



دانشگاه گوارکشاورزی و منابع طبیعی گرگان

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 ضد میکروبی آن‌ها با نانو ذرات نقره و آنتی‌بیوتیک

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

استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس، استاد و دانش‌آموخته دکتری تخصصی گروه تغذیه دام و طیور دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشجوی دکتری تخصصی گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۹۲/۰۴/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۰۴

چکیده

این پژوهش به منظور تعیین ترکیبات شیمیایی موجود در روغن‌های اسانسی سیر و میخک، و مقایسه فعالیت ضد میکروبی 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 به ترتیب با ۲۵/۵۰ و ۶۳/۳۷ 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، ۴ و ۸ میکرولیتر)، و آنتی‌بیوتیک‌های رایج در دامپزشکی به دیسک‌های کاغذی استریل تزریق شدند. دیسک‌ها بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت شده با مایع شکمبه، قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد با ریزسنج اندازه‌گیری شد. بین تیمارهای آزمایشی در قطر هاله عدم رشد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). ترکیب نئومایسین + اکسی تتراسایکلین و اکسی تتراسایکلین به ترتیب با قطر هاله عدم رشد برابر با ۳۸/۰۳ و ۲۵/۰۲ میلی‌متر دارای بیشترین خاصیت ضد میکروبی بودند ($P < 0/05$). قطر هاله عدم رشد حاصل از نانو ذرات نقره و روغن اسانسی میخک با غلظت ۸ میکرولیتر به صورت معنی‌داری بزرگتر از قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک نئومایسین بود ($P < 0/05$). اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره تنها در غلظت‌های ۰/۵۰ و ۸ میکرولیتر به صورت معنی‌داری از روغن اسانسی میخک بیشتر بود ($P < 0/05$).

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

*نویسنده مسئول: farzadghanbari1976@gmail.com

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 (به صورت متان) و پروتئین (به صورت نیتروژن آمونیاکی) را به دنبال 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، به دنبال 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 به دلیل ابقای آن‌ها در تولیدات دامی و ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مصرف‌کنندگان منع شده است. به همین دلیل استفاده از افزودنی‌های تجاری همانند اسیدهای آلی، آنتی‌بادی‌ها، پروبیوتیک‌ها و روغن‌های اسانسی^۱ به منظور تعدیل تخمیر در شکمبه، مورد توجه قرار گرفته‌اند (کالسامیگلیا و همکاران، ۲۰۰۷).

در طب سنتی، گیاهان دارویی نقش ویژه‌ای در درمان برخی بیماری‌ها داشته‌اند (سلطانی پور و همکاران، ۲۰۰۴). روغن‌های اسانسی مخلوطی از متابولیت‌های ثانویه فرار گیاه می‌باشند که طی عصاره‌گیری به روش تقطیر به دست می‌آیند (سلطانی پور و همکاران، ۲۰۰۴). این ترکیبات دارای فعالیت ضد میکروبی 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 این رو 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^۲، گزارش کردند که اسانس گیاه آویشن بیش‌ترین تاثیر را بر این باکتری دارد. ایوانز و سامونل (۲۰۰۲) خواص ضد میکروبی عصاره برگ، ریشه، ساقه و گل چند گیاه را بررسی و گزارش

1- Essential oils

2- *Bacillus cereus*

نمودند که عصاره گیاه کاسیا اکالیپتوس اثرکشدگی روی باکتری سالمونلا تیفی^۱ 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 (روتو و همکاران، ۱۹۹۶). 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^۲، سالمونلا انتریکا^۳، لیستریا منوسایتوتنز^۴، سودوموناس فلورسنس^۵، سراتیا لیگوفاسینس^۶، بروکوتریگس ترموسفاکتا^۷، کارنوباکتریوم پیسیکولا^۸ و لاکتوباسیلوس کورانتوس^۹ موثر است. عصاره اتانولی میخک علیه باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی پروپیروموناس گینگیروالیس^{۱۰} و پرروتلاترمدیا^{۱۱} 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 ضد میکروبی 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 حالی است 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 fluorescens*
- 6- *Serratia liquefaciens*
- 7- *Brochothrix thermosphacta*
- 8- *Carnobacterium piscicola*
- 9- *Lactobacillus currantus*
- 10- *Prophyromonas gingivallis*
- 11- *Prerotella termedia*

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^۱ به مقایسه اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره و نانو ذرات پلاتین بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*^۲ 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 ضد میکروبی 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 ۴ 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 رقیق‌کننده مورد نیاز، رقیق شده و محلول ذخیره‌ای آنتی‌بیوتیکی آماده گردید.

ترکیب شیمیایی روغن‌های اسانسی میخک و سیر با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی^۳ تعیین شد. مشخصات دستگاه مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از: گاز حامل (فاز متحرک): گاز نیتروژن با جریان ۲۵ میلی‌لیتر در دقیقه؛ سوخت: گاز هیدروژن با جریان ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه و جریان هوا با سرعت ۳۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه؛ ستون (فاز ثابت): ستون موئینه با نام DB-WAX و طول ۵۰ متر، قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر 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 بدین صورت بود که ابتدا ۱۵ قطره در یک لوله آزمایش درب‌دار ریخته

1- Minimum Inhibitory Concentration

2- *Staphylococcus aureus*

3- Gas-Chromatography (Varian, CP-3800)

شد. سپس ۷ سانتی متر مکعب n- هگزان با درجه کروماتوگرافی گازی و ۲ سانتی متر مکعب پتاس متانولی ۲ مولار با درجه کروماتوگرافی گازی به آن اضافه گردید. این مخلوط به مدت چند ثانیه به شدت تکان داده شد. سپس به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای 5 ± 55 درجه سانتی گراد در داخل بن ماری قرار گرفت. بعد از این مدت، ۳ سانتی متر مکعب از فاز رویی برداشته و از روی صافی حاوی سولفات سدیم خشک عبور داده شد. از نمونه صاف شده به مقدار ۴ میکرولیتر به دستگاه تزریق گردید (زامورا و هیدالگو، ۲۰۰۴). 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 به وسیله دکتورها ارزشیابی و مشخص گردید (زامورا و هیدالگو، ۲۰۰۴).

مایع شکمبه مورد نیاز برای تعیین فعالیت ضد میکروبی، از ۳ راس قوچ بالغ (یک ساله) 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 ۶۰ میلی‌متری بسته شده بود، انجام می‌گرفت. مایع صاف شده شکمبه بلافاصله در ظروف سر بسته کوچک استریل ریخته شده و به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شد. ترکیبات مورد بررسی در حجم‌های معین به عنوان گروه‌های تیماری به دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری استریل تزریق شدند. در مرحله بعدی، رقت یک دوم لوله شماره یک مک فارلند^۱ انتخاب و کدورت لوله‌ی حاوی مایع شکمبه با آن مقایسه شد. از سوسپانسون تهیه شده به روش سطحی بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار^۲ 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 به مدت ۲۴ 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

داده‌های به‌دست آمده با استفاده از طرح کاملاً تصادفی (۱۸ تیمار و ۳ تکرار) و به‌وسیله نرم افزار آماری (۹/۱) SAS (۲۰۰۳) تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون 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 ضد میکروبی سیر می‌باشد (روتر و همکاران، ۱۹۹۶؛ اوگارا و همکاران، 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 و اساکام و همکاران، ۲۰۰۵). در پژوهش حاضر، اوژنول^۱، ۶۳/۳۷ درصد ترکیبات موجود در روغن اسانسی میخک را به خود اختصاص داده است. اوژنول (۴ 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 دنا توره شدن پروتئین‌ها شده و با فسفولپیدهای دیواره سلولی واکنش داده و باعث تغییر نفوذپذیری دیواره سلولی می‌شود (ونکیانگ و همکاران، ۲۰۰۷).

فعالیت ضد میکروبی: پس از کشت سوسپانسیون تهیه شده از مایع شکمه (با کدورت یک دوم لوله شماره ۱ مک فارلند) بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار، مشخص شد که هر میلی‌لیتر این سوسپانسیون حاوی 10^8 کلونی می‌باشد. تاثیر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروارگانیزم‌های بی‌هوازی اختیاری در جدول ۲ گزارش شده است. اختلاف قطر هاله عدم رشد در تیمارهای آزمایشی مختلف معنی‌دار بود ($P < 0/05$). ترکیب نئومایسین + اکسی‌تتراسایکلین (شکل ۱) با قطر هاله عدم رشد برابر با $38/03$ میلی‌متر دارای بیشترین خاصیت ضد میکروبی بود ($P < 0/05$). قطر هاله عدم رشد

1-Eugenol

حاصل از نانو ذرات نقره و روغن اسانسی میخک با غلظت ۸ میکرولیتر (شکل ۲) بزرگ‌تر از هاله عدم رشد نئومایسین بود ($P < 0/05$). همچنین اثر میکروب‌کشی نانو ذرات نقره تنها در غلظت‌های ۰/۵۰ و ۸ میکرولیتر به صورت معنی‌داری از روغن اسانسی میخک بیشتر بود ($P < 0/05$)، و در غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میکرولیتر اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد ($P > 0/05$). هاله عدم رشد در تیمارهای حاوی روغن اسانسی سیر نسبت به سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0/05$). به‌طوری‌که اثر ضد میکروبی روغن اسانسی سیر در غلظت ۸ میکرولیتر با اثر ضد میکروبی روغن اسانسی میخک و نانو نقره در غلظت ۱ میکرولیتر برابر بود. این امر بیان‌کننده قدرت میکروب‌کشی کم‌تر روغن اسانسی سیر نسبت به ترکیبات نامبرده می‌باشد. در مورد اثرات سیر، مطالعاتی در زمینه اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدپروتوزوایی و ضدویروسی این گیاه انجام شده است. در بیشتر موارد نیز اثرات قابل توجهی از فعالیت ضد میکروبی 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	۲/۴۰	اوژنول	۶۳/۳۷
دی‌تیوسیکلوپنتان	۰/۴۰	بتا کاریوفیلن	۱۵/۹۴
دی‌آلیل سولفید	۲/۲۰	چاویکول	۰/۱۰
متیل تیوپروپانول	۰/۲۰	فارنسول	۰/۴۴
متیل آلیل دی‌سولفید (سیس یا ترانس)	۱۱/۳۰	اوژیل استات	۱۳/۱۴
متیل پروپیل دی‌سولفید	۰/۲۰	کاریوفیلن اکساید	۱/۰۱
دی‌متیل تری‌سولفید	۲/۷۰	اسپاتونول	۰/۸۰
دی‌آلیل دی‌سولفید	۲۵/۵۰	هونن	۲/۶۲
متیل آلیل تری‌سولفید	۱۷/۴۰		
دی‌آلیل تری‌سولفید	۱۸/۲۰		
دی‌آلیل تترا‌سولفید	۰/۵۰		

آروا و کاور (۱۹۹۹) اثرات ضد میکروبی گیاهان مختلف بر میکروب‌های گوناگون را مورد بررسی قرار دادند. در نتایج، اثرات باکتری‌کشی اسانس‌های سیر و میخک تنها بر باکتری سالمونلا تیفی-موریوم^۱ مشاهده شد. چندین ساز و کار برای تشریح فعالیت ضد میکروبی سیر پیشنهاد شده است. جلوگیری از سنتز *DNA*، *RNA* و پروتئین سلول‌ها از جمله ساز و کارهای پیشنهادی می‌باشند (فیلد برگ و همکاران، ۱۹۸۸). بیان شده است که بخش عمده‌ای از خواص ضد میکروبی سیر مربوط به آلیسین و متابولیت‌های حاصل از آن می‌باشد. این ترکیبات فعالیت‌های ضد میکروبی خود را از طریق مهار اختصاصی آنزیم استیل کوانزیم 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 ضد میکروبی سیر می‌باشد. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که فعالیت ضد میکروبی ترکیبات آلیل‌سولفوری روغن اسانسی سیر با اضافه شدن هر اتم گوگرد افزایش می‌یابد (روتر و همکاران، ۱۹۹۶؛ اوگارا و همکاران، 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 ضد باکتریایی، ضد قارچی 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 ضد باکتریایی قوی آن می‌شود. این ترکیب فنولیکی باعث دناتوره شدن پروتئین‌ها شده و با فسفولیپیدهای دیواره سلولی واکنش می‌دهد. از این رو موجب تغییر در نفوذپذیری دیواره سلولی می‌شود (ونکیانگ و همکاران، ۲۰۰۷). در یک بررسی که به وسیله ماتان و همکاران (۲۰۰۶) انجام گرفت، اضافه کردن ۴۰۰۰ میکرولیتر روغن اسانسی میخک باعث ممانعت از رشد *آسپرژیلوس فلاوس*^۲ شد. والرو و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده

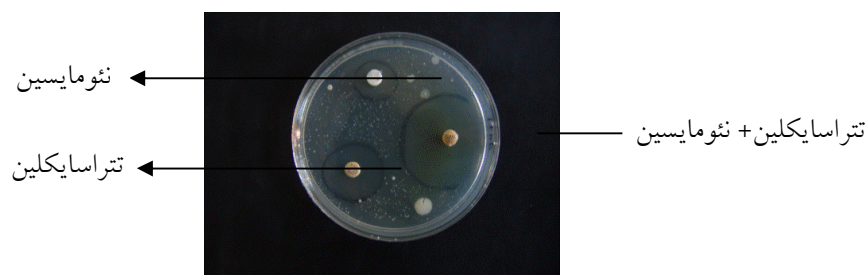
1- *Salmonella typhimurium*

2- *Aspergillus flavus*

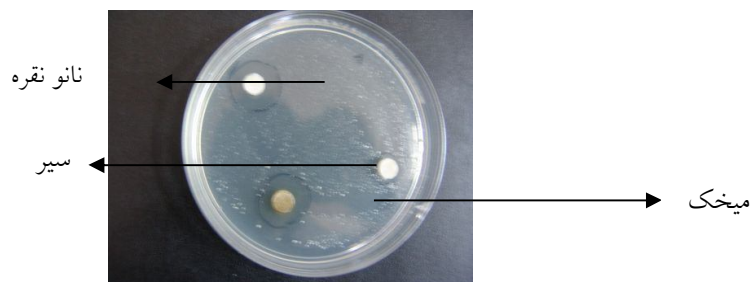
کردند که اسانس میخک باعث کاهش رشد باسیلوس سرئوس می‌شود. از طرفی بن‌چار و همکاران (۲۰۰۷) طی مطالعه‌ای نشان دادند که ترکیبات فنولیک از جمله اوژنول، ماده موثره میخک، دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشند. این اثر به‌علت حضور گروه‌های هیدروکسیلی در ساختار فنلی آنهاست. ترکیبات با ساختار فنلی دارای طیف گسترده‌ای 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 /شرشیا 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، کارایی استفاده از انرژی و پروتئین در شکمبه بهبود خواهد یافت. از طرفی این ماده به‌طور موثر دارای اثر ضد میکروبی می‌باشد. در پژوهش حاضر، اثر ضد میکروبی روغن اسانسی میخک با دز ۸ میکروگرم در لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر از آنتی‌بیوتیک نئوماکسین بود. از طرفی این دز طبق تحقیقات هیلاندر و همکاران (۱۹۹۸) کمتر از حدی است که فرآیند تخمیر را کاهش دهد. از این‌رو می‌توان آن را به‌عنوان جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک نئوماکسین استفاده کرد.

در زمان‌های گذشته، از فلز نقره به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی و ضدعفونی‌کننده 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

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 ضد میکروبی 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

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان (۱)، شماره (۴) ۱۳۹۲

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	۴/۳۷ میکروگرم اکسی‌تتراسایکلین + ۶/۲۵ میکروگرم نئومایسین	۳۸/۰۳ ± ۰/۰۶۳ ^a
اکسی‌تتراسایکلین	۳	۲۵/۰۲ ± ۰/۰۰۸ ^b
نانو ذرات نقره	۸	۱۶/۹۰ ± ۰/۰۲۰ ^c
میخک	۸	۱۵/۷۸ ± ۰/۰۶۳ ^d
نانو ذرات نقره	۴	۱۴/۷۹ ± ۰/۰۳۰ ^{de}
میخک	۴	۱۳/۹۸ ± ۰/۰۵۳ ^c
نئومایسین	۵۰	۱۳/۷۲ ± ۰/۰۳۰ ^e
نانو نقره	۲	۱۱/۶۶ ± ۰/۰۱۴ ^f
میخک	۲	۱۱/۴۶ ± ۰/۰۲۸ ^f
سیر	۸	۹/۰۰ ± ۰/۰۳۲ ^g
نانو ذرات نقره	۱	۸/۹۶ ± ۰/۰۲۰ ^g
میخک	۱	۸/۸۳ ± ۰/۰۱۹ ^g
نانو ذرات نقره	۰/۵۰	۸/۰۳ ± ۰/۰۰۳ ^{gh}
میخک	۰/۵۰	۶/۹۶ ± ۰/۰۳۰ ⁱ
سیر	۴	۶/۸۲ ± ۰/۰۲۸ ⁱ
سیر	۲	۶/۴۶ ± ۰/۰۱۵ ^{ij}
سیر	۱	۵/۶۳ ± ۰/۰۱۹ ^{jk}
سیر	۰/۵۰	۵/۳۰ ± ۰/۰۲۵ ^k

اعدادی که در ستون حروف مشابه ندارند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

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.

منابع

- Aroa, D.S. and Kaur, J. 1999. Antimicrobial 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. Ethnopharmacol.* 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 inhibition 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 *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 65:1545-1560.
- Harris, J.C., Cottrel, S.L., Plummer, S. and Lloyd, 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 aqueous on *salmonella typhimurium* infected rabbits. *Iran. J. Med. Aroma. Plants.* 23: 453-457. (In Persian)

- 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 hepatocarcinogenesis. *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 exogenous 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)

- 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.



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. Ghanbari¹, T. Ghoorchi², M. Ebrahimi³ and S. Arbabi⁴**

¹Assistant Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, ²Professor and ⁴PhD Graduated, Dept. of Animal and Poultry Nutrition, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ³PhD 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 common antibiotics in veterinary medicine were infused into sterile 6 millimeter 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

