DOI: 10.22092/vj.2018.115441.1362
شماره ۱۲۰ پاییز ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی اثرضدباکتریایی ترکیب نانورس بنتونیت و اسانس دارچین بر باکتری‌های اشریشیا کلی و سالمونلا در شرایط آزمایشگاه

• **راحله نیک روش**
دانش آموخته کارشناسی ارشد، مدیریت کارآفرینی، دانشگاه گنبد کاووس،گنبد، ایران
• **مسعود خیراندیش**
استادیار گروه اقتصاد دانشگاه گنبدکاووس، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران
• **حجت قربانی واقعی**
استادیار گروه منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران
• **رضا راه‌چمنی (نویسنده مسئول)**
استادیار گروه علوم دامی دانشگاه گنبدکاووس، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۷-۰۴ تاریخ پذیرش :۱۳۹۶-۱۲-۱۶

Email: r_rahchamani@yahoo.com

چکیده

بیماری اسهال گوساله بر اساس برهم کنش پیچیده عوامل عفونی و غیر عفونی ایجاد می‌شود. در میان عوامل مختلف باکتریایی، اشریشیا کلی و سالمونلا دو عامل اصلی مرگ و میر گوساله‌ها به شمار می‌آیند. همزمان با توسعه داروهای جدید شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها، به تدریج اثرات مضر آن‌ها بر همگان مشخص شده است. امروزه بررسی نتایج کار محققین نشان می‌دهد که داروهای گیاهی از اثرات مخرب کمتری نسبت به داروهای شیمیایی برخوردار است. هدف از این پژوهش، ارزیابی اثرضدباکتریایی ترکیب نانورس بنتونیت و اسانس دارچین بر باکتری‌های اشریشیا کلی و سالمونلا در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد از غلظت‌های مختلف اسانس دارچین به تنهایی و در ترکیب با نانورس بنتونیت به روش ماکرودایلوشن در محیط آبگوشت قلب و مغز استفاده شد. نتایج نشان داد میزان حداقل غلظت بازدارنده اسانس دارچین برای باکتری سالمونلا ۰/۰۱ درصد و میزان حداقل غلظت بازدارنده اسانس دارچین برای باکتری اشریشیا کلی ۰/۰۲ درصد می‌باشد. درحالی که در ترکیب با نانورس، میزان ۰/۰۱ درصد اسانس دارچین و ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانورس بنتونیت کمترین غلظت بازدارنده برای باکتری سالمونلا و همچنین میزان ۰/۰۲ درصد اسانس دارچین و ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانورس بنتونیت کمترین غلظت بازدارنده برای باکتری اشریشیا کلی بدست آمد. در مجموع، اسانس دارچین به تنهایی و به همراه نانورس بنتونیت اثر خوبی بر کنترل رشد دو باکتری اشریشیا کلی و سالمونلا داشت.

کلمات کلیدی: بنتونیت، دارچین، اشریشیا کلی، سالمونلا، حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC)

● Veterinary Researches & Biological Products No 120 pp: 20-27

Evaluation of antibacterial effect of the combination of Bentonite nanoclay and essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* on *Escherichia coli* and Salmonella in Vitro

By: Nikravesh, R., M.Sc. graduated, entrepreneurial management, University of Gonbad Kavous, Gonbad, Iran. Kheirandish, M., Assistant Professor, Department of Economics, University of Gonbade Kavous, Gonbad, Iran. Ghorbani Vaghaei, H., Assistant Professor, Department of Forestry, University of Gonbad Kavous, Gonbad, Iran. and Rahchamani, R., (Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Gonbad Kavous, Gonbad, Iran.

Received: 2017-09-26 Accepted: 2018-03-07

Email: r_rahchamani@yahoo.com

Calf diarrhea diseases result from complex interactions of the infectious and non-infectious agents and is one of the most common diseases reported calves up to 3 months old. Among the bacterial causes of diarrhea *Escherichia coli* and Salmonella species are the most common. Concurrent with the development of new chemical drugs and antibiotics, their harmful effects are gradually emerged. Nowadays the research works results show that herbal medicines have not any harmful effects. The goal of this study is synergic effects of Bentonite Nano clay and essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* on *Escherichia coli* and Salmonella in Vitro. For determination the minimum inhibition concentrations (MIC) of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, and Bentonite nanoclay was investigated individual and combination with each other on two causal agents of bacterial diarrhea in BHI broth media by macro-dilution method. The result showed that the MIC of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* was 0.01% and 0.02% for Salmonella and *Escherichia coli*, respectively. Meanwhile the MIC of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* combinated with Bentonite nanoclay was 0.01% and 12.5 mg/mL for Salmonella and 0.02% and 25 mg/mL for *Escherichia coli*. In conclusion, essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* individual and also combination with montmorillonite nanoclay have a good accurate to control on two major agents of bacterial diarrhea.

Key words: Bentonite, *Cinnamomum zeylanicum*, *Escherichia coli*, Salmonella, Minimum inhibition concentrations (MIC)

مقدمه

اسهال گوساله‌های نوزاد یکی از مهم‌ترین بیماري‌های صنعت گاوداری بوده که سالیانه موجب بروز زیان‌های اقتصادی فراوانی مي‌شود (۸). بطور معمول باکتری‌های اشریشیاکلی و سالمونلا، ویروس‌های خانواده روتاویروس و کروناویروس و برخی تک‌یاخته‌ها نظیر کریپتوسپوریدیوم از عوامل عفونی ایجاد اسهال در گوساله‌ها می‌باشند (۱۴). از عوامل غیر عفونی مسبب اسهال می‌توان به شرایط محیطی (رطوبت، سرما، جایگاه غیربهداشتي، استرس) و عوامل تغذیه‌ای (نقص در ایمنی انتقال یافته از طریق آغوز، خوراندن بیش از حد شیر و کیفیت پایین جایگزین شیر) اشاره کرد (۶). برای کنترل عوامل عفونی در بیماری اسهال، استفاده از مکمل‌های آنتي‌بیوتیك‌دار در دوزهای تحت درمانی توصیه شده است (۱۵). امروزه استفاده از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی برای درمان اسهال دام شیوع چشمگیری یافته است. اما افزایش مصرف این نوع مکمل‌های آنتی‌بیوتیکی، با معضلاتی چون پدیده مقاومت میکروبی همراه است. علاوه بر این، مصرف بي‌رویه آنتي‌بیوتیك‌ها در درمان اسهال مي‌تواند سلامت مصرف‌کنندگان فراورده‌های دامی را نیز تهدید کند. امروزه از راهکارهای جدیدی چون ترکیبات جاذب باکتری‌ها و سموم آن‌ها (۱، ۹،۷) و انواع اسانس‌ها (۴) در درمان بیماری اسهال کمک گرفته می‌شود. رس‌ها یکی از انواع این ترکیبات جاذب باکتریایی می‌باشند (۱۸، ۲۰). کاربرد خاک رس برای اهداف پزشکی دارای سابقه‌ای طولانی است که قدمت آن به ۲۵۰۰ سال قبل از میلاد برمی‌گردد (۱۱). رفتارهای خاک‌خوری در میان مهره داران در درجه اول به کسب مواد معدنی و دفع مسمومیت از متابولیت‌های ثانویه گیاهان نسبت داده شده است و همچنین در کنترل اسهال، تنظیم اسیدیته دستگاه گوارش و تنظیم PH روده نیز نقش دارد (۱۳، ۲۲). خاک‌خوری، مصرف خاک معدنی است که در طیف وسیعی از گونه‌ها شامل پرندگان، جانوران سم‌دار و پستانداران گزارش شده و به‌ویژه در میان گیاهخواران رایج است (۱۹، ۲۱). خاک‌رس در دستگاه گوارش به مواد سمی متصل و از طریق ادرار و مدفوع دفع می‌شود. رابرتسون (۱۹۹۶) معتقداست که آگاهی از قدرت شفابخش رس خوراکی می‌تواند تا حد زیادی مرگ و میر رایج به علت اختلالات اسهال را کاهش دهد (۱۱). رس‌های بنتونیت و مونت موریلونیت از کانی‌های گروه اسمکتیت می‌باشند و در ساخت انواع دارو به عنوان حامل دارو و مواد کمکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. قرار گرفتن مولکول‌های دارو در بین فضای بین لایه‌ای رس‌ها، می‌تواند کارایی آن را برای استفاده‌های بیولوژیکی تغییر دهد. از مزایای استفاده از نانورس به عنوان حامل دارو، می‌توان به رهاسازی تدریجی و هدفمند دارو در بدن، جلوگیری از تخریب دارو و تسهیل جذب دارو در بدن اشاره کرد. بنتونیت توانایی جذب باکتری‌ها را دارد و باعث از بین رفتن سمیت ایجاد شده توسط باکتری‌ها می شود (۱۶). مباحث وابسته به گیاهان دارویی و داروهای

گیاهی از مهم‌ترین موضوعات مربوط به علوم پزشکی در دهه‌های اخیر بوده است. دارچین که تحت عنوان *Cinnamomum zeylanicum* شناخته می‌شود گیاهی از تیره برگ‌بو بوده که عمدتاً بومی کشورهای سریلانکا، هند و چین می‌باشد. اسانس روغنی این گیاه دارای خاصیت ضدمیکروبی قوی بوده و به عنوان چاشنی و طعم‌دهنده در غذاها استفاده می‌شود (۴).

با توجه به پراکندگی وسیع گیاهان دارویی و خاک رس در سطح کشور، این تحقیق به بررسی خواص ضد میکروبی ترکیبات گیاهان دارویی بهمراه خاک رس در درمان عفونت‌های باکتریایی می‌پردازد. با عنایت به این که مطالعه‌ای درمورد تأثیر ترکیب رس و اسانس، در ایران گزارش نشده است. هدف از انجام این تحقیق، تعیین حداقل غلظت مهاری و کشنده اسانس دارچین به تنهایی و در ترکیب با نانورس بنتونیت بر مهار باکتری‌های اشریشیا کلی و سالمونلا و همچنین رسم منحنی رشد آن در حضور غلظت‌های بازدارنده و در نهایت تعیین تأثیر این غلظت‌ها بر مهار بیماری اسهال می‌باشد. شاید نتایج این تحقیق زمینه مناسبی را برای جایگزین نمودن داروهایی با منشاء طبیعی، به‌جای درمان با آنتی‌بیوتیک، برای کنترل و درمان عفونت‌های باکتریایی فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

اسانس

در این مطالعه اسانس دارچین *(Cinnamomum zeylanicum)* از شرکت مگنولیا تهیه شد.

آماده‌سازی اسانس دارچین رقیق‌شده

برای رقیق‌نمودن اسانس از دی متیل سولفوکساید (DMSO) به عنوان امولسیفایر استفاده شد که قابلیت همگن کردن فازهای مختلف را داشته و خاصیت ضد میکروبی نیز ندارد. از رقت ۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر از این ماده استفاده شد که خاصیت ضدمیکروبی نداشته باشد.

نانورس

نانورس مورد استفاده در این تحقیق بنتونیت محصولی از شرکت (سیگما – آلریخ آمریکا) است که توسط شرکت پیشگامان نانو مواد ایران تهیه شد. اندازه نانوذرات رس ۱/۱۸ nm، با وزن ملکولی ۱۸۰/۱ گرم بر مول و جرم ویژه ظاهری ۱۱۰۰-۶۰۰ کیلوگرم بر مترمکعب و فرمول شیمیایی آن $H^{۲}AL^{۲}O^{۶}SI$ می باشد.

باکتری‌های مورد مطالعه

کشت لیوفیلیزه باکتری اشریشیاکلی PTCC ۱۵۳۳ و باکتری سالمونلا ۱۶۰۹ PTCC از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. سپس باکتری لیوفیلیزه دو مرتبه به طور متوالی در لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI Broth (Brain Heart Infusion) در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۱۶ ساعت کشت داده شد تا باکتری‌ها به حالت رویشی و فعال در آیند. سپس از کشت دوم به میزان پنج به یک با گلیسیرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندورف استریل در۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در طی تحقیق از این کشت‌های نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری

برای تهیه غلظت تلقیح، باکتری از لوله میکروسانتریفیوژ به لوله آزمایش حاوی محیط BHI Broth انتقال داده شد و دو مرتبه بطور متوالی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. در این مدت زمان ۲۴ ساعت، باکتری‌ها به تعداد معینی ازدیاد یافتند. سپس مقادیر مختلفی از کشت دوم به لوله‌های کووت (Cuvett) حاوی یک میلی‌لیتر محیط BHI Broth استریل تا مادامی انتقال داده شد که میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه طیف سنج در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به ۰/۱ برسد. سپس با انتقال یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی داخل کووت، به لوله حاوی نه میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۰۱ درصد، رقت‌های متوالی تا ۷- تهیه شد. با انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی BHI Agar از رقت‌های تهیه شده کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری (انکوباسیون) شدند و پس از این مدت، تعداد باکتری شمارش شد و از این طریق تعداد باکتری در کووت حاوی سوسپانسیون باکتری با جذب نوری معادل ۰/۱ و طول موج ۶۰۰ نانومتر محاسبه شد. کل آزمایش دو مرتبه تکرار شد. میانگین تعداد باکتری اشریشیاکلی در کووت با جذب نوری ۰/۱ و طول موج ۶۰۰ نانومتر معادل ۱۸×۱۰^{۶} و این میانگین برای باکتری سالمونلا معادل ۵×۱۰^{۷} محاسبه شد. با مشخص‌شدن این عدد هرگاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ و طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده بوده و می-توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دلخواه را تهیه نمود. البته در هر مورد تعداد دقیق باکتری تلقیح شده از طریق کشت همزمان باکتری و شمارش تعداد کلونی محاسبه شد. در ادامه رقت از این سوسپانسیون به لوله‌های حاوی اسانس و نانورس اضافه شد تا اثر تیمارها بر مهار یا عدم مهار باکتری‌های مولد اسهال مشخص گردد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش ماکرودایلوشن

روش ماکرودایلوشن، روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (Minimum Inhibition Concentration) در محیط کشت در لوله‌های آزمایش می‌باشد. اساس این روش بر پایه مهار رشد باکتری توسط ماده مورد آزمایش می‌باشد به‌طوری که بعد از اتمام دوره گرمخانه‌گذاری هیچ کدورت قابل‌مشاهده‌ای در لوله‌های موردنظر وجود نداشته باشد (۱). در این مرحله، درهفت لوله آزمایش استریل دو میلی‌لیتر محیط کشت BHI Broth ریخته شد. سپس نانورس به محیط کشت اضافه شد و تمام لوله‌ها اتوکلاو شدند. بعد از انجام عمل اتوکلاو به لوله اول اسانس و DMSO اضافه شد و به طور سریالی از لوله یک الی هفت رقت تهیه شد به نحوی که غلظت نانورس و اسانس در هر لوله دو برابر غلظت همان نانورس و اسانس در لوله بعدی باشد، لذا لوله یک دارای بیشترین غلظت و لوله هفت دارای کمترین غلظت است. غلظت‌های متوالی ترکیب نانو رس (صفر، ۳/۱۳، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و اسانس (صفر، ۰/۰۰۲۵، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸ درصد) در محیط کشت BHI حاوی پنج درصد DMSO تهیه شد. و درنهایت ۱۰۰

میکرولیتر از رقت سوسپانسیون باکتریایی با غلظت نهایی بدست آمده که برای باکتری سالمونلا معادل ۵×۱۰^{۵} و برای باکتری اشریشیاکلی معادل ۱۸×۱۰^{۴} می‌باشد، به لوله‌ها منتقل شد. سپس همه لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و پس از آن نتایج بررسی شده و پایین‌ترین غلظت لوله‌ای که فاقد کدورت بود به عنوان MIC گزارش شد. کنترل مثبت شامل باکتری در محیط فاقد اسانس و نانورس برای مقایسه کدورت لوله‌های تست بود.

تعیین حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC)

MBC کمترین غلظت از ماده ضدمیکروبی است (Minimum Bactericidal Concentration) که سبب مرگ میکروارگانیسم می‌شود. به این ترتیب هیچ میکروارگانیسم زنده‌ای نباید در محیط حاوی غلظت MBC حضور داشته باشد (۲). تست MBC به صورت کشت از لوله MIC و یک لوله قبل و بعد از آن بر روی محیط BHI Agar به منظور تایید نتایج MIC انجام شد. تمام لوله‌ها درانکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شده و کمترین غلظتی که توانسته بود ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها را بکشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. مراحل تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری در شکل شماره (۱) آورده شده است.

بررسی اثرغلظت‌های بازدارنده اسانس دارچین به تنهایی و در ترکیب با نانورس بر رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و سالمونلا در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد

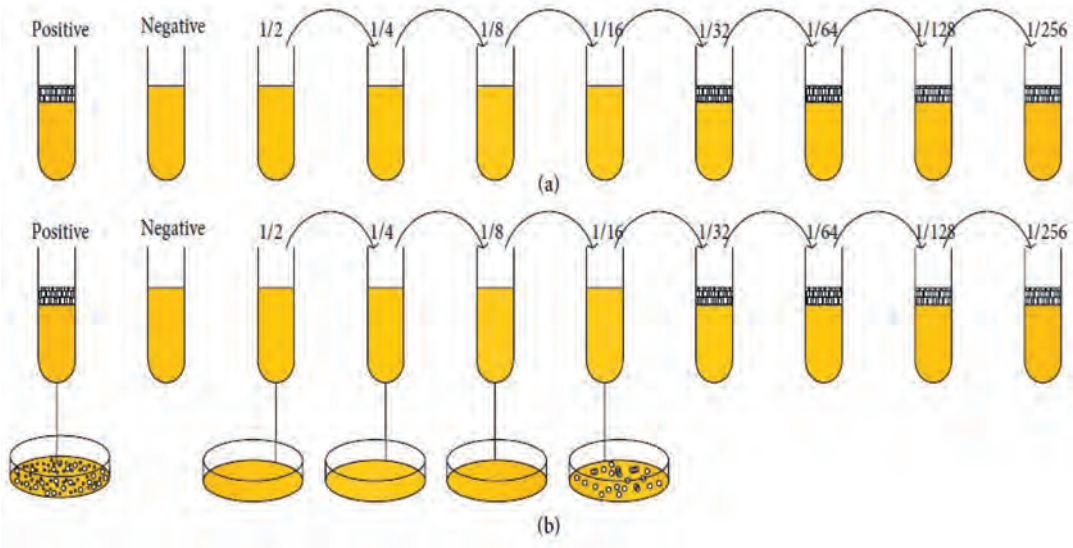
بررسی اثر غلظت‌های بازدارنده اسانس دارچین به تنهایی و در ترکیب با نانورس روی رشد باکتری‌های اشریشیا کلی و سالمونلا در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طی ۲۴ ساعت با روش اسپکتوفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت و جذب نوری لوله‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر و در ساعت‌های صفر،۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰و ۲۴ برای تعیین زمان اثر بخشی بر میزان رشد باکتری اندازه‌گیری شد. نمودار رشد باکتری‌ها تحت تأثیر ترکیب نانورس و اسانس در بخش نتایج آمده است.

تحلیل آماري

تحلیل آماری مطالعه‌ی حاضر با استفاده از نرم‌افزار SPSS18 صورت گرفت. روند تغییرات لگاریتم تعداد باکتری درزمان‌های مختلف توسط آزمون آماری Repeated measure ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای مقایسه میانگین لگاریتم تعداد باکتری بین تیمارهای مختلف در یک زمان، ازآنالیز واریانس یکطرفه (OneWay ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tukey استفاده شد و اختلاف میانگین داده‌ها در سطح آماری ۵ درصد مورد بررسی قرارگرفت.

نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده، میزان حداقل غلظت مهاری اسانس دارچین برای باکتری سالمونلا ۰/۰۱ درصد و برای باکتری اشریشیا کلی ۰/۰۲ درصد بود. لازم به ذکر است که در تمام تیمارها کمترین غلظتی که باعث کشته شدن حداقل ۹۹ درصد باکتری‌ها شده بود، همان رقت حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری می‌باشد که درجدول شماره (۱) درج گردیده است. نتایج اثر مهارکنندگی تیمارهای مختلف در غلظت بازدارنده بر رشد



شکل ۱- روش ماکرودایلوشن a) روش MIC و b) روش MBC

باکتری اشریشیا کلی و سالمونلا در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جدول شماره (۲) آورده شده است. نتایج آماری معنی‌داری تمام تیمارها را نشان می‌دهد ($p < ۰/۰۵$).

با انجام آزمون آماری نشان داده شد که تمام غلظت‌های بازدارنده، در مقایسه با گروه کنترل اثرات معنی‌داری در رشد باکتری‌های مورد مطالعه داشتند ($p < ۰/۰۵$). در این بررسی با آنالیز آماری داده‌ها مشخص شد که زمان، اسانس، ترکیب اسانس و نانورس اثر معنی‌داری بر رشد باکتری دارند. نمودارها در شکل شماره (۲) و (۳) آورده شده است.

بحث

در دهه ۱۹۶۰ به یکباره جهانیان متوجه اثرات جانبی و زیان بسیاری از داروهای شیمیایی شدند. با گسترش تحقیقات درمورد اثرات ناخواسته داروهای شیمیایی، بهره‌گیری از داروهای گیاهی مجددا مورد توجه واقع گرفته است (۳). اکثر اسانس‌های گیاهی دارای اثر ضدمیکروبی می‌باشند که این اثر به طور عمده مربوط به ترکیبات فنلی آن‌ها است. هر چه مقدار مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خاصیت ضدمیکروبی آن بیشتر است (۴، ۵). مطالعات نشان داده‌اند اسانس دارچین که در میان فعال‌ترین اسانس‌ها قرار دارد حاوی مقادیر بالایی از سینامالدهید و اوژنول می‌باشد. مشخص شده که اسانس پوست دارچین حاوی ۸۰-۶۰ درصد سینامالدهید و نیز حدود ۲ درصد اوژنول بوده و اسانس برگ‌های آن از اوژنول (۷۵-۷۰ درصد) غنی می‌باشند (۴، ۱۲). سینامالدهید موجود در اسانس دارچین از طریق اتصال گروه کربونیلی به پروتئین باکتری‌ها و ممانعت از دکربوکسیلاسیون اسیدهای‌آمینه، خاصیت ضدمیکروبی خود را اعمال می‌نمایند (۹، ۴). Bullerman و همکاران (۱۹۹۷) گزارش نمودند که دارچین حاوی سینامالدهید به عنوان ترکیب اصلی می باشد که ۷۵-۶۵ درصد اسانس را تشکیل می‌دهد و این ترکیب مسئول اثر آنتی باکتریایی می باشد (۱۰). در مطالعه Ouattara و همکاران (۱۹۹۷) نیز اثرات ضدباکتریایی بالای اسانس دارچین بر روی چند باکتری گرم مثبت و منفی تایید شده‌اند (۹). در این تحقیق باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کلی و سالمونلا استفاده شد و نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیبات موجود در اسانس دارچین به شدت میزان رشد آن‌ها را کنترل کرد. بطورکلی محققین گزارش‌کردند که وجود رس‌های خوراکی در کنار آنتی بیوتیک‌ها برای کنترل منحنی رشد باکتری‌ها ضروری است. زیرا آن‌ها در بدن یکپارچگی مولکولی خود را حفظ می‌کند و تجزیه نمی‌شود و هنگام عبور از بدن، مانند جاروبرقی یا اسفنج عمل‌کرده و سموم را همراه خود از بدن، دفع می‌کند. شاید علت اصلی استفاده از رس در مهار بیماری‌ها ایجاد تعادل الکترولیتی و سم‌زدایی آن‌ها است که در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفته است و لازم است در پژوهش‌های آینده مورد کاوش قرار گیرد. لذا با عنایت به مضرات آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از داروهای نوترکیب با پایه اسانسی می‌تواند افق جدیدی در مهار و کنترل رشد باکتری‌های مولد اسهال باشد. با توجه به این که پژوهشی در مورد ترکیب نانورس و اسانس و اثر آن بر میکروارگانیسم‌ها در دام یا انسان در ایران صورت نگرفته، بنابراین بررسی‌های مقایسه‌ای در این تحقیق میسر نبود. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان حداقل غلظت مهاری اسانس دارچین برای باکتری سالمونلا ۰/۰۱درصد و برای باکتری اشریشیا کلی ۰/۰۲درصد بود. هم چنین ترکیب ۰/۰۱ درصد اسانس دارچین و ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانورس بنتونیت به عنوان کمترین غلظت بازدارنده برای باکتری سالمونلا بدست آمد. از طرفی کمترین غلظت بازدارنده برای باکتری اشریشیاکلی در ترکیب اسانس دارچین ونانورس بنتونیت به ترتیب ۰/۰۲ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نانورس به تنهایی نتوانست مانع از رشد باکتری شود. اما مطالعه منابع نشان داده است که رشد یا تجمع باکتری‌ها تحت تأثیر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی سطوح جامد مانند رس‌ها در اثر جذب می‌تواند تغییر کند. در این حالت رس به‌همراه باکتری جذب سطحی شده از بدن دفع می‌شود. شاید اثر مثبت نانورس‌ها در جذب باکتری‌ها زمانی مشخص می‌شد که نانورس بعد از اثرگذاری از داخل لوله آزمایش همانند فرایند دفع از بدن حذف می‌شد و میزان باکتری‌های موجود بعد از آن شمارش می‌شد. که در این تحقیق این نکته لحاظ نشده است.

در مطالعه انجام شده توسط اجاق و همکاران (۲۰۱۲)، حداقل غلظت بازدارنده اسانس دارچین در مقابل *Lactobacillus sakei*، ۲۵۰ mg/mL و برای سایر باکتری ها برابر ۵۰۰ µg/ml مشاهده شد (۹). در مطالعه انجام شده توسط موسوی و همکاران (۲۰۱۴)، حداقل غلظت بازدارنده اسانس دارچین به روش براث میکرودایلوشن در مقابل باکتری لیستریا-مونوسیتوژنز ۱۶۰µl/ml تعیین شد. تفاوت‌هایی که در میزان گزارش این شاخص (MIC) بر روی باکتری وجود دارد می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع سویه، دوز تلقیح و نوع محیط کشت باشد (۱۷). عطائی و همکاران

جدول ۱- حداقل غلظت بازدارنده (MIC) رشد باکتری به روش ماکرودایلوشن

باکتری	تیمارها	غلظت نانورس (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	غلظت اسانس (درصد)
سالمونلا	بنتونیت- دارچین	۱۲/۵	۰/۰۱
	اسانس دارچین	فاقد نانورس	۰/۰۱
اشریشیاکلی	بنتونیت- دارچین	۲۵	۰/۰۲
	اسانس دارچین	فاقد نانورس	۰/۰۲

(۱۳۹۲) اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر منحنی رشد و تولید شیگا توکسین۲ باکتری اشریشیا کلی $H_{۷}:O_{۱۵۷}$ را مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات ایشان نشان داد که اثر اسانس آویشن شیرازی بر رشد و تکثیر باکتری از الگوی وابسته به دوز پیروی می‌نماید. و نتیجه گرفتند که افزایش درجه حرارت تا حدودی باعث افزایش اثر اسانس بر رشد باکتری می‌شود. در این مطالعه نیز تیمار اسانس دارچین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باکتری را در زمان کمتری مهار کرده است. نتایج اثر مهارکنندگی تیمارهای مختلف در غلظت بازدارنده بر رشد باکتری اشریشیا کلی و سالمونلا در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد معنی‌داری تمام تیمارها را نشان می‌دهد ($p < ۰/۰۵$). بیشترین تأثیر معنی‌داری مربوط به تیمارهای بنتونیت-دارچین و کمترین تأثیر معنی‌داری مربوط به تیمارهای اسانس دارچین می‌باشد.

با انجام آزمون آماری نشان داده شد که تمام غلظت‌های بازدارنده، در مقایسه با گروه کنترل اثرات معنی‌داری در رشد باکتری‌های مورد مطالعه داشتند ($p < ۰/۰۵$). در این بررسی با آنالیز آماری داده‌ها مشخص شد که زمان، اسانس، ترکیب اسانس و نانورس اثر معنی‌داری بر رشد باکتری دارند. لگاریتم تعداد باکتری بطور معنی داری ($p < ۰/۰۵$) تحت تأثیر این فاکتورها می‌باشد. همان‌گونه که در شکل‌های (۲) و (۳) مشخص است، تیمارهای مورد مطالعه در مقایسه با گروه شاهد اثر مهاری قابل توجهی داشتند. اختلاف معنی‌داری در تعداد باکتری در اکثر ساعت‌های مطالعه، در مورد تیمارها و گروه شاهد مشاهده شد. در هر دو دما ترکیب نانورس و اسانس در مهار باکتری بهتر از اسانس به تنهایی اثر کرده است و باکتری را در ساعت اول مهار و از رشد آن تا ۲۴ ساعت جلوگیری کرده است. علت این امر را می توان خاصیت سم زدایی نانورس بیان کرد. تیمار اسانس دارچین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باکتری را در زمان کمتری مهار کرده است.

نتیجه‌گیری کلی

سالمونلا در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرارگرفت. غلظت بازدارنده این تیمارها از رشد باکتری تا ۲۴ ساعت جلوگیری کرده است. که حضور توأم رس و اسانس اثر مهاری بیشتری بر رشد باکتری داشت. به‌طور کلی با توجه به اثرات مثبت ترکیب نانورس و اسانس بر باکتری‌های اشریشیا کلی و سالمونلا، می‌توان در صورت موفقیت‌آمیز بودن تست‌های میدانی برای ساخت یک داروی جدید با پایه اسانسی، این ترکیب را مورد استفاده قرار داد. و همچنین با توجه به اثرات مثبت این ترکیب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، استفاده از این ترکیب به عنوان نگهدارنده مواد غذایی و یا به عنوان ضدعفونی کننده سطوح قابل مطالعه است.

منابع مورد استفاده

1. Ataee, M., Akhondzadeh, Basti A., Zahraei Salehi, T., Hosseini, H., Gandomi Nasrabadi, H., and Noori, N. 2013. Effect of Zataria multiflora Boiss. Essential Oil on Growth Curve and Shigatoxin 2 Production of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *JMP*. 4:48. 62-71.

2. Broomand, A., Hamedi, M., Emamjomeh, Z., Razavi SH, and Gholmakani MT. 2008. Investigation on the antimicrobial effects of essential oils from dill and coriander seeds on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimuruim*. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 4:1. 68-59.

3. Elvin-lewis, m. 2001. Should we be concerned about herbal remedies. *J Ethnopharmacol*. 75. 141-164.

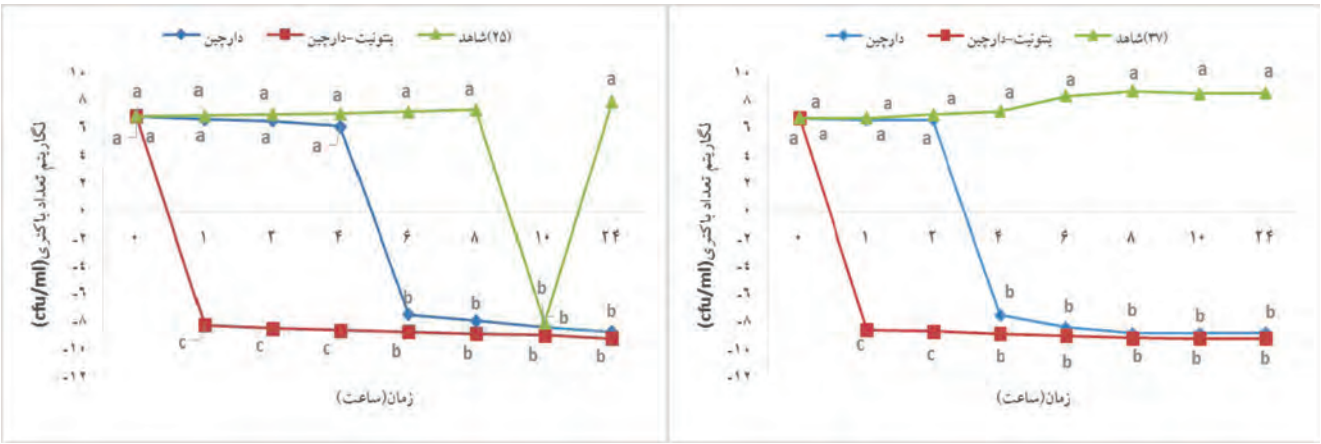
4. Mashak, Z., Moradi, B., and Moradi, B. 2012. The Combined Effect of *Zataria multiflora* Boiss. and *Cinnamomum zeylanicum* Nees. Essential Oil on the Growth of *Bacillus cereus* in a Food Model System. *JMP*. 2:42. 62-73.

5. Mohajerfar, T., Hosseinzadeh, A., Akhondzadeh Basti, A., Khanjari, A., Misaghi, A., and Gandomi Nasrabadi, H. 2012. Deter-

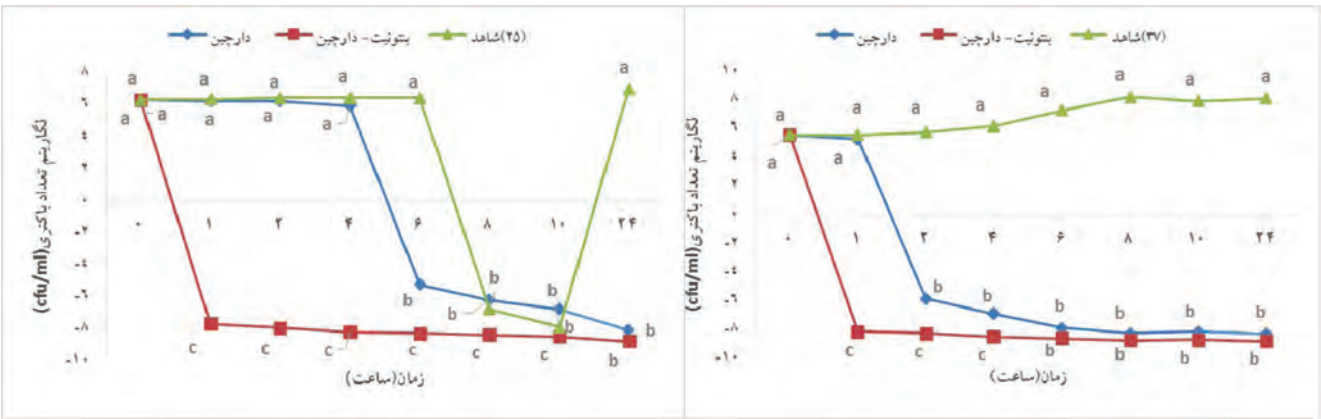
جدول ۲- تأثیر تیمارهای مختلف بر رشد باکتری‌های (میانگین لگاریتم تعداد باکتری) اشریشیاکلی و سالمونلا در دو دمای۲۵ و۳۷ درجه سانتی‌گراد

دما	باکتری	تیمارها		
		بنتونیت- دارچین	اسانس دارچین	شاهد
۲۵	اشریشیا کلی	-۶/۴۵۱a	-۰/۱۹۷b	۳/۰۵۰c
	سالمونلا	-۶/۷۴۲a	-۰/۷۷۲b	۵/۳۰۶c
۳۷	اشریشیا کلی	-۶/۷۸۴a	-۴/۳۱۹b	۶/۸۱۳c
	سالمونلا	-۶/۹۴۲a	-۲/۷۴۷b	۷/۷۷۶c

*مقدار($p < ۰/۰۵$) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شده است.*مقادیر با حروف غیرهمسان وجود اختلاف معنی‌دار($p < ۰/۰۵$).



شکل ۲- منحنی رشد باکتری سالمونلا در حضور اسانس دارچین وترکیب اسانس دارچین و بنتونیت در دو دمای ۲۵ (سمت چپ)و ۳۷(سمت راست)درجه سانتی‌گراد*مقادیر با حروف غیرهمسان وجود اختلاف معنی‌دار($p < ۰/۰۵$).



شکل ۳- منحنی رشد باکتری اشریشیاکلی در حضور اسانس دارچین وترکیب اسانس دارچین و بنتونیت در دو دمای ۲۵ (سمت چپ)و ۳۷(سمت راست)درجه سانتی‌گراد*مقادیر با حروف غیرهمسان وجود اختلاف معنی‌دار($p < ۰/۰۵$).

mination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil and Lysozim on *L. monocytogenes. JMP*. 4:44. 70-77.

6. Muktar*, Y., Mamo, G., Tesfaye, B., & Belina, D. (2015). A review on major bacterial causes of calf diarrhea and its diagnostic method. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 7(5), 173-185.

7. Naghdi Badi, H., and Makkizadeh, M. 2003. Review of common thyme. *JMP*. 3:7. 1-12.

8. Nourmohammadzadeh, F., Davoodi, Y., Jamali, R., and Nowrouzian, A. 2010. Epidemiological study on Cryptosporidiosis in Newborn Calves in Eastern Azarbaijan Province. *Journal of Veterinary Research.* 65:3. 247-254.

9. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., and Hosseini, S.M.H. 2012. Investigation of antibacterial activity cinnamon bark essential oil (*Cinnamomum zeylanicum*) in vitro antibacterial activity against five food spoilage bacteria. *Journal of Food Science and Technology.* 9:35. 67-76.

10. Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J., and Bégin, A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology.* 37. 155-162.

11. Ferrell, R. E. (2008). Medicinal clay and spiritual healing. *Clays and Clay Minerals*, 56(6), 751-760.

12. Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5484-5490.

13. Slamova, R., Trckova, M., Vondruskova, H., Zraly, Z., & Pavlik, I. (2011). Clay minerals in animal nutrition. *Applied Clay Science*, 51(4), 395-398.

14. Smith, G. W. (2009). Treatment of calf diarrhea: oral fluid therapy. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(1), 55-72.

15. Stoltenow, C., Dyer, N., & Stokka, G. (2013). Calf Diarrhea (aka Scours), Available online at: https://www.ag.ndsu.edu/publications/landing-pages/livestock/calf-diarrhea-aka-scours-v-1630. Accessed 18 September 2017.

16. Tahmouresi, M., sarafi, A., hosseini, S. M. S., iraj, M. A., & mirzaei, M. (2010). Evaluation of bentonite samples in kerman province. *Nashrieh shimi va mohandesi shimi iran (NSMSI).* 29: 2. 97-91.

17. Tajkarimi, M., & Ibrahim, S. A. (2011). Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on Escherichia coli O157: H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Control*, 22(6), 801-804.

18. Tateo, F., and Summa, V. 2007. Element mobility in clays for healing use. *Appl Clay Sci* 36: 64-76.

19. Trckova, M., Matlova, L., Dvorska, L., and Pavlik, I. 2004. Kaolin, bentonite, and zeolites as feed supplements for animals: health advantages and risks. A review. *Veterinarni Medicina-UZPI* (Czech Republic). 49: 10. 389-399.

20. Williams, L. B., Haydel, S. E., and Ferrell, J. r. 2009. Bentonite, bandaids, and borborygmi. *Elements* (Que). 5: 99-104.

21. Worker, S. B., Kielland, K., and Barboza, P. S. 2015. Effects of geophagy on food intake, body mass, and nutrient dynamics of snowshoe hares (*Lepus americanus*). *Can J Zool*. 93: 323-329.

22. Sera L. Young Paul W. Sherman Julius B. Lucks Gretel H. Pelto , "Why On Earth?: Evaluating Hypotheses About The Physiological Functions Of Human Geophagy," *The Quarterly Review of Biology* 86, no. 2 (June 2011): 97-120.