بررسی اثر ضدباکتریایی دو محصول اسیدیفایر داخلی و خارجی بر روی برخی باکتری‌های بیماری‌زای طیور

سیده زهرا موسوی[۱]، میترا ریاسی[۲]، علی جوادمنش[۳*]

[۱،۲،۳] گروه علوم دامی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

گسترش باکتری‌های مقاوم به دارو در صنعت طیور و انتقال آن به انسان، به نگرانی مهمی تبدیل شده است. بنابراین، استفاده از ترکیبات جایگزین با اثرات جانبی محدود مورد توجه قرار گرفتند که اسیدهای آلی و عصاره‌های گیاهی از جمله این موارد هستند. هدف از این مطالعه، بررسی خواص ضدباکتریایی یک اسیدی فایر داخلی (اسیدی فایراپتوسید) و مقایسه آن با یک اسیدی فایر وارداتی (فیتمکس) علیه سه باکتری *اشرشیاکلای*، *سالمونلا انتریتیدیس* و *کلستریدیوم پرفرنجنس* در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. ارزیابی pH انجام شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بررسی شد. میزان فراریت و همچنین فعالیت ضدباکتریایی در اثر اعمال حرارت ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در مدت زمان‌های ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. میزان pH برای دو محصول داخلی و وارداتی به ترتیب ۴/۱ و ۳/۹ بود. هر دو محصول داخلی و وارداتی بر روی سه باکتری مورد مطالعه فعالیت ضدباکتریایی نشان دادند که کمترین میزان MIC (۴ mg/mL) و MBC (۸ mg/mL) مربوط به محصول داخلی بر روی باکتری *اشرشیاکلای* بود. بررسی میزان اختلاف وزن بر اثر اعمال حرارت حاکی از این بود که دما بر فراریت اسید در محصول داخلی برخلاف وارداتی بی‌تاثیر بود. نتایج مربوط به بررسی اثر دما بر فعالیت ضدباکتریایی نشان داد که تا مدت زمان ۱۲۰ ثانیه، دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بر فعالیت این دو محصول اثر معنی‌داری نشان نداد. در نهایت این مطالعه نشان داد که محصول اسیدیفایر داخلی می‌تواند بعنوان محصول مناسبی برای کنترل باکتری‌های بیماری‌زای طیور مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اسیدهای آلی، MBC، MIC، عصاره‌های گیاهی، انتشار از چاهک

مقدمه

امروزه پرورش متراکم حیوانات بخصوص طیور سبب شده تا حساسیت آن‌ها نسبت به باکتری‌های بیماری‌زایی نظیر *اشرشیاکلای* و گونه‌های سالمونلا و کلستریدیوم افزایش یابد (۱۷). برای کنترل این مشکلات در خوراک از آنتی بیوتیک‌ها در مقادیر مختلف استفاده می‌شود. آنتی بیوتیک‌ها بمنظور درمان عفونت‌های باکتریایی تجویز می‌شوند و بر روی ویروس‌ها و قارچ‌ها بی تاثیر می‌باشند و از آن‌ها نیز بعنوان محرک رشد در صنعت طیور نیز استفاده می‌شود. بیشتر عوارض ناشی از مصرف آنتی بیوتیک‌ها، تهدید کننده نیستند، اما با این حال می‌توانند منجر به بروز مسائل جدی‌تری مانند ایجاد و انتقال سویه‌های مقاوم به دارو از دام به انسان و برهم خوردن فلور میکروبی سیستم گوارش انسان در اثر استفاده از فرآورده‌های دارای بقایای دارویی شوند (۲۷)، گزارش شده است که تا سال ۲۰۵۰؛ تعداد مرگ‌ومیر ناشی از مقاومت به آنتی‌بیوتیک به

۱۰ میلیون نفر می‌رسد که این میزان بیش‌تر از تمام مرگ‌ومیرهایی است که توسط سرطان در هر سال اتفاق می‌افتد (۳۳). به دنبال این وقایع اتحادیه‌ی اروپا و ایالت متحده‌ی آمریکا استفاده از آنتی بیوتیک‌ها را بعنوان محرک رشد طیور ممنوع کردند که تبعاتی همچون افزایش ضریب تبدیل و مشکلاتی مانند افزایش آنتریت نکروتیک را در پی داشت (۲۸). از این رو اقدامات زیادی در مورد جایگزین کردن ترکیبات دیگر با کمترین اثرات جانبی بجای آنتی بیوتیک‌ها انجام گرفت که می‌توان به استفاده از پپتیدها ضد میکروبی (۳۱) اسیدهای آلی، اسانس‌ها وعصاره‌های گیاهی اشاره کرد (۸).

از ترکیبات مناسبی که امروزه مورد توجه خاص قرار گرفته‌اند می‌توان به اسیدهای آلی اشاره کرد. در واقع اسیدهای آلی مخلوطی از چند اسید مختلف با فعالیت ضدمیکروبی بمنظور جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند که این ترکیبات از طرف اتحادیه‌ی اروپا نیز ایمن معرفی شدند. پژوهش‌های زیادی در مورد اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها در تغذیه طیور انجام گردید که نشان از اثرات این ترکیبات در حل مشکلات دستگاه گوارش و آلودگی‌های میکروبی داشت. همچنین از این ترکیبات بعنوان نگهدارنده‌ی خوراک سال‌ها مورد استقبال قرار گرفتند (۱۲). اسیدهای آلی به دو فرم جامد و مایع قابل دسترس می‌باشند. فرم مایع آن در ترکیب با آب در اختیار حیوان قرار می‌گیرد و فرم جامد آن بصورت مخلوط به جیره مصرف می‌گردد. با استفاده از روش‌هایی نظیر ناقل‌های مواد معدنی، استریفیه شدن با گلیسرول و نیز کپسوله شدن، اسیدهای آلی از جذب شدن در بخش‌های ابتدایی دستگاه گوارش محافظت می‌شوند (۱۰). بسیاری از اسیدها به عنوان نمک سدیم، پتاسیم یا کلسیم مورد استفاده قرار می‌گیرند که از مزایای آن‌ها می‌توان به بوی کم، استفاده آسان در هنگام تولید خوراک، خورندگی کمتر و محلول بودن در آب اشاره کرد (۹). مکانیسم عمل اسیدهای آلی به گونه‌ای است که این ترکیبات با تخریب دیواره‌ی باکتری و افزایش قدرت نفوذپذیری غشاء وارداتی آن‌ها بخصوص در باکتری‌های حساس به میزان اسیدیته به داخل باکتری‌ها نفوذ کرده و رشد این باکتری‌ها را کند و یا متوقف می‌کنند. شکل غیر قابل تفکیک اسید که لیپوفیلی می‌باشد، آزادانه در غشای نیمه نفوذپذیر سلول باکتری حرکت و به داخل آن نفوذ کرده و در محیط خنثی تفکیک می‌شود. پس از آن پروتون‌ها (H^+) در داخل باکتری جدا و آزاد می‌شوند و در نتیجه باعث کاهش pH در داخل سلول می‌گردند. در نهایت، واکنش‌های آنزیمی انتقال سیگنال گلیکولیز و مواد مغذی میکروب‌ها متوقف می‌شود و باعث می‌شود انرژی باکتری برای ایجاد تعادل pH هدر رود (۱۶). همچنین، آنیون‌های اسید به دام افتاده به ترکیبات سمی تبدیل می‌شوند و غشای باکتریایی را مختل می‌کنند و از این طریق باکتری نابود می‌شود. در مقابل، باکتری‌های مقاوم در برابر اسید مانند لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکترها می‌توانند عدم تعادل بین pH وارداتی و داخلی را تحمل کنند (۲۳).

گیاهان و ادویه‌جات از دوران باستان نه تنها به عنوان آنتی اکسیدان و مواد طعم دهنده، بلکه بعنوان ترکیبات ضد میکروبی در خوراک استفاده می شدند(۱, ۴, ۱۸, ۱۹). طی دو دهه گذشته، شواهد بسیاری نشان می دهند که گیاهان منابع غنی از متابولیت‌های مختلف ضد میکروبی هستند که بعنوان سیستم دفاعی برای محافظت از گیاه در برابر فشارهای بیوتیک (زنده) و غیر زنده (غیر زنده) عمل می‌کنند (۲۰). اکثر این متابولیت‌های ضد میکروبی نیز بعنوان ترکیبات GRAS (ایمن) بوده که برای استفاده بصورت خوراکی تأیید می‌شوند و عوارض جانبی ناچیزی را نشان می‌دهند که اهمیت اقتصادی ویژه‌ای را به آن‌ها می‌دهد (۲۹). عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی با دارا بودن ترکیبات موثر نظیر سینامالدهید، تیمول، کارواکرول و سایر نقش بسزایی را در فعالیت ضد باکتریایی این ترکیبات بازی می‌کنند (۲۵).

همچنین سولفات مس یک ترکیب ضد میکروب قوی دیگر است که در صنعت طیور مورد استقبال قرار گرفته است. مکانیسم عمل این ترکیب به گونه‌ای است که جاذبه الکترواستاتیک ایجاد شده بین یون مس و غشای پلاسما سبب باز و یا بسته شدن سلول‌های دیواره سلولی باکتری‌ها شده که این پدیده سبب تراوش یون های داخل سلولی و متابولیت های با وزن مولکولی کم از طریق تغییر در نفوذ پذیری غشا می‌شود. همچنین یون مس نیز وارد سلول باکتری شده و سبب از بین رفتن پلاسمید باکتری و در نهایت مرگ باکتری می‌شود (۳۵).

هدف از این مطالعه، بررسی خواص ضدباکتریایی دو محصول تجاری اسیدیفایر داخلی و وارداتی علیه سه باکتری *اشرشیاکلای*، *سالمونلا انتریتیدیس* و *کلستریدیوم پرفرنجنس* به‌عنوان رایج‌ترین باکتری‌های ایجاد کننده‌ی بیماری در صنعت طیور در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. همچنین میزان تاثیر دما (۸۰ درجه‌ی سانتی گراد که در فرایند ساخت پلت استفاده می‌شود) بر میزان فراریت اسید و فعالیت ضدباکتریایی این محصولات مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش

باکتری های مورد استفاده

بمنظور بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسیدی فایرهای تجاری، اسیدی فایر داخلی اپتوسید (حاوی فرمیک اسید، پروپیونیک اسید، فومارات سدیم، پروپیونات کلسیم، سولفات مس، سینامالدهید و سینامیک اسید) و اسیدی فایر وارداتی فیتمکس (حاوی لاکتیک اسید، سیتریک اسید، مالیک اسید، سولفات مس، سینامالدهید و کارواکرول) از باکتری‌های *اشرشیاکلای*، *سالمونلا انتریتیدیس و کلستریدیوم پرفرنجنس* استحصال شده از طیور بیمار از دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد (مشهد، ایران) استفاده گردید.

اندازه‌گیری pH

برای اندازه‌گیری pH از دستگاه pH متر (برینکمن متروم ۶۹۱، سوئیس) استفاده شد و پس از کالیبره کردن، با وارد کردن الکترود آن در محلول اندازه‌گیری انجام شد.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ی استریل از طریق روش براث میکرودایلوشن انجام گردید. ابتدا سه باکتری مورد نظر در محیط کشت مولرهینتون براث به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. OD آن‌ها توسط دستگاه اسپکتوفتومتری (بایوتک، آمریکا) اندازه گیری شد و زمانیکه به حدود ۱ رسید میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل 1×10^{8} cfu /ml به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. هر دو محصول اسیدفایر با آب دو با تقطیر مخلوط شدند و از فیلتر ۲۲ mm جهت استریل کردن استفاده شد. رقت های هر دو محصول تهیه شدند و سپس به اولین چاهک ۹۰ میکرولیتر از محصول اسیدیفایر اضافه گردید و پس از چند بار پیپت کردن از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک ۱۲ رقیق شدند (غلظت‌های هر چاهک به ترتیب در هر ردیف نسبت به ردیف بالایی به نصف کاهش یافت). از محیط کشت مولر هینتون براث بعنوان شاهد منفی استفاده شد تا

آلودگی احتمالی سبب بروز خطا نشود و همچنین از سوسپانسیون باکتری بعنوان شاهد مثبت استفاده گردید تا از شرایط مناسب کشت و رشد نرمال باکتری اطمینان حاصل شود. سپس، میکروپلیت در انکوباتور قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اعمال گردید. در نهایت، بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت چاهک ها توسط جذب نوری دستگاه خوانش‌گر پلیت الایزا (بایوتک، آمریکا) در طول موج ۶۰۰-۶۳۰ نانومتر خوانده شد. غلظتی بعنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) گزارش شد که در آن هیچ کدورتی مشاهده نگردید. برای اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از چاهک‌های فاقد کدورت، مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط استریل برداشته شد و بر روی محیط مولر هینتون آگار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. کمترین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها را بکشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۱).

بررسی میزان فراریت اسید

دو محصول داخلی و وارداتی تحت حرارت ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در مدت زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه قرار گرفتند و از طریق اختلاف وزن آن‌ها در زمان قبل و بعد از اعمال حرارت میزان فراریت اسید مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی مقاومت حرارتی از طریق انتشار از دیسک

از سوسپاتسیون میکروبی باکتری اشرشیاکلای با OD برابر با نیم مک فارلند استفاده شد که توسط سوآپ استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به میزان ۴۰ ماکرولیتر تلقیح گردید (۱۵). هر دو محصول اسیدفایر با آب دو بار تقطیر مخلوط شدند و از فیلتر ۲۲ میلی‌متر جهت استریل کردن استفاده شد. هر دو به ترتیب ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس به چاهک‌های ایجاد شده بر روی محیط کشت ریخته شدند. از محصول بدون اعمال حرارت بعنوان گروه شاهد مثبت و حلال بعنوان شاهد منفی استفاده گردید.

آنالیز آماری

کلیه مراحل آزمایشات در غالب طرح کاملا تصادفی با سه بار تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین ارائه گردید. از نرم افزار SAS به منظور تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین از آزمون توکی استفاده شد.

نتایج و بحث

ارزیابی pH برای دو محصول داخلی و وارداتی به ترتیب ۴/۱ و ۳/۹ بود. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی دو محصول اسیدیفایر تجاری وارداتی و داخلی بر روی سه باکتری مورد مطالعه در جدول (۱) نشان داده شده است. به طور کلی کمترین میزان MIC و MBC برای هر سه باکتری مورد مطالعه مربوط به محصول داخلی می باشد. کمترین مقدار MIC مربوط محصول داخلی (۴ mg/mL) بر روی اشرشیاکلای و کمترین MBC (۸ mg/mL) بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلای*

و *سالمونلا انتریتیدیس* بود. همچنین بیشترین میزان MIC و MBC مربوط به محصول وارداتی (۱۶ mg/mL و ۸ mg/mL) برای باکتری *کلستریدیوم پرفرنجنس* گزارش شد.

جدول۱. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی (mg/mL) دو محصول اسیدیفایر تجاری بر روی باکتری‌های بیماری‌زای طیور

باکتری ها	اسیدیفایر ۱ (داخلی)		اسیدیفایر ۲ (وارداتی)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
سالمونلا انتریتیدیس	۸ mg/ml	۸ mg/ml	۸ mg/ml	۱۶ mg/ml
اشرشیاکلای	۴ mg/ml	۸ mg/ml	۸ mg/ml	۱۶ mg/ml
کلستریدیوم پرفرنجنس	۸ mg/ml	۱۶ mg/ml	۱۶ mg/ml	۳۲ mg/ml

میزان فراریت دو محصول در اثر حرارت نیز از طریق اختلاف وزن آن‌ها در زمان قبل و بعد حرارت نشان داد که حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد تاثیر قابل توجهی را بر میزان فراریت اسید در محصول داخلی برخلاف محصول وارداتی ندارد.

جدول۲. نتایج مربوط به بررسی اثر حرارت (۸۰ درجه سانتی‌گراد) بر میزان فراریت اسید دو محصول تجاری بر روی باکتری اشرشیاکلای

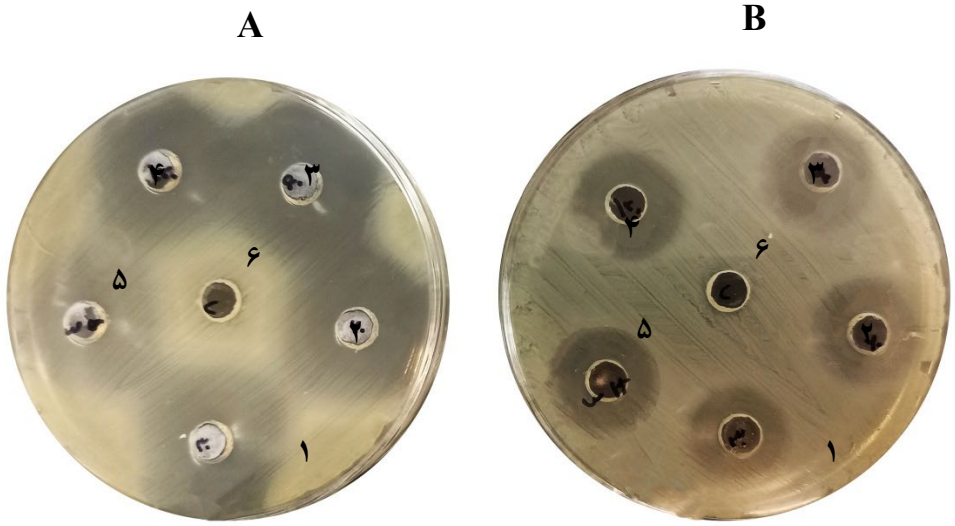
	۰ ثانیه (شاهد)	۳۰ ثانیه	۶۰ ثانیه	۹۰ ثانیه	۱۲۰ ثانیه	SEM	P-value
اسیدفایر ۱ (داخلی)	۱	۰/۹۸	۱	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۰۰۰۱	۰/۱۹
اسیدفایر۲ (وارداتی)	۱[a]	۰/۹۶[b]	۰/۹۷[b]	۰/۹۴[b]	۰/۹۶[b]	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۴

[b-a] میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک برای اثر تیمارها اختلاف معنی‌داری دارند.

نتایج قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری در شکل (۱) و جدول (۳) نشان داده شده است. نتایج نشان داد که دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در هیچ یک از زمان‌ها تاثیر معنی‌داری بر فعالیت هیچکدام از محصولات ندارد و آن‌ها فعالیت خود رو حفظ می‌کنند.

جدول ۳. نتایج مربوط به بررسی قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری (mm) بر اثر اعمال حرارت (۸۰ درجه سانتی‌گراد) بر فعالیت ضد باکتریایی دو محصول تجاری بر روی باکتری اشرشیاکلای

	شاهد منفی	شاهد مثبت	۳۰ ثانیه	۶۰ ثانیه	۹۰ ثانیه	۱۲۰ ثانیه	SEM	P-value
اسیدفایر ۱ (داخلی)	-	۲۳/۰۰	۲۶/۲۳	۲۲/۹۳	۲۳/۰۰	۲۳/۳۰	۰/۲۱	۰/۱۰
اسیدیفایر ۲ (وارداتی)	-	۱۶/۲۰	۱۶/۶۶	۱۶/۴۳	۱۶/۵۰	۱۶/۷۰	۰/۲۲	۰/۱۰



شکل ۱. آزمون انتشار از چاهک بمنظور بررسی اثر حرارت ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بر فعالیت ضد باکتریایی دو محصول اسیدیفایر (A: داخلی، B: وارداتی) در مدت زمان‌های:

۱- ۳۰ ثانیه ۲- ۶۰ ثانیه ۳- ۹۰ ثانیه ۴-۱۲۰ ثانیه ۵- ۰ ثانیه (شاهدمثبت) ۶-حلال بدون اسید (شاهد منفی)

بسیاری از مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که اسیدهای آلی و عصاره‌های گیاهی به دلیل طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد باکتریایی، جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌ها در صنعت پزشکی و دامپزشکی هستند (۳, ۵, ۲۴, ۳۴). اختلاف نظر در مورد فعالیت ضد باکتریایی (یعنی غلظت MIC گزارش شده در مطالعات مختلف) را می‌توان به تفاوت در جنبه‌های تکنیکی روش‌های مورد استفاده برای تخمین این فعالیت (۲) و همچنین گونه‌های باکتریایی متفاوت موجود در مطالعات توضیح داد (۳۲). در این مطالعه، فعالیت دو محصول تجاری داخلی و وارداتی در برابر سه باکتری مهم بیماری‌زا در صنعت طیور مورد ارزیابی واقع گردید.

نتایج این مطالعه اثر ضد باکتریایی هر دو محصول تجاری داخلی و وارداتی را علیه سه گونه باکتریایی مورد استفاده تأیید کرد. در واقع اسیدهای آلی زمانی می‌توانند به عنوان ترکیبات فعال در نظر گرفته شوند که MIC آن‌ها برابر یا کمتر از ۱۰۰۰ ppm باشد (۲۳, ۲۵) که MIC در این مطالعه برای هر دو محصول داخلی و وارداتی در این رنج می باشد. در این مطالعه محصول داخلی فعالیت بهتری را علیه هر سه گونه‌ی مورد مطالعه نشان داد که آن را می‌توان به تفاوت در نوع ترکیبات و اسیدهای آلی، همچنین درصد استفاده از آن‌ها در محصول اپتوسید نسبت داد. مطالعات نشان داده‌اند عبور مولکول‌های متوسط یا بزرگ از غشای وارداتی باکتری‌های گرم منفی برعکس باکتری‌های گرم مثبت دشوارتر است. علاوه براین، در باکتری‌های گرم منفی کانال‌های پروتئینی تعبیه شده در دولایه لیپیدی تنها اجازه انتشار ترکیبات با وزن مولکولی کم را می‌دهند (۲۲, ۳۰) بر این اساس، اسیدهای آلی همچون اسید فرمیک و اسید پروپیونیک با کوتاه‌ترین طول زنجیره بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را در برابر اشرشیاکلای و گونه‌های سالمونلا نشان می‌دهند که همراستا با مطالعه‌ی حاضر بود (وجود فرمیک و پروپیونیک اسید در محصول داخلی). همچنین پژوهشگران نشان دادند که نمک سدیم بطور موثری (16 ppm) بر روی باکتری کلستریدیوم پرفرنجس موثر است؛ اما مانع رشد اشرشیاکلای و سالمونلا نمی‌شود (تا غلظت

ppm ۵۰۰۰) که فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری کلستریدیوم پرفرنجس توسط محصول داخلی را می‌توان به وجود نمک سدیم در این محصول نسبت داد. همچنین نشان داده شده است که ترکیب اسیدهای آلی نیز جای اسیدهای تک ممکن است طیف وسیع‌تری از فعالیت ضد باکتریایی را نشان دهند (۲۶).

در این پژوهش، هر دو محصول اسیدیفایر دارای ترکیبات ضد میکروبی نظیر سولفات مس و عصاره‌های گیاهی می‌باشند. نتایج MIC و MBC در هر دو محصول در رنج خوبی قرار دارند که احتمالا علاوه بر تاثیر اسیدهای آلی به علت وجود این ترکیبات ضد میکروبی در کاهش باکتری های پاتوژن در این محصولات می‌باشد. در سال ۲۰۱۳، فعالیت ضد باکتریایی اسانس دارچین در برابر چندین سویه باکتری (*سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلا پاراتیفی*، *اشرشیاکلای*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس لچینیفرمیس* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که نمونه آزمایش شده در برابر تمام سویه های انتخاب شده فعالیت بسیار خوبی از خود نشان داد (مقادیر MIC بین ۲/۹ تا ۴/۸ mg/ml بود. بیشترین ماده موثره این ترکیب مربوط به سینامالدهید ۴/۳٪، و سایر ترکیبات شامل اوژنول (۰/۳۲٪) و مقادیر جزئی از کومینالدهید و γ- ترپینن بود (۲۱). محققین نشان دادند که افزودن ترکیباتی همچون سینامالدهید به اسیدهای آلی سبب بروز اثرات هم افزایی بر مهار سویه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی می‌شوند. سینامالدهید یک فنیل پروپن است و عمدتا به عنوان طعم دهنده استفاده می‌شود. این ترکیب به دلیل داشتن گروه آلدئید که به پیوند مضاعف کربن-کربن متصل شده است، الکترونگاتیویته زیادی دارد. این ترکیبات الکترونگاتیو ممکن است در فرآیندهای بیولوژیکی شامل انتقال الکترون دخالت کرده و با اجزایی همچون نیتروژن در پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش نشان دهند که ممکن است در نهایت منجر به مهار رشد میکروارگانیسم‌ها شود (۱۴). احتمال دیگر این است که آن‌ها موجب تشکیل شیف باز با پروتئین‌های غشایی شده و از این طریق از بیوسنتز جلوگیری می‌کنند (۷).با این حال، (۱۳) اثرات بر مهار تقسیم سلولی را مشاهده کردند (۶). سینامالدهید به FtsZ متصل شده و تشکیل حلقه Z سایتوکینتیک را مختل می کند. این مکانیسم به طور کلی منجر به کاهش بار باکتریایی می‌شود. با توجه به اثرات قوی سینامالدهید، تعجب‌آور نیست که هنگام ترکیب شدن با اسیدهای آلی، اثرات هم افزایی ایجاد شود (۲۶). همچنین گزارش شده است ترکیب اسیدهای آلی با اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی نیز اثرات مفیدی را مشابه با شرایط آزمایشگاهی در شرایط تجربی نشان دادند. اسیدهای آلی فعالیت خود را در خوراک و قسمت های فوقانی دستگاه گوارش و اسانس‌ها و عصاره‌ها بیشتر در قسمت انتهایی دستگاه روده فعالیت خود را اعمال می کنند (۲۶). همچنین محققین فعالیت ضد باکتریایی سولفات مس را نیز به اثبات رسانیده اند و اذعان داشتند که اسیدهای آلی اثرات هم افزایی را با این ترکیبات نشان داده اند (۳۵). این مطالعات می‌توانند تایید بر بهبود فعالیت اسید آلی در کنار ترکیباتی همچون سینامالدهید و سولفات مس باشند.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه فردوسی مشهد و شرکت افزودنی‌های دام و طیور رسپینا جهت حمایت و همکاری با این پژوهش کمال تشکر و قدرانی را به عمل می‌آوریم.

منابع

1- Alinezhad, H., R. Azimi, M. Zare, M. A. Ebrahimzadeh, S. Eslami, S. F. Nabavi and S. M. Nabavi. 2013. Antioxidant and antihemolytic activities of ethanolic extract of flowers, leaves, and stems of Hyssopus officinalis L. Var. angustifolius. *International journal of food properties* 16: 1169-1178.

2- Balouiri, M., M. Sadiki and S. K. Ibnsouda. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis* 6: 71-79.
3- Brenes, A. and E. Roura. 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal feed science and technology* 158: 1-14.
4- Curti, V., E. Capelli, F. Boschi, S. F. Nabavi, A. I. Bongiorno, S. Habtemariam, S. M. Nabavi and M. Daglia. 2014. Modulation of human miR-17–3p expression by methyl 3-O-methyl gallate as explanation of its in vivo protective activities. *Molecular nutrition & food research* 58: 1776-1784.
5- de Nova, P. J., A. Carvajal, M. Prieto and P. Rubio. 2019. In vitro susceptibility and evaluation of techniques for understanding the mode of action of a promising non-antibiotic citrus fruit extract against several pathogens. *Frontiers in microbiology* 10: 884.
6- Domadia, P., S. Swarup, A. Bhunia, J. Sivaraman and D. Dasgupta. 2007. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical pharmacology* 74: 831-840.
7- Friedman, M. 1996. Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 44: 631-653.
8- Gómez-García, M., C. Sol, P. J. de Nova, M. Puyalto, L. Mesas, H. Puente, Ó. Mencía-Ares, R. Miranda, H. Argüello and P. Rubio. 2019. Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria. *Porcine health management* 5: 1-8.
9- Huyghebaert, G., R. Ducatelle and F. Van Immerseel. 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal* 187: 182-188.
10- Irani, M., S. Gharahveysi, R. Rahmatian, M. Zamani and V. R. Pour. 2011. The effect of butyric acid glycerides on serum lipids and carcass analysis of broiler chickens. *African Journal of Biotechnology* 10: 11087-11092.
11- Javadmanesh, A., E. Mohammadi, Z. Mousavi, M. Azghandi and A. Tanhaiean. 2021. Antibacterial effects assessment on some livestock pathogens, thermal stability and proposing a probable reason for different levels of activity of thanatin. *Scientific reports* 11: 1-10.
12- Khan, S. H. and J. Iqbal. 2016. Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. *Journal of applied animal research* 44: 359-369.
13- Kwon, J., C. Yu and H. Park. 2003. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on Bacillus cereus. *Letters in applied microbiology* 37: 61-65.
14- Lis-Balchin, M. 2003. Feed additives as alternatives to antibiotic growth promoters: botanicals. Proceedings of the 9th international Symposium on Digestive Physiology in pigs, Banff AB, Canada University of Alberta, publisher. p. 333-352.
15- Mousavi, Z., A. Tanhaeian and A. Javadmanesh. 2021. Evaluation of antifungal properties of thanatin peptide and Chinaberry extract on bovine mastitis pathogens in vitro. *Veterinary Researches & Biological Products*.
16- Mroz, Z., S.-J. Koopmans, A. Bannink, K. Partanen, W. Krasucki, M. Øverland and S. Radcliffe. Section. 2006. Carboxylic acids as bioregulators and gut growth promoters in nonruminants. 81-133. Biology of growing animals. Elsevier;
17- Murry, A., A. Hinton and H. Morrison. 2004. Inhibition of growth of Escherichia coli, Salmonella typhimurium, and Clostridia perfringens on chicken feed media by Lactobacillus salivarius and Lactobacillus plantarum. *Int J Poult Sci* 3: 603-607.

18- Nabavi, S. F., M. Daglia, A. H. Moghaddam, S. Habtemariam and S. M. Nabavi. 2014. Curcumin and liver disease: from chemistry to medicine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13: 62-77.
19- Nabavi, S. F., S. M. Nabavi, S. Habtemariam, A. H. Moghaddam, A. Sureda, M. Jafari and A. M. Latifi. 2013. Hepatoprotective effect of gallic acid isolated from Peltiphyllum peltatum against sodium fluoride-induced oxidative stress. *Industrial Crops and Products* 44: 50-55.
20- Nabavi, S. M., A. Marchese, M. Izadi, V. Curti, M. Daglia and S. F. Nabavi. 2015. Plants belonging to the genus Thymus as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food chemistry* 173: 339-347.
21- Naveed, R., I. Hussain, A. Tawab, M. Tariq, M. Rahman, S. Hameed, M. S. Mahmood, A. B. Siddique and M. Iqbal. 2013. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against Salmonella and other multi-drug resistant bacteria. *BMC complementary and alternative medicine* 13: 1-10.
22- Nikaido, H. and M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews* 49: 1-32.
23- Pearlin, B. V., S. Muthuvel, P. Govidasamy, M. Villavan, M. Alagawany, M. Ragab Farag, K. Dhama and M. Gopi. 2020. Role of acidifiers in livestock nutrition and health: A review. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 104: 558-569.
24- Quitmann, H., R. Fan and P. Czermak. 2013. Acidic organic compounds in beverage, food, and feed production. *Biotechnology of Food and Feed Additives*: 91-141.
25- Ranasinghe, P., R. Jayawardana, P. Galappaththy, G. Constantine, N. de Vas Gunawardana and P. Katulanda. 2012. Efficacy and safety of 'true'cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) as a pharmaceutical agent in diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetic medicine* 29: 1480-1492.
26- Riemensperger, A. V., D. Bachinger, S. Schaumberger, R. Urbaityte and S. Pasteiner. 2012. The effect of an organic acid blend, cinnamaldehyde and a permeabilising substance on the inhibition of bacterial growth in vitro and growth performance of weaning pigs. *Vet Med Zootech* 60: 59-66.
27- Seidavi, A., M. Tavakoli, M. Slozhenkina, I. Gorlov, N. M. Hashem, F. Asroosh, A. E. Taha, M. E. Abd El-Hack and A. A. Swelum. 2021. The use of some plant-derived products as effective alternatives to antibiotic growth promoters in organic poultry production: a review. *Environmental Science and Pollution Research*: 1-13.
28- Shareef, A., Z. Jamel and K. Yonis. 2009. Detection of antibiotic residues in stored poultry products. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 23.
29- Simoes, M., R. N. Bennett and E. A. Rosa. 2009. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural product reports* 26: 746-757.
30- Stanojević-Nikolić, S., G. Dimić, L. Mojović, J. Pejin, A. Djukić-Vuković and S. Kocić-Tanackov. 2016. Antimicrobial activity of lactic acid against pathogen and spoilage microorganisms. *Journal of Food Processing and Preservation* 40: 990-998.
31- Tanhaeian, A., M. Azghandi, Z. Mousavi and A. Javadmanesh. 2020. Expression of thanatin in HEK293 cells and investigation of its antibacterial effects on some human pathogens. *Protein and peptide letters* 27: 41-47.
32- Vande Maele, L., M. Heyndrickx, N. De Pauw, M. Mahu, M. Verlinden, F. Haesebrouck, A. Martel, F. Boyen, D. Maes and F. Pasmans. 2013. In vitro sensitivity of Brachyspira

hyodysenteriae to organic acids and essential oil components. 6th Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans. p. 86-86.
33- Wang, S., X. Zeng, Q. Yang and S. Qiao. 2016. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *International journal of molecular sciences* 17: 603.
34- Yang, C., M. Chowdhury, Y. Huo and J. Gong. 2015. Phytogenic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application. *Pathogens* 4: 137-156.

35- Zhitnitsky, D., Rose, J., & Lewinson, O. (2017). The highly synergistic, broad spectrum, antibacterial activity of organic acids and transition metals. Scientific reports, 7(1), 1-13.