Archive of SID

بررسی تاثیر ضدمیکروبی اسانس گیاه مرزه (*Satureja hortensis* L.) بر جدایه‌های *E.coli* روده جوجه‌های گوشتی

اعظم حیدری[۱]، *محمد دخیلی رنجو[۲]، محمدرضا ذوالفقاری[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

۲. گروه قارچ شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاداسلامی واحد قم، قم، ایران

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد قم، قم، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۱۵

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر رژیم غذایی و سطوح مصرف اسانس گیاه مرزه *Satureja hortensis* L. بر جمعیت میکروبی ایلئوم و بستر جوجه‌های گوشتی، مقاومت آنتی بیوتیکی و تاثیر ضدمیکروبی اسانس در مقابل جدایه‌های اشرشیاکلی انجام گرفت. تعداد ۳۲۰ قطعه جوجه گوشتی نر سویه تجاری راس و یک روزه به طور تصادفی به ٤ گروه و ٤ تکرار (در هر تکرار ۲۰ قطعه) داخل پن‌های آزمایشی توزیع شدند. سطوح مختلف اسانس مرزه در جیره، تفاوتی بین تیمارها از نظر تعداد کل میکروب‌ها و کلی فرم‌ها ایجاد نکرد ($p>0/05$). همچنین در بررسی اثرات ۱۳ ترکیب آنتی باکتریال به روش دیسک دیفیوژن بر روی جدایه‌های *E.coli* تفاوت معنی‌دار بین دو تیمار مشاهده نگردید ($p>0/05$). بیشترین مقاومت آنتی باکتریال مربوط به پنی سیلین، ریفامپیسین و اریترومایسین مشاهده گردید. اسانس مرزه با استفاده از کروماتوگرافی گازی تجزیه‌ای (GC) مورد شناسایی قرار گرفت و مهمترین ماده موثره اسانس، گیاه کارواکرول (۳۷/۱۸ درصد) معرفی شد. در ارزیابی تأثیر ضدمیکروبی این اسانس، نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف اسانس نشان داد که اثر بازدارندگی غلظت‌های بالاتر، قوی‌تر می‌باشد. مقایسه تأثیر اسانس با آنتی بیوتیک‌های مورد آزمایش در این پژوهش نشان داد که باکتری *E.coli* در مقابل آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین، پنی سیلین و اریترومایسین مقاوم بوده، ولی اسانس مذکور روی این باکتری موثر بوده است. همچنین مشاهده گردید که تاثیر این اسانس در حجم‌های ۲µl و ۱µl مشابه اثر آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین، نئومایسین و تتراسیکلین است. در این بررسی، تست ضدمیکروبی اسانس مرزه نشان داد که این گونه از نظر مهارکنندگی رشد (MIC) و کشندگی باکتری‌های مورد نظر (MBC) بسیار قوی بوده که به دلیل وجود کارواکرول موجود در این اسانس می‌باشد.

کلمات کلیدی: اسانس مرزه، تأثیر ضدمیکروبی، جوجه‌های گوشتی، جمعیت میکروبی، *E.coli*

* *Email:Dr_dakhili@yahoo.com*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

از صنعت طیور نقش مهمی در تامین نیازهای تغذیه‌ای بشر داشته و از سال‌ها قبل تولید جوجه‌های گوشتی ۲/۲۵ کیلوگرم، ۹۰ روز زمان می‌برد، در حالی که از سال ۱۹۹۹ این زمان به ٤١ روز کاهش یافته است. این تغییرات مستلزم اصلاح ژنتیک، تغذیه بهتر و روش‌های مدیریتی کنترل بیماری‌ها می‌باشد (Apata et al., 2009).

فلور میکروبی دستگاه گوارش نقش مهمی در تغذیه، سم‌زدایی ترکیبات مشخص، رشد و حفاظت در مقابل باکتری‌های پاتوژن ایفا می‌کند. در جوجه‌ها عدم وجود میکروفلور نرمال یک فاکتور اصلی برای ایجاد عفونت باکتریایی را در بردارد (Barrow, 1992; Nurmi & Rantala, 1973).

در دستگاه گوارش، باکتری‌های مفید و همزیست با میزبان، به تدریج از بدو تولد تا زمان ایجاد حالت ثبات در فلور، شروع به تکثیر می‌کنند که می‌توانند مانع رشد غیرعادی باکتری‌های با منشاء خارجی شوند. اشرشیا کلی از باکتری‌های فلورکومنسال[1] پرندگان است. بروز مقاومت در اکثر باکتری‌های کومنسال در برابر آنتی بیوتیک‌ها ممکن است به باکتری‌های پاتوژن انتقال یابد. از این جهت این باکتری‌ها منبعی از ژن‌های مقاوم برای باکتری‌های پاتوژن را تشکیل می‌دهند (Horosova & Bujnakova, 2006; Mcewen & Fedorka-Cray, 2003).

*E.coli*های مقاوم به آنتی بیوتیک از طریق غذا یا تماس مستقیم با حیوان به انسان منتقل می‌شوند و ممکن است سبب مقاومت آنتی بیوتیکی در انسان‌ها نیز باشند (Gross, 1994; Doetkott et al., 1996).

امروزه در پی افزایش این مقاومت میکروبی و هزینه‌های سنگین درمان بیماری، محققین در پی یافتن ترکیباتی هستند که بتوانند آنها را جایگزین آنتی بیوتیک‌ها در رژیم غذایی دام و طیور نمایند. تحقیقات نشان می‌دهد که افزودنی‌های گیاهی باعث افزایش ترشحات معده، تحریک گردش خون و تسریع اسمز سلولی در باکتری‌های بیماری‌زا می‌شوند. همچنین ثابت شده است، برخی از اسانس‌های گیاهی دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی متعددی هستند (Kalemba & Kunicka, 2003).

جنس مرزه با نام علمی *Satureja hortensis* L. «مرزه تابستانی» از تیره نعناعیان به شمار می‌رود. ترکیب‌های عمده اسانس مرزه شامل کارواکرول، تیمول، گاماترپینن و پاراسیمن گزارش شد (Adiguzel, 2007). با توجه به تحقیقات قبلی و بالا بودن میزان ترکیب فنلی کارواکرول در اسانس این گونه، در این تحقیق اثر ضدمیکروبی اسانس آن مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

این آزمایش با استفاده از ۳۲۰ قطعه جوجه نر گوشتی یک روزه سویه تجاری راس ۳۰۸ انجام شد. یک جیره پایه بر اساس توصیه جداول NRC در سال ۱۹۹٤ برای سن یک تا ٤٢ روزگی تهیه و تنظیم شد. افزودنی اسانس مرزه (تهیه شده توسط شرکت باریج اسانس کاشان) به نسبت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ ppm به آب آشامیدنی افزوده شد.

هر یک از این ٤ تیمار آزمایشی به ٤ تکرار و به هر تکرار، تعداد ۲۰ قطعه جوجه خروس اختصاص یافت. نسبت‌های فوق به طور روزانه تهیه شده و در اختیار جوجه‌ها قرار می‌گرفت. ترکیب جیره پایه در جدول ۱ گزارش شده است. پرندگان به مدت ٤٢ روز، روی بستر پرورش داده شدند و طی این مدت هیچ گونه آنتی بیوتیک یا کوکسیدیو استاتی مصرف نکردند. در طول مدت آزمایش آب و خوراک به صورت آزاد در اختیار پرندگان قرار داده شد. توزین مقدار خوراک و اندازه‌گیری وزن بدن جوجه‌ها به صورت هفتگی انجام شد.

[1] Commensal

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: فرمول جیره‌های غذایی و ترکیب مواد مغذی موجود در جیره‌ها

مواد خوراکی / دوره	درصد/واحد	
	آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی)	پایانی (۲۱ تا ٤۲ روزگی)
ذرت	۵۳/۸	٦۰/۷۰
سویا	۳۸/۷	۳۲/۲۰
روغن سویا	۳	۳
کربنات کلسیم	۱/٦۳	۲/۰۳
دی کلسیم فسفات	۱/۷۲	۱/۱۳
مکمل (ویتامین + املاح)[1]	۰/۵	۰/۵
نمک	۰/٤٤	۰/۲۳
متیونین	۰/۱٤	۰/۰٦
لیزین	۰/۰۷	۰/۰۵
انرژی قابل متابولیسم(Kcal/Kg)	۳۰۰۰	۳۰۵۵
پروتئین خام	۲۱/۵٤	۱۹/۰۹
کلسیم	۰/۹۳	۰/۸۵
فسفر	۰/٤۵	۰/۳۳
نسبت کلسیم به فسفر	۲/۰۷	۲/۵۷
نسبت انرژی به پروتئین	۱۳۹/۲۷	۱٦۰/۰۳

۱. هر کیلوگرم مکمل دارای ۱۰۰۰۰۰۰IU ویتامین A، IU ۳۰۰۰۰۰ ویتامین D۳، IU ۲۰۰۰ ویتامین K، ۳۰۰میلی گرم ویتامین B۱، ۲۵۰ میلی گرم ویتامین B۲، ۸۰۰ میلی گرم ویتامین B۳، ۲۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B۵، ۱۰۰۰میلی‌گرم ویتامین B٦، ۲ میلی‌گرم ویتامین B۱۲، ۵۰ گرم کولین کلراید، ۵ /۱۲گرم آنتی اکسیدان، ۱۰ میلی‌گرم منگنز، ٦ میلی‌گرم روی، ٤ میلی‌گرم آهن، ۰/۵ میلی‌گرم مس، ۵ میلی‌گرم منیزیم، ۱۰ میلی‌گرم پتاسیم، ۰/۱ میلی‌گرم کبالت، ۰/۱ میلی‌گرم سلنیم و ۰/۰۵ میلی گرم ید بود.

اسانس‌گیری و مشخصات دستگاه GC

اسانس گیاه مرزه به روش تقطیر با آب (طرح کلونجر) تهیه و ترکیب عمده این اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مشخص شد. دستگاه GC از نوع مدل Varian CP 3800با ستونی به طول ٦۰ متر، قطر داخلی ۳۲۰ میکرومتر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر است. برنامه‌های دمایی نیز ۵۰ تا ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی ۳ درجه در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۳۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. دتکتور مورد استفاده در دستگاه GC از نوع FID بوده و دمای آن در ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده است. از گاز نیتروژن به عنوان گاز حامل استفاده شده که فشار ورودی آن به ستون برابر ۷ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع تنظیم شده است.

نمونه‌گیری از محتویات مدفوعی و ایلئوم

نمونه‌گیری از محتویات مدفوع جوجه‌ها در سن ۳۲ روزگی، از هر واحد ۱ نمونه به اندازه ۱۰ گرم صورت گرفت و هر کدام در ظروف استریل برای انتقال به آزمایشگاه نگهداری شدند. در سن ٤۲ روزگی دو جوجه از هر تکرار انتخاب شده و پس از کشتار پرندگان، به کمک پنس گیره دار و قیچی استریل، بخشی از میانه ایلئوم، با توجه به مکان زایده مکل[1] و روده‌های کور، جدا و محتویات

[1] Meckeldivertieulum

www.SID.ir

Archive of SID

آن به درون ظروف پلاستیکی کوچک دربدار منتقل شدند. بعد از جمعآوری، تمام نمونهها به آزمایشگاه برای انجام آزمایشات منتقل شد (Gunal et al., 2006).

تعیین جمعیت میکروبی بستر و ایلئوم

محتویات ظروف با یک میلی لیتر سرم فیزیولوژیک حل و هموژنیزه گردید و ۵ میکرولیتر از آنها با محیط آگار خون دار (Blood Agar) و یا ائوزین متیلن بلو (EMB) مخلوط سپس پلیتها به مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. شمارش باکتریایی بر اساس واحد کلنی تشکیل یافته Colony Forming Unit (CFU) در هر گرم نمونه ذکر گردید (Gunal et al., 2006).

مطالعات باکتریشناسی و مقاومت دارویی (Drug Resistance)

برای بررسی باکتری اشرشیا کلی از تستهای بیوشیمیایی استفاده شد. سپس جهت تعیین حساسیت جدایهها نسبت به داروهای آنتی بیوتیکی روش دیسک دیفیوژن، بر اساس روش استاندارد Kirby–Bauer و بر روی محیط آگار دار مولرهینتون مورد استفاده قرار گرفت و نتایج با نمونه شاهد مقایسه شد (Buchanan & Gibbons, 1974).

۱۳ عامل آنتی باکتریال مورد آزمایش و غلظت بالقوه آنها و بر حسب میکروگرم عبارت بودند از: کلرامفنیکل (۳۰)، اریترومایسین (۱۵)، جنتامایسین (۱۰)، استرپتومایسین (۱۰)، سیپروفلوکساسین (۵)، تتراسیکلین (۳۰)، پنی سیلین (۱۰)، نورفلوکساسین (۱۰)، ریفامپیسین (۵)، نئومایسین (۳۰)، سفیکسین (۵)، آمپی سیلین (۱۰) و کانامایسین (۲۰).

دادههای آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی توسط نرمافزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگینها از طریق آزمون چند دامنهای دانکن در سطح آماری ۵ درصد مقایسه شدند (Duncan, 1955).

بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس

تعیین قطر هاله عدم رشد به وسیله روش دیسک دیفیوژن

برای تعیین اثر ضدمیکروبی، حجمهای مشخصی از اسانس مرزه (جدول ٤) را به دیسکهای استریل بلانک اضافه کرده و پس از کشت باکتریها، دیسکها را روی محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده و سپس این مجموعه را در انکوباتور با دمای مناسب گذارده و بعد از گذشت مدت زمان لازم برای رشد میکروارگانیسمها (۲٤ساعت) آنها را بیرون آورده و میزان قسط هاله عدم رشد توسط خط کش میلیمتری اندازهگیری شد.

تعیین MIC[1] (حداقل غلظت مهار کنندگی رشد) و MBC[2] (حداقل غلظت کشندگی)

جهت تعیین حساسیت ضدمیکروبی اسانس، با استفاده از رقیقسازی لولهای، ابتدا یک میلیلیتر محیط مولر هینتون براث به لولههای آزمایش اضافه و اتوکلاو گردیدند سپس از سوسپانسیون باکتریهای مورد بررسی با رقت معادل استاندارد شماره ۰/۵ مک فارلند ۵۰ میکرولیتر به هر یک از لولههای آزمایش افزوده شد. در مرحله بعد از محلولهای استوک تهیه شده از اسانس توسط حلال دی متیل سولفوکساید ۲درصد مقدار یک میلیلیتر برداشته و طبق روش Broth dilution به محتویات لولههای آزمایش اضافه شد. پس از اضافه کردن غلظتهای مورد نظر اسانس به لولههای آزمایش و قرار دادن آنها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت، اولین لولهای که درآن رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و اولین لولهای که در آن رشدی بر روی محیط جامد ایجاد نکرد به عنوان حاقل غلظت کشنده (MBC) گزارش شد (Kalemba & Kunicka, 2003).

[1] Minimum Inhibitory Concentration
[2] Minimum Bactericide Concentration

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

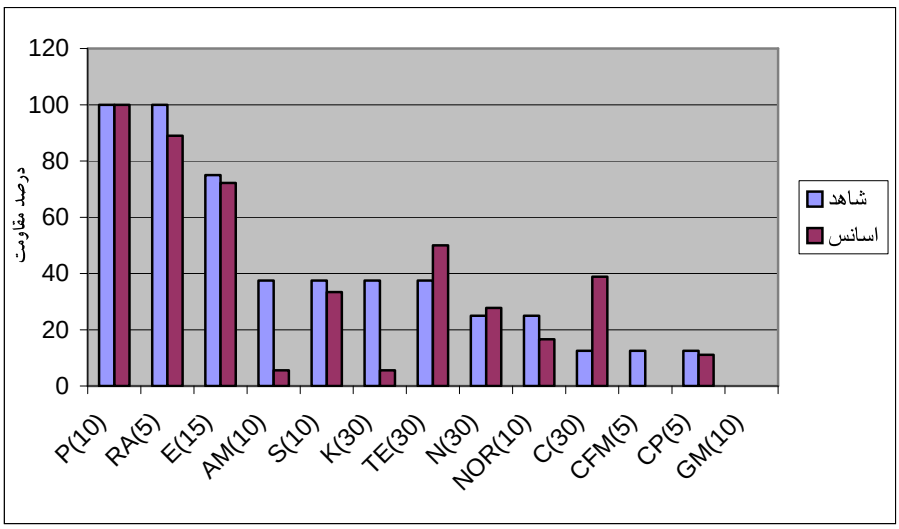
مهمترین ماده موثره شناسایی شده در اسانس *S.hortensis* با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی تجزیه‌ای (GC)، کارواکرول (۳۷/۱۸ درصد) گزارش گردید.

نتایج شمارش جمعیت کل باکتری‌ها و کلی فرم‌ها در نمونه‌های گرفته شده از ایلئوم وبستر، در جدول ۲ آورده شده است. در این مورد همان طور که مشاهده می‌شود، سطوح مختلف اسانس در جیره، تفاوتی بین تیمارها از نظر تعداد کل میکروب‌ها و کلی فرم‌ها ایجاد نکرد ($p>۰/۰۵$).

با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی ۱۸ سویه باکتری اشرشیا کلی از تیمارهای دریافت کننده اسانس و ۸ سویه از نمونه‌های شاهد بدست آمد. این ایزوله‌ها به همراه سوش استاندارد *Escherichia coli* ATCC 25922 برای آزمایشات بعدی به همراه محلول گلیسرول ۵۰ درصد در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نتایج بدست آمده از درصد مقاومت و هاله عدم رشد جدایه‌های اشرشیا کلی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد آزمایش در شکل ۱ و جدول ۳ دیده می‌شود. در مطالعه حاضر هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری از لحاظ درصد مقاومت و هاله عدم رشد بین تیمارها مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

با بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس *S.hortensis*، نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و آزمون‌های MIC و MBC تعدادی از ایزوله‌ها و سوش استاندارد *E.coli* ATCC 25922 به صورت میانگین در جداول ٤ و ٥ آورده شده است.



شکل ۱: درصد مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مصرفی

P(10) = پنی سیلین، RA(5) = ریفامپیسین، E(15) = اریترومایسین، AM(10) = آمپی سیلین،
S(10) = استرپتومایسین، K(30) = کانامایسین، TE(30) = تتراسیکلین، N(30) = نئومایسین،
NOR(10) = نورفلوکساسین، C(30) = کلرامفنیکل، CFM(5) = سفیکسین، CP(5) = پیروفلوکساسین،
GM(10)= جنتامایسین

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: تأثیر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروبی بستر وایلئوم (log cfu)

اسانس مرزه (ppm)	بستر		ایلئوم	
	جمعیت کل	باکتری‌های کلی فرم	جمعیت کل	باکتری‌های کلی فرم
۱- ۰ppm	۱۱/٤۱±۰/۹۱	۵/۲۲±۳/٦۱	۱۲/۸۱±۰/۷۸	٦/۷٦±۱/٦۵
۲- ۵۰ppm	۱۱/۲۰±۱/۵٤	۵/٦۸±۳/۸۲	۱۱/۸۰±۲/۱۷	٦/۷۸±۰/۸۷
۳- ۱۰۰ ppm	۱۰/۳۲±۱/۱۸	۳/٤٦±٤/۰۱	۱۱/٦۸±۲/۱۷	٤/۰۰±٤/٦۳
٤- ۱۵۰ ppm	۱۱/٦٦±۰/۸۸	۳/۸۱±٤/٤۰	۱۱/۵۸±۰/۸۰	۳/۰٤±۳/۵۵

۱- میانگین ± انحراف معیار

۲- میانگین‌های قرار گرفته در هر ستون، اختلاف معنی داری ندارد ($p>0/05$)

جدول ۳: متوسط قطر هاله‌های عدم رشد آنتی بیوتیک‌های مختلف بر حسب mm

آنتی بیوتیک	تیمار	قطر هاله عدم رشد
آمپی سیلین	شاهد	**۱٦/۳±۵/۰۲
	Eos*	۱۵/۰±۳/٦۷
نورفلوکساسین	شاهد	۲۵/۲±٦/۳۵
	EOs	۲٦/٤±۱۱/۱۰
جنتامایسین	شاهد	۱۹/٦±۲/۲۳
	EOs	۲۰/۵±۱/۵۳
استرپتومایسین	شاهد	۱۲/۲±۷/۳٦
	EOs	۱۲/۲±۳/۹۲
نئومایسین	شاهد	۱۰/۸±٦/٤۱
	EOs	۱۳/۲±٤/٦٤
پنی سیلین	شاهد	-
	EOs	-
ریفامپیسین	شاهد	-
	EOs	±
سفیکسین	شاهد	۱۹/۸±۲/۸۵
	EOs	۲۱/۲±۲/۵۹
کانامایسین	شاهد	۱۳/٦±۸/۵۷
	EOs	۱۸/۳±٤/٦٦
کلرا مفنیکل	شاهد	۲۱/۲±۸/۷۵
	EOs	۱۵/٤±۱۱/٦۱
تتراسیکلین	شاهد	۱٤±۸/۷۷
	EOs	۱۰/۹±۹/٤٦
اریترومایسین	شاهد	-
	EOs	۳/۳±
سیپروفلوکساسین	شاهد	۲٤/٦±۷/۹۹
	EOs	۲٦/٦±۳/۰۲

* EOs تیمار دریافت کننده اسانس مرزه (*Satureja* essential oil)

** میانگین±انحراف معیار (SEM)

میانگین‌های قرار گرفته در جدول، اختلاف معنی داری ندارد ($p>0/05$)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤: متوسط قطر هاله‌های عدم رشد مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس گیاه *S. hortensis* بر حسب mm

سوسپانسیون E.coli	۰/۵ µL	۱µL	۲ µL	۵µL
E.coli ATCC 25922	۹/٦٦±۰/٤۷	۱۳/۰±۱/٤۱	۱۵/۳±۱/۸۸	۱۹/٦±۲/۲۳
جدایه‌های فارم	۸/٦۰±۳/۹۹	۱۳/۵±۲/۱٤	۱۸/۲±۵/٤۸	۲٤/٦±۷/۹۹

جدول ۵: میزان MIC و MBC اسانس گیاه *Satureja hortensis*

سوسپانسیون *E.coli*	MIC(µl/ml)	MBC(µl/ml)
E.coli ATCC 25922	۲/۵	۵
جدایه‌های فارم	۱/۲۵	>۲/۵

بحث

در این تحقیق برای اولین بار اثر اسانس *S. hortensis* بر جمعیت میکروبی ایلئوم در شرایط invivo و جدایه‌های *E.coli* در شرایط invitro در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های رایج در دامپزشکی مورد بررسی قرار گرفت. مصرف اسانس مرزه در این مطالعه تفاوتی بین تیمارها از نظر تعداد کل میکروب‌ها و کلی فرم‌ها در محتویات ایلئوم و بستر ایجاد نکرد (p>۰/۰۵).

در عین حال مطالعات زیادی در زمینه تاثیر جیره‌های حاوی گیاهان دارویی و روغن‌های فرار گیاهی بر بار جمعیت میکروبی دستگاه گوارش طیور صورت گرفته است و نشان داده‌اند که اسانس‌ها نقش شاخص و عملکردی مهمی در تغییر و اصلاح میکرو فلور روده‌ای و کلونیزاسیون باکتری‌های پاتوژن ایفا می‌کنند (Betancourt, 1989; Jamroz & Kamel, 2002).

Namkung و همکاران در سال ۲۰۰٤ نشان دادند که مخلوطی از روغن‌های ضروری مرزنجوش، دارچین و آویشن از رشد کلی فرم‌ها جلوگیری به عمل می‌آورد (Namkung et al., 2004).

گزارشاتی مبنی بر اثرات مفید اسانس مرزنجوش بر بار جمعیت کل باکتریایی روده و پاتوژن‌های خاص مانند سالمونلا وجود دارد (Aksit et al., 2006).

در مطالعه‌ای با استفاده از ۰/۱، ۰/۵ و ۱درصد مکمل آویشن در جیره مرغ‌های تخم‌گذار، گروه کنترل و گروه ۱ درصد آویشن، بالاترین شمارش *E.coli* را در مدفوع نشان دادند. گروه ۰/۱ درصد آویشن، کمترین شمارش *E.coli* را داشت (Cross et al., 2002; Canan Bolukbasi et al., 2006).

Corduk و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی تاثیر اورگواستیم[1] (ترکیب تجاری شامل کاراوکرول (۸۱/۸۹ درصد)، تیمول (۲/٤۲درصد) و روغن ضروری مرزنجوش بر جمعیت میکروبی روده کوچک در سن ٦ هفتگی، تفاوت معنی‌داری در کاهش جمعیت کل میکروبی و جمعیت کلی فرم بین گروه شاهد و تیمارآزمایشی مشاهده نکردند (Corduk et al, 2008).

در مطالعه حاضر هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری از لحاظ درصد مقاومت آنتی بیوتیکی بین تیمارها مشاهده نگردید (p>۰/۰۵). میزان مقاومت جدایه‌ها به تعدادی از ترکیبات

[1] Orego-Stim

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی باکتریال گیاه بالا بود، به نحوی که اشرشیا کلی به عنوان یک میکرو فلور کومنسال به دلیل دارا بودن خصوصیات گوناگون قادر است در بدن پرنده ایجاد بیماری کند. بیشترین مقاومت مربوط به ریفامپیسین، پنی سیلین و اریترومایسین و کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفیکسین و سیپروفلوکساسین مشاهده گردید. کلیه جدایه‌های مورد آزمایش نسبت به جنتامایسین حساس بودند که علت این امر عدم مصرف جنتامایسین در جیره غذایی طیور و مواجه کم ارگانیسم وآنتی بیوتیک می‌باشد.

Horosova و Bujnakova (۲۰۰۶) در بررسی تأثیر اسانس پونه کوهی علیه جدایه‌های *E.coli* از بستر طیور که بوسیله همین اسانس تغذیه شده‌اند، گزارش کردند که میزان MIC آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین، نئومایسین، آمیکاسین[1] و آپارامایسین[2] در مقابل جدایه‌های *E.coli* در مقایسه با گروه شاهد افزایش پیدا می‌کند (Horosova & Bujnakova, 2006).

Akond و همکارانش (۲۰۰۹) در بنگلادش در ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *E.coli* از نمونه‌های مختلف از طیور (بدون تغذیهٔ خاص)، بالاترین مقاومت را نسبت به آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و ریفامپیسین، کمترین مقاومت را در برابر کلرامفنیکل و نئومایسین و بالاترین حساسیت را در برابر سفیکسین و جنتامایسین گزارش کردند (Akond et al., 2009).

همان گونه که نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف اسانس *S.hortensis* نشان می‌دهد اثر بازدارندگی غلظت‌های بالاتر قویتر می‌باشد. همچنین مقایسه تأثیر اسانس *S.hortensis* با آنتی بیوتیک‌های به کار برده شده در این پژوهش نشان می‌دهد که باکتری *Escherichia coli* در مقابل آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین، پنی سیلین و اریترومایسین مقاوم بوده، ولی اسانس مذکور روی این باکتری موثر بوده است. همانطور که جداول نشان می‌دهند تاثیر این اسانس در حجم‌های ۲µl و ۱µl، مشابه اثر آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین، نئومایسین و تتراسیکلین است. نتایج پژوهش‌های سایر دانشمندان نیز خاصیت ضدمیکروبی این گونه را تأیید می‌نمایند (Sahin et al., 2003).

همچنین در این بررسی، تست ضدمیکروبی اسانس *S.hortensis* نشان می‌دهد که این گونه از نظر مهارکنندگی رشد و کشندگی باکتری‌های مورد نظر بسیار قوی بوده که به دلیل وجود کارواکرول موجود در این اسانس می‌باشد. کارواکرول ساختار غشای سلولی را از طریق تغییر در نفوذ پذیری کانال‌های H^+/K^+ مختل می‌کند و با تغییر در شیب یونی منجر به توقف و اختلال عملکردهای اساسی سلول و مرگ می‌شود (Cox et al., 2000).

مطالعات مختلفی انجام شده که در آن اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های مختلف علیه باکتری *E.coli* که به عنوان فلور کومنسال روده پرندگان می‌باشد مورد بررسی قرار گرفته است (Horosova & Bujnakova, 2006; Ouweh et al., 2010).

ارتقای سطح مدیریت بهداشتی واحدهای تولیدی، نظارت منظم و مداوم بر مصرف آنتی بیوتیک‌ها و پایش مقاومت آنتی باکتریال در حیوانات خوراکی توسط مراکز مربوطه، استفاده از ترکیبات جایگزین آنتی بیوتیک و برپایی برنامه‌های آموزشی برای تولیدکنندگان، اقداماتی هستند که بی‌تردید در کاهش مقاومت به ترکیبات آنتی بیوتیکی موثرند. به هر صورت استفاده از اسانس طبیعی گونه مرزه می‌تواند رشد باکتری‌های مختلفی را با قدرتی بیش از آنتی بیوتیک‌های سنتزی یا برابر با آنها کنترل کند (Barrow, 1992; Mcewen & Fedorka-Cray, 2003).

[1] Amicacin
[2] Aparamycin

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری نهایی

یکی از اهداف مهم در اضافه کـردن اسـانس مـرزه در جیره حیوانات خوراکی، کمک به غلبه بـاکتری‌هـای مفیـد و مطلوب بر باکتری‌های مضر و بیماری‌زا می‌باشد. بـه عـلاوه به دلیل فعالیت ضد میکروبی، این اسانس می‌تواند از استقرار باکتری‌های بیماریزای روده‌ای مثـل سـالمونلا در خـوراک و دستگاه گوارش جلوگیری کند و باعث بهبـود جـذب مـواد غذایی از دستگاه گوارش حیوان شود. بنابراین بـا توجـه بـه محدودیت استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در مرغداری‌ها، اسانس گیاه مرزه می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات آتی به منظور سـاخت مکمل‌های غذایی جهت افزایش رشد و کنترل بیمـاری‌هـای شایع در صنعت طیور باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان ایـن مقالـه از مرکـز تحقیقـات کـشاورزی استان قم، به ویژه جناب آقای مهندس محمد یگانه پرسـت، جناب آقای دکتر مجید ترابی و جناب آقـای محمـد مهـدی خجسته به خاطر همکاری در اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

Adiguzel, A., Ozer, H., Kilic, H., Cetin, B. (2007). Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* on foodborne bacteria and fungi. Czech J. Food Sci., 25: 81–89.

Akond, M.A., Hassan, S.M.R., Alam, S., Shirin, M. (2009). Antibiotic Resistance of *Escherichia Coli* Isolated From Poultry and Poultry Environment of Bangladesh; American Journal of Environmental Sciences5 (1): 47-52.

Aksit, M., Goksoy, E. Kok, F. Ozdemir, D.and Ozdogan, M. (2006). The impacts of organic acid and essential oil supplementations to diets on the microbiological quality of chicken carcasses.Arch. Geflugelkd. 70: 168–173.

Apata. D.F. (2009). Antibiotic Resistance in Poultry. International Journal of Poultry Science 8 (4): 404-408.

Barrow, P. (1992). Probiotic for chickens. Pages 225–257 in Probiotics, the Scientific Basis. R. Fuller, ed. Chapman and Hall, London.

Barton, M.D., Pratt, R., and Hart, W.S. (2003). Antibiotic resistance in animals. Commun. Dis. Intell.27 Suppl: S121-6.

Betancourt, L., Phandanouvong, V., Rodrigues, F., Ariza-Nieto, C., Hume, M., Nisbet, D., Afamador-Tellez, G. (1989). Nonruminant Nutrition: Feed Ingredients; Dietary supplementation effect of oregano essential oils on intestinal digest microbial community in broilers under high altitude condition ;J. Anim. Sci. Vol. 88, E-Suppl. 2/J. Dairy Sci. Vol. 93, E-Suppl. 1/Poult. Sci. Vol. 89.

Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (1974). Bergey's manual of determinative Bacteriology. 8th Edition, The Williams and Wilkins, Baltimore. ISBN-13: 9780683011173 ISBN: 0683011170.

Corduk. M., Ceylan, N., Dede, N., Tel, O.Y. (2008). Effects of novel feed additives on performance, carcass traits and *E. coli*, aerobic bacteria and yeast counts in broilers; Arch.Geflügelk., 72 (2). S. 61–67.

Canan Bolukbasi, S., Kuddus Erhan, M. (2006). Effects of dietary Thyme (*Thymus vulgaris*) on laying hen performance and Escherichia coli (*E.coli*) concenteration in feces.Journal of Natural and Engineering Science, 1(2): 55-58.

Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal of Applied Microbiology, 88: 170–175.

Cross, D.E., Svoboda, K., Hillman, K., Mcdevitt, R.and Acamovic, T. (2002). Effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil as an in vivo dietary supplement on chicken intestinal microflora. Proceedings of the 33rd International Symposium on Essential oils, Pp 3-7.

www.SID.ir

Archive of SID

Mcewen, S.A., Fedorka-Cray, P.J. (2003). Antimicrobial use and resistance in animals. Clin. Infect. Dis.34 Suppl 3: S93-106.

Namkung, H., Li, M., Gong, J., Yu, H., Cottrill, M., Lange, C.F.M. (2004). Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. Canadian Journal of Animal Science, 84(4): 697–704.

Nurmi, E., Rantala, M. (1973). New aspects of Salmonella infection in broiler production.Nature 241: 210–211.

Ouweh, A.C., Tiihonen, K., Kettunen, H., Peuranen, S., Schulze, H., Rautonen, N. (2010). In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota; Veterinarni Medicina, 55, (2): 71–78.

Sahin, F., Karaman, I., Gulluce, M., Ogutcu, H., Sengul, M., Adiguzel, A., Ozturk, S., Kotan, R. (2003). Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. Journal of Ethno pharmacology, 87: 61-65.

Doetkott, D.M., Nolan, L.K., Giddings, C.W., Berry hil, D.L. (1996). Large Plasmids of avian *Escherichia coli* isoltes. Avian Dis. 90: 927-930.

Duncan, D.B. (1955). Multiple range test and multiple Ftests. Biometrics, 11: 1-42.

Gross. W.G. (1994). Diseases due to Escherichia coli in poultry. In *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Edited by CL Gyles. CAB International, Wallingford, UK. PP: 237-259.

Gunal, M., Yayli, G., Kaya, O., Karahan, N., Sulak, O. (2006). The Effects of Antibiotic Growth Promoter, Probiotic or Organic Acid Supplementation on Performance. Intestinal Microflora and Tissue of Broilers. International Journal of Poultry Science 5 (2): 149-155.

Horosova, K., Bujnakova, D., Kme, V. (2006). Effect of oregano essential oil on chicken Lactobacilli and E.coli; Folla Microbiol. 51(4): 278-280.

Jamroz, D., Kamel, C. (2002). Plant extracts enhance broiler performance. J. Anim. Sci., 80 (Supp l.1): 41 (Abstract).

Kalemba, D., Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 10, 813–829.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of essential oil of *Satureja hortensis* on Intestinal *E. coli* isolates in broiler chickens

Heydari, A[1]., *Dakhili Ranju, M[2]., Zolfaghary, M.R[3]
1. Islamic Azad University, Qom branch, Department of Microbiology, Qom, Iran
2. Islamic Azad University, Qom branch, Department of Mycology, Qom, Iran
3. Islamic Azad University, Qom branch, Department of Microbiology, Qom, Iran

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of diets containing different levels of *Satureja hortensis* essential oil on Fecal and illum microflora of broiler chicks, resistance antibiotic and invitro assay activity *Satureja* essential oil against *E.coli* isolates. Tree hundred and twenty one-day old male broiler chicks (Ross-308 strain) were used in a completely randomized design with 4 treatments, and 4 replicates were allocated to each treatment. Different levels of *Satureja* essential oil in diets had not significant effects on total bacterial count and *E.coli*/coliform population in faecal material at 32 days old and illum at 42 days of age ($p>0.05$). Also in this survey Dietary treatment had no effect on the anti-bacterial valus of thirteen antibiotics against *E.coli* isolates by Disc diffusion method ($p>0.05$). Most of the *E.coli* isolates were resistant to antibiotics, the most efficient being Penicillin, Riphampicin and Erythromycin. Chemical analysis of this oil by capillary GC showed as the main constituent carvacrol (%37.18). An invitro assay measuring the antimicrobial activity of *Satureja* essential oil in disc diffusion method, the highest inhibition areas were observed for the amount of 5µl essential extract. The results are suggesting that *Satureja* essential oil for the amounts of 1µl and 2µl has antibacterial effect on E. coli isolates similar to the best antibiotics such as Streptomycin, Tetracycline and Neomycin.The results of MIC and MBC showed the high anti-microbial effect of *Satureja* essential oil. It seems the presence of carvacrol caused the strong anti microbial effect of this oil.

Key words: *Satureja* essential oil, antimicrobial effect, Broiler chicks, Micro flora, *E.coli*

* *Email:Dr_Dakhili@yahoo.com*

www.SID.ir