانو ذرات نقره و آنتی‌بیوتیک‌های نئومایسین و اکسی-تتراسایکلین بود.

مواد و روش‌ها

گیاهان سیر و میخک پس از جمع‌آوری، با استفاده از دستگاه کلونجر اسانس‌گیری، و تا زمان مصرف در ظروف شیشه‌ای تیره در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نانو ذرات نقره از شرکت نانو نصب پارس تهیه شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر پس از تهیه، با تعیین میزان پودر مصرفی و حجم مایع رقیق کننده مورد نیاز، رقیق شده و محلول ذخیره‌ای آنتی‌بیوتیکی آماده گردید.

ترکیب شیمیایی روغن‌های اسانسی میخک و سیر با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی[3] تعیین شد. مشخصات دستگاه مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از: گاز حامل (فاز متحرک): گاز نیتروژن با جریان ۲۵ میلی لیتر در دقیقه؛ سوخت: گاز هیدروژن با جریان ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه و جریان هوا با سرعت ۳۰۰ میلی لیتر در دقیقه؛ ستون(فاز ثابت): ستون مویینه با نام DB-WAX و طول ۵۰ متر، قطر داخلی ۰/۳۲ میلی متر و ضخامت ۰/۲۰ میکرومتر؛ برنامه دمایی: ایزوترمال با دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد در طول آنالیز؛ دتکتور: FID و دمای دتکتور: ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد؛ دمای تزریق نمونه: ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد؛ زمان نگهداری: ۳۰ دقیقه؛ و روش آنالیز: نرمال کردن پیک کروماتوگرام. روش انجام گاز کروماتوگرافی بدین‌صورت بود که ابتدا ۱۵ قطره در یک لوله آزمایش درب‌دار ریخته

1- Minimum Inhibitory Concentration
2- *Staphiluccus aureus*
3- Gas-Chromatography (Varian, CP-3800)

Archive of SID

www.SID.ir

شد. سپس ۷ سانتی‌متر مکعب n- هگزان با درجه کروماتوگرافی گازی و ۲ سانتی‌مترمکعب پتاس متانولی ۲ مولار با درجه کروماتوگرافی گازی به آن اضافه گردید. این مخلوط به‌مدت چند ثانیه به‌شدت تکان داده شد. سپس به‌مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای ۵ ± ۵۵ درجه سانتی‌گراد در داخل بن ماری قرار گرفت. بعد از این مدت، ۳ سانتی‌مترمکعب از فاز رویی برداشته و از روی صافی حاوی سولفات سدیم خشک عبور داده شد. از نمونه صاف شده به‌مقدار ٤ میکرولیتر به دستگاه تزریق گردید (زامورا و هیدالگو، ۲۰۰٤). روغن‌های اسانسی پس از تزریق، توسط فاز متحرک وارد ستون شده و سپس در اثر حرارت، بین گاز و فاز ثابت پخش شده که ممکن است حل یا جذب گردد. با توجه به قطبی بودن ستون مورد استفاده، هر چه ماده مورد نظر قطبی‌تر باشد، نمونه دیرتر خارج می‌شود. با در نظر گرفتن زمان لازم برای خارج کردن جسم از ستون و حجم گاز مورد نیاز برای خارج کردن جسم از ستون، نمونه به‌وسیله دتکتورها ارزشیابی و مشخص گردید (زامورا و هیدالگو، ۲۰۰٤).

مایع شکمبه مورد نیاز برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی، از ۳ راس قوچ بالغ (یک‌ساله) توده نژاد زل فیستولاگذاری شده در ایستگاه تحقیقات دامپروری دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان گرفته شد. جمع آوری مایع شکمبه با استفاده از شیلنگ‌های استریلی که یک انتهای آن‌ها صافی پارچه‌ای و یک انتهای آن‌ها سرنگ ٦۰ میلی‌متری بسته شده بود، انجام می‌گرفت. مایع صاف شده شکمبه بلافاصله در ظروف سربسته کوچک استریل ریخته شده و به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شد. ترکیبات مورد بررسی در حجم‌های معین به‌عنوان گروه‌های تیماری به دیسک‌های کاغذی ٦ میلی‌متری استریل تزریق شدند. در مرحله بعدی، رقت یک دوم لوله شماره یک مک فارلند[1] انتخاب و کدورت لوله‌ی حاوی مایع شکمبه با آن مقایسه شد. از سوسپانسون تهیه شده به‌روش سطحی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار[2] کشت داده شد و در مدت ۵ دقیقه دیسک‌گذاری توسط پنس استریل و در کنار شعله انجام گرفت. فاصله دیسک‌ها با دیواره پتری‌دیش حداقل ۵ میلی‌متر و از یکدیگر حداقل ۲۵ میلی‌متر تعیین شد. پتری‌دیش‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از سپری شدن زمان لازم قطر هاله عدم رشد با ریزسنج اندازه‌گیری شد. همچنین با کشت سطحی سوسپانسون تهیه شده بر روی محیط کشت، جمعیت میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی اختیاری مایع شکمبه نیز مشخص گردید.

1- McFarland
2- Mueller hinton agar

Archive of SID

www.SID.ir

داده‌های به‌دست آمده با استفاده از طرح کاملاً تصادفی (۱۸ تیمار و ۳ تکرار) و به‌وسیله نرم افـزار آماری (۹/۱) SAS (۲۰۰۳) تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها نیز با اسـتفاده از آزمـون LSD و در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی روغن‌های اسانسی سیر و میخک: درصد ترکیبات شیمیایی شناسایی شده موجود در روغن‌های اسانسی سیر و میخک در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. در بین ترکیبات موجود در روغن اسانسی سیر، دی‌آلیل دی‌سولفید بیش‌ترین مقدار (۲۵/۵۰ درصد)، و متیل تیوپروپانول و متیل پروپیل دی‌سولفید کم‌ترین مقدار (۰/۲۰ درصد) را به خود اختصاص دادند. دی‌آلیل دی‌سولفید موثرترین ترکیب در فعالیت‌های بیولوژیکی و ضدمیکروبی سیر می‌باشد (روتر و همکاران، ۱۹۹٦؛ اوگارا و همکارن، ۲۰۰۰؛ رز و همکاران، ۲۰۰۱؛ باسکیت و همکاران، ۲۰۰۵). این ترکیب یک فرآورده حاصل از تغییر شکل آلیسین بوده که در اثر فعالیت آنزیم آلیسیناز به وجود می‌آید (مانی واساگام و همکاران، ۲۰۰۵). در پژوهش حاضر، اوژنول[1]، ٦۳/۳۷ درصد ترکیبات موجود در روغن اسانسی میخک را به خود اختصاص داده است. اوژنول (٤ آلیل-۲ متوکسی فنل) دارای فعالیت ضدباکتریایی گسترده‌ای علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد (کالسامیگلیا و همکاران، ۲۰۰۷). فعالیت بیولوژیکی و خاصیت ضدباکتریایی قوی روغن اسانسی گیاه میخک وابسته به سطوح بالای این ترکیب می‌باشد. این ترکیب فنولیکی باعث دناتوره شدن پروتئین‌ها شده و با فسفولیپیدهای دیواره سلولی واکنش داده و باعث تغییر نفوذپذیری دیواره سلولی می‌شود (ونکیانگ و همکاران، ۲۰۰۷).

فعالیت ضدمیکروبی: پس از کشت سوسپانسیون تهیه شده از مایع شکمبه (با کدورت یـک دوم لولـه شماره ۱ مک فارلند) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگـار، مشـخص شـد کـه هـر میلـی‌لیتـر ایـن سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۸}$ کلونی می‌باشد. تاثیر تیمارهای آزمایشـی بـر جمعیـت میکروارگانیسـم‌هـای بی‌هوازی اختیاری در جدول ۲ گزارش شده است. اختلاف قطر هاله عدم رشد در تیمارهای آزمایشی مختلف معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). ترکیب نئومایسین + اکسی‌تتراسایکلین (شکل ۱) بـا قطـر هالـه عـدم رشد برابر با ۳۸/۰۳ میلی‌متر دارای بیشترین خاصیت ضدمیکروبی بود ($P<۰/۰۵$). قطر هاله عدم رشد

1-Eugenol

Archive of SID

www.SID.ir

حاصل از نانو ذرات نقره و روغن اسانسی میخک با غلظت ۸ میکرولیتر (شکل۲) بزرگ‌تر از هاله عـدم رشد نئومایسین بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین اثر میکروب‌کشی نانو ذرات نقره تنها در غلظت‌های ۰/۵۰ و ۸ میکرولیتر به‌صورت معنی‌داری از روغن اسانسی میخک بیشتر بود (P<۰/۰۵)، و در غلظت‌های ۱، ۲ و ٤ میکرولیتر اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). هاله عدم رشد در تیمارهای حاوی روغن اسانسی سیر نسبت به سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری کمتـر بـود (P<۰/۰۵). بـه‌طـوری‌کـه اثـر ضدمیکروبی روغن اسانسی سیر در غلظت ۸ میکرولیتر با اثر ضد میکروبی روغن اسانسـی میخـک و نانو نقره در غلظت ۱ میکرولیتر برابر بود. این امر بیان‌کننده قدرت میکروب‌کشی کم‌تر روغن اسانسـی سیر نسبت به ترکیبات نامبرده می‌باشد. در مورد اثرات سیر، مطالعاتی در زمینـه اثـرات ضـدباکتریایی، ضدقارچی، ضدپروتوزوآیی و ضدویروسی این گیاه انجام شده است. در بیشتر موارد نیز اثـرات قابـل توجهی از فعالیت ضدمیکروبی سیر مشاهده شده است (هریس و همکاران، ۲۰۰۱).

جدول ۱- درصد ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در روغن‌های اسانسی سیر و میخک

ترکیبات سیر	مقدار (درصد)	ترکیبات میخک	مقدار (درصد)
دی‌متیل سولفید	۲/٤۰	اوژنول	٦۳/۳۷
دی‌تیوسیکلوپنتان	۰/٤۰	بتا کاریوفیلن	۱۵/۹٤
دی‌آلیل سولفید	۲/۲۰	چاویکول	۰/۱۰
متیل تیوپروپانول	۰/۲۰	فارنسول	۰/٤٤
متیل آلیل دی‌سولفید (سیس یا ترانس)	۱۱/۳۰	اوژیل استات	۱۳/۱٤
متیل پروپیل دی‌سولفید	۰/۲۰	کاریوفیلن اکساید	۱/۰۱
دی‌متیل تری‌سولفید	۲/۷۰	اسپاتونلول	۰/۸۰
دی‌آلیل دی‌سولفید	۲۵/۵۰	هونن	۲/٦۲
متیل آلیل تری‌سولفید	۱۷/٤۰		
دی‌آلیل تری‌سولفید	۱۸/۲۰		
دی‌آلیل تتراسولفید	۰/۵۰		

Archive of SID

www.SID.ir

آروا و کائور (۱۹۹۹) اثرات ضدمیکروبی گیاهان مختلف بر میکروب‌های گوناگون را مورد بررسی قرار دادند. در نتایج، اثرات باکتری‌کشی اسانس‌های سیر و میخک تنها بر باکتری *سالمونلا تیفی-موریوم*[1] مشاهده شد. چندین ساز و کار برای تشریح فعالیت ضدمیکروبی سیر پیشنهاد شده است. جلوگیری از سنتز *RNA*، *DNA* و پروتئین سلول‌ها از جمله ساز و کارهای پیشنهادی می‌باشند (فیلد برگ و همکاران، ۱۹۸۸). بیان شده است که بخش عمده‌ای از خواص ضدمیکروبی سیر مربوط به آلیسین و متابولیت‌های حاصل از آن می‌باشد. این ترکیبات فعالیت‌های ضدمیکروبی خود را از طریق مهار اختصاصی آنزیم استیل کوآنزیم آ- سنتتاز ایفا می‌کنند. مهار این آنزیم موجب مهار زیست سنتز لیپید و اسیدهای چرب شده و در نهایت باعث اختلال در قابلیت زیستی سلول می‌شود. یکی از خصوصیات مهم ترکیبات ارگانوسولفور سیر، قابلیت نفوذپذیری و عبور از طریق فسفولیپیدهای غشاء است. کیمباریس و همکاران (۲۰۰۶) بیان کردند در بین ترکیبات موجود در عصاره آبی سیر، ترکیب دی‌آلیل تیوسولفینات موثرترین ترکیب در فعالیت‌های بیولوژیکی و ضدمیکروبی سیر می‌باشد. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات آلیل‌سولفوری روغن اسانسی سیر با اضافه شدن هر اتم گوگرد افزایش می‌یابد (روتر و همکاران، ۱۹۹۶؛ اوگارا و همکارن، ۲۰۰۰؛ رز و همکاران، ۲۰۰۱؛ باسکیت و همکاران، ۲۰۰۵). در پژوهش حاضر نیز دی‌آلیل دی‌سولفید بیش‌ترین بخش ترکیبات گوگردی را در روغن اسانسی سیر تشکیل داده است. طبق نتایج این تحقیق، روغن اسانسی سیر در دزهای به‌کار رفته، دارای اثر میکروب‌کشی قابل قبول ولی کمتر از روغن اسانسی میخک بود. روغن اسانسی میخک نیز دارای فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد. ترکیب موثر موجود در روغن اسانسی میخک اوژنول می‌باشد. سطوح بالای این ترکیب در روغن اسانسی میخک باعث فعالیت بیولوژیکی و خاصیت ضدباکتریایی قوی آن می‌شود. این ترکیب فنولیکی باعث دناتوره شدن پروتئین‌ها شده و با فسفولیپیدهای دیواره سلولی واکنش می‌دهد. از این‌رو موجب تغییر در نفوذپذیری دیواره سلولی می‌شود (ونکیانگ و همکاران، ۲۰۰۷). در یک بررسی که به‌وسیله ماتان و همکاران (۲۰۰۶) انجام گرفت، اضافه کردن ٤۰۰۰ میکرولیتر روغن اسانسی میخک باعث ممانعت از رشد *آسپرژیلوس فلاوس*[2] شد. والرو و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده

1- *Salmonella typhimurium*
2- *Aspergillus flavus*

Archive of SID

www.SID.ir

کردند که اسانس میخک باعث کاهش رشد *باسیلوس سرئوس* می‌شود. از طرفی بن‌چار و همکاران (۲۰۰۷) طی مطالعه‌ای نشان دادند که ترکیبات فنولیک از جمله اوژنول، ماده موثره میخک، دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشند. این اثر به‌علت حضور گروه‌های هیدروکسیلی در ساختار فنلی آنهاست. ترکیبات با ساختار فنلی دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی علیه انواع باکتری گرم مثبت و گرم منفی هستند (دورمان و دینز، ۲۰۰۰؛ لامبرت و همکاران، ۲۰۰۱؛ کیم و همکاران، ۱۹۹۵). هیلاندر و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که تیمول و کارواکرول و اوژنول باعث کاهش تولید آدنوزین تری فسفات درون سلولی و از هم پاشیدن غشا سیتوپلاسمی *اشرشیا کلی* می‌شوند. از طرفی کارواکرول در غلظت بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر، و اوژنول در غلظت بالاتر از ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش pH شکمبه می‌شوند. از این‌رو، نتایج پژوهش اخیر مبین تأثیر منفی غلظت‌های زیاد ترکیبات فنولیک بر روند تخمیر شکمبه‌ای می‌باشد. هنگامی‌که از اسانس میخک در دزهای بهینه استفاده می‌شود، کارآیی استفاده از انرژی و پروتئین در شکمبه بهبود خواهد یافت. از طرفی این ماده به‌طور موثر دارای اثر ضدمیکروبی می‌باشد. در پژوهش حاضر، اثر ضدمیکروبی روغن اسانسی میخک با دز ۸ میکروگرم در لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر از آنتی‌بیوتیک نئومایسن بود. از طرفی این دز طبق تحقیقات هیلاندر و همکاران (۱۹۹۸) کمتر از حدی است که فرآیند تخمیر را کاهش دهد. از این‌رو می‌توان آن‌را به‌عنوان جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک نئومایسین استفاده کرد.

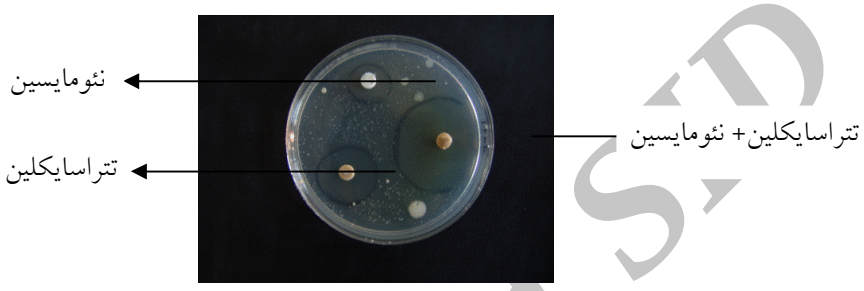
در زمان‌های گذشته، از فلز نقره به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی و ضدعفونی کننده استفاده می‌شده است. نقره در غلظت‌های کم برای سلول‌های بدن سمی نمی‌باشد. به‌نظر می‌رسد که اکسیداسیون کاتالیکی به‌وسیله فلز نقره و احیا توسط یون نقره دلیل خاصیت ضد باکتریایی آن باشد. در یک پژوهش مشاهده شد که استفاده از نانو ذرات نقره باعث توقف روند تکثیر یک نوع ویروس و جلوگیری از ایجاد اختلال در سیستم ایمنی بدن توسط آن می‌شود (پال و همکاران، ۲۰۰۷). اثر ضدباکتریایی ذرات نانوسید[۳] (ماده معدنی بر پایه نانو) بر باکتری‌های گرم منفی نیز گزارش شده است (بریگر و همکاران، ۲۰۰۲). نانو ذرات نقره باعث از دست دادن توانایی در همانندسازی *DNA* می‌شوند. همچنین بیان زیر واحدهای ریبوزومی همانند سایر پروتئین‌های سلولی و آنزیم‌های ضروری برای تولید آدنوزین تری فسفات نیز غیرفعال می‌شوند. در یک فرضیه عنوان شده است که نقره بر

1- Nanocid

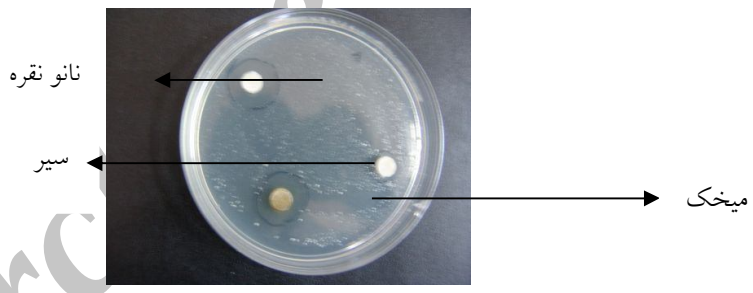
Archive of SID

www.SID.ir

عملکرد آنزیم‌های متصل به غشای داخلی میتوکندری (حاملین الکترون و آدنوزین تری فسفات سنتاز) تاثیر گذاشته و آن‌ها را غیرفعال می‌کند (پال و همکاران، ۲۰۰۷). نتایج حاصل از پژوهش حاکی از فعالیت ضدمیکروبی بالای نانو ذرات نقره بود. اما در مورد استفاده از این ترکیب نیاز به تحقیقات بیشتری است.



شکل ۱- هاله عدم رشد مربوط به آنتی بیوتیک‌ها



شکل ۲- هاله عدم رشد مربوط به روغن‌های اسانسی و نانو نقره

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه میانگین قطر هاله‌های عدم رشد مربوط به غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره، روغن اسانسی سیر، روغن اسانسی میخک و آنتی‌بیوتیک‌های رایج.

ترکیب مورد استفاده	میزان ماده موثره (میکروگرم در لیتر)	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
نئومایسین + اکسی‌تتراسایکلین	٤/۳۷ میکروگرم اکسی تتراسایکلین+ ٦/۲٥ میکروگرم نئومایسین	۳۸/۰۳ ±۰/۰٦۳[a]
اکسی تتراسایکلین	۳	۲٥/۰۲±۰/۰۰۸ [b]
نانو ذرات نقره	۸	۱٦/۹۰±۰/۰۲۰[c]
میخک	۸	۱٥/۷۸±۰/۰٦۳ [d]
نانو ذرات نقره	٤	۱٤/۷۹±۰/۰۳۰ [de]
میخک	٤	۱۳/۹۸±۰/۰٥۳[e]
نئومایسین	٥۰	۱۳/۷۲±۰/۰۳۰ [e]
نانو نقره	۲	۱۱/٦٦± ۰/۰۱٤[f]
میخک	۲	۱۱/٤٦±۰/۰۲۸ [f]
سیر	۸	۹/۰۰±۰۰/۰۳۲ [g]
نانو ذرات نقره	۱	۸/۹٦±۰/۰۲۰[g]
میخک	۱	۸/۸۳±۰/۰۱۹[g]
نانو ذرات نقره	۰/٥۰	۸/۰۳±۰/۰۰۳[gh]
میخک	۰/٥۰	٦/۹٦±۰/۰۳۰[i]
سیر	٤	٦/۸۲±۰/۰۲۸ [i]
سیر	۲	٦/٤٦±۰/۰۱٥ [ij]
سیر	۱	٥/٦۳±۰/۰۱۹ [jk]
سیر	۰/٥۰	٥/۳۰±۰/۰۲٥ [k]

اعدادی که در ستون حروف مشابه ندارند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰٥).

تشکر و قدر دانی

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر سلیمانی، مدیریت محترم شرکت گیاه اسانس گرگان، به‌دلیل همکاری صمیمانه ایشان در تهیه روغن‌های اسانسی سیر و میخک سپاسگزاری می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

Aroa, D.S. and Kaur, J. 1999. Antimicribial activity of spices. Int J Antimicrob Agents. 12: 257-262.

Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A. and Beauchemin, K.A. 2007. A review of plant-derived essential oils in rumination nutrition and production. Anim. Feed Sci. Technol. 90: 886-897.

Brigger, I., Duberent, C. and Couvreur, P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Adv. Drug Delivery Rev. 54: 631-651.

Busquet, M.S., Calsamiglia, A., Ferret, M., Carro, D. and Kamel, C. 2005. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 88: 4393-4404.

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. and Ferret, A. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 90: 2580-2595.

Celikel, N. and Kavas, G. 2008. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. Czech J. Food Sci. 3: 174-181.

Cho, K.H., Park, J.E., Osaka, T. and Park, S.G. 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. J. Electrochimica Acta. 51: 956-960.

Dorman, D.H. and Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88: 308–316.

Evans, E.O. and Samuel, A.A. 2002. Efficacy of some nupe medical plant against *salmonella typhi* an *in vitro* study. J. Ethnipharmacol. 80: 21-24.

Feldberg, R. S., Chang, S. C., Kotik, A. N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundstrom, D. C. and Thompson, N. H. 1988. *In vitro* mechanism of inihibition of bacterial cell growth by allicin. J. Antimicrob. Agents. Chem. 32: 1763-1768.

Friedman, M., Henika, P.R. and Mandrell, R.E. 2002. Bacterial activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Slmonella enterica*. J. Food Prot. 65:1545-1560.

Harris, J.C., Cottrel, S.L., Plummer, S. and Lioyd, D. 2001. Antimicrobial of *Allium sativum* (garlic). Appl. Microbiol and Biotechnol. 57: 282-286.

Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila- Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. and von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. J. Agric. Food Chem. 46: 3590–3595.

Jalali, M.R., Jafari, H., Owlia, P., Fallah, N. and Davati, A. 2008. *In vivo* antibacterial effect of garlic aqeous on *salmonella typhimurium* infected rabbits. Iran. J. Med. Aroma. Plants. 23: 453-457. (In Persian)

Archive of SID

www.SID.ir

Kim, J., Marshall, M.R. and Wei, C.I. 1995. Antibacterial activity of some essential oil compounds against five foodborne pathogens. J. Agri. Food Chem. 43: 2839–2845.

Kimbaris, A.C., Siatis, N.G., Daferera, D.J., Tarantilis, P.A., Pappas, C.S. and Polissiou, M.G. 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (Allium sativum). Ultrasonic. Sonochem. 13: 54-60.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P. and Nychas, G.J.E. 2001. A study of the minimum concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 91: 453–462.

Manivasagam, T., Subramanian, P., Suthakar, G. and Mohamed-Essa, M. 2005. The chemo preventive effect of diallyl disulphide on N-nitrosodiethylamine induced heptocarcinogenesis. J. Appl. Biomed. 3: 187-191.

Matan, M., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V. and Parker, M. 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. J. Food Microbiol. 107: 180-185.

Ogara, E.A., Hill, D.J. and Maslin, D.J. 2000. Activities of garlic oil, garlic powder, their diallyl constituents against *helicobacter pylori*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2269-2273.

Pal, S., Tak, Y.K. and Song, J.M. 2007. Does the antibacterial activity of nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 1712-1720.

Reuter, H.D., Koch, J.P. and Lawson, L. 1996. Therapeutic effects and applications of garlic and its preparation. Pages 135-212 in garlic. The science and therapeutic application of allium sativum and related species. Koch, H. P., Lawson, L. D., Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Ross, Z.M., Ogara, E.A., Hill, D.J., Sleightholme, H.V. and Maslin, D.J. 2001. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. Appl. Environ. Microbiol. 67: 475-480.

Sarica, S., Ciftica, A., Kilinc, K. and Yildirim, Y. 2005. Use of an antibiotic growth promoter and two herbal natural feed additives with and without expgenous enzymes in wheat based broiler diets. S. Afr. J. Anim. Sci. 35: 61-72.

SAS. 2003. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. SAS Institute, Cary, NC, USA.

Shahnazi, S., Khalighi, S.F., Ajeni, Y., Yazdani, D., Ahvazi, M. and Taghizadeh, R. 2007. Investigation of effect of chemical compositions and antimicrobial properties of Taleshi thyme essence. J. Med. Plants. 23: 80-85. (In Persian)

Soltani Poor, M.A., Rezaee, M.B. and Moradshahi, A. 2004. Study on antimicrobial effects of essential oil of zhumeria majdae Rech. f & Wendelbo. Iranian J. Med. and Aroma Plants. 20: 277-289. (In Persian)

Archive of SID

www.SID.ir

Soltani, M., Lari poor, M., Akhavan-Sepahi, A. and Pirali-Hamedani, M. 2008. Investigation on the effect of garlic allicin on macrophages nitric oxide verus. J. Med. Plants. 29: 164- 170. (In Persian)

Valero, M. and Salmeron, M.C. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. J. Food Microbiol. 85: 73-81.

Van nevel, C.J. and Demeyer. D.I. 1988. Manipulation of Ruman Fermentation. Pages 387-443 in the ruman microbial ecosystem. Hobson, P. N. Elsevier Applied Science New York, NY.

Wenqiang, G., Shufen, L., Ruixiang, Y., Shaokun, T. and Can, C. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. Food Chem.101: 1558-1564.

Zamora, R. and Hidalgo, F. 2004. Fatty acids, In: Food Analysis. Eds. Nalet, L. M. L. publisher by CRC press. 221-261.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 1 (4), 2014
http://ejrr.gau.ac.ir

Determination the chemical compositions of the garlic and clove essential oils by gas chromatography and compare their antimicrobial activity with nanosilver and antibiotic

***F. Ghanbari[1], T. Ghoorchi[2], M. Ebrahimi[3] and S. Arbabi[4]**
[1]Assistant Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, [2]Professor and [4]PhD Graduated, Dept. of Animal and Poultry Nutrition, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]PhD Student, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Food Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
Received: 06/07/2013; Accepted: 11/25/2013

Abstract

This experiment was conducted to determine the chemical compositions of the garlic and clove essential oils and compare their antimicrobial activity with nanosilver and current antibiotics used in veterinary medicine. The garlic and clove plants were processed for oil extraction. Chemical composition of essential oils was determined using gas chromatography. Diallyl disulfide and eugenol had the greatest contribution in the essential oil of garlic and clove, respectively (25.50 and 63.37%). Garlic and clove essential oils and nanosilver in 5 levels (0.5, 1, 2, 4 and 8 microliter) and commom antibiotics in veterinary medicine were infused into sterile 6 milimeter filter paper discs. The discs were put on muller hinton agar that cultured with rumen fluid. After 24 hours, inhibition zone diameter were measured with caliper. Differences between inhibition zone diameter of treatments were significant ($P<0.05$). Neomycin and tetracycline combination and oxy tetracycline had the highest antibacterial activity with inhibition zone diameter of 38.033 and 25.020 millimeter respectively. Inhibition zone diameter of nanosilver and clove essential oil was significantly higher than neomycin ($P<0.05$). Antibacterial effect of nanosilver versus clove essential oil was only higher in level of 0.5 and 8 ($P<0.05$).

***Keywords**:* Antimicrobial activity, Essential oil, garlic, Clove, Nano sillver, Antibiotic

*Corresponding author; farzadghanbari1976@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir