Archive of SID

مقاله پژوهشی

اثرات ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی علیه اشرشیاکلی O157: H7

ولی‌اله معصومی[۱]، حسین تاجیک[۲]، مهران مرادی[۳*]، مهرداد فروغ[۴]، نسیم شهابی[۵]

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۳/۰۶ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۶/۰۳

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: اشرشیاکلی O157: H7 باکتری بیماری‌زای مشترک بین انسان و حیوان بوده و یکی از مهم‌ترین عوامل باکتریایی منتقله از مواد غذایی است. این مطالعه باهدف بررسی خصوصیات ضدباکتریایی نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی علیه اشرشیاکلی O157: H7 در محیط آزمایشگاهی و مدل غذایی شیر پاستوریزه انجام گردید.

مواد و روش کار: نانوامولسیون اسانس به روش برگشت فاز تهیه و میانگین اندازه ذرات با استفاده از روش پراکنش نور دینامیک موردبررسی قرار گرفت. ویژگی‌های ضدمیکروبی نانوامولسیون به روش انتشار در آگار، انتشار در فاز بخار، حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی و رسم منحنی مرگ باکتری در محیط کشت BHI و شیر پاستوریزه (۱/۵ و ۳/۲ درصد چربی) در فواصل زمانی، صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه تعیین گردید.

یافته‌ها: میانگین اندازه ذرات، ۶۶/۵ نانومتر شد. متوسط قطر هاله‌ی مهاری رشد در روش انتشار در آگار، ۰/۴± ۸/۷۴ میلی‌متر و در روش انتشار در فاز بخار صفر گزارش گردید. همچنین حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشندگی ۲۵۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر گزارش گردید. اثرات سه رقت ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ نانوامولسیون بر میزان مرگ باکتری در محیط BHI براث بررسی و نشان داد شد که رقت ۰/۱ و ۰/۰۱ در ۶۰ دقیقه باعث کاهش ۶ سیکل لگاریتمی از باکتری گردید. رقت‌های اشاره شده، در شیر پاستوریزه ۱/۵ درصد چربی باعث کاهش تقریبی ۳/۵ سیکل لگاریتمی و در شیر پاستوریزه با ۳/۲ درصد چربی تقریباً در هر سه رقت کاهش ۲/۵ سیکل لگاریتمی در تعداد باکتری‌ها مشاهده گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه، می‌توان به این نتیجه رسید که در صورت بهینه‌سازی فرآیند تهیه نانوامولسیون، می‌توان ازاین‌روش به‌طور مناسبی در کنترل عوامل میکروبی بهره جست.

کلیدواژه‌ها: اشرشیاکلی O157: H7، نانوامولسیون، اسانس آویشن شیرازی، ضد میکروب

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره هفتم، ص ۶۱۷-۶۰۸، مهر ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی تلفن: ۰۴۴-۳۱۹۴۲۵۵۹

Email: m.moradi@urmia.ac.ir

مقدمه

آلودگی میکروبی مواد غذایی یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های بهداشت عمومی در دنیا است و غذا به‌عنوان منبع مهمی برای بیماری انسان و ایجاد خسارات اقتصادی به شمار می‌رود. اشرشیاکلی O157: H7 باکتری بیماری‌زای مشترک بین انسان و حیوان بوده و یکی از مهم‌ترین عوامل باکتریایی عامل بیماری با منشأ غذایی و منشأ آب است که طیف بیماری‌زایی از شکل بدون علامت و یا اسهال تا سندرم کشنده همولیتیک اورمیک را ایجاد می‌کند. بیماری‌زایی اشرشیاکلی ناشی از مصرف مواد غذایی در انسان اغلب مربوط به مصرف گوشت گاو آلوده و کامل پخته نشده است. از دیگر روش‌های انتقال این باکتری، شیر غیرپاستوریزه، پنیر حاصل از شیر خام و کره است (۴). باوجود استفاده مؤثر و گسترده از نگه‌دارنده‌های شیمیایی و ترکیبات ضدمیکروب سنتتیک برای پیشگیری از رشد اجرام بیماری‌زا در مواد غذایی، اثرات سوء این

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۲] استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۳] استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران(نویسنده‌ی مسئول)

[۴] دانشجوی دکتری شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۵] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

ترکیبات بر سلامت انسان و تولید مواد سمی و سرطان‌زا توسط آن‌ها همچنان دغدغه همه متصدیان بهداشت عمومی در دنیا است (۲۶). اسانس‌های گیاهی ترکیبات ضدمیکروب طبیعی هستند که خصوصیات ضدمیکروبی آن‌ها به‌طور وسیعی علیه باکتری‌های بیماری‌زا و فسادزای مواد غذایی موردمطالعه قرار گرفته است (۲۵). آویشن شیرازی، گیاهی درختچه‌ای و متعلق به تیره نعناعیان یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی است که گستره جهانی دارد. گیاهی پایا، با بوته‌هایی در پایه چوبی به ارتفاع ۸۰-۴۰ سانتی‌متر، پرساقه، گردینه پوش، سبز متمایل به سفید و معطر و دارای پوست خاکستری متمایل به سفید است. از گیاه به‌طور سنتی، به‌عنوان افزودنی و چاشنی در مواد غذایی استفاده می‌شود. این گیاه معطر ازنظر جغرافیایی بومی مناطق گرم کشورهای ایران، پاکستان و افغانستان است. این گیاه به نسبت وسیعی در ایران انتشار داشته و در بخش‌های مرکزی، جنوب و جنوب شرقی ایران دیده می‌شود. اسانس این گیاه، به‌دلیل داشتن ترکیبات مونوترپنی فنلی، یکی از مؤثرترین اسانس‌های گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی به شمار می‌رود. ازلحاظ شیمیایی و فارماکولوژیکی شباهت زیادی به آویشن باغی دارد (۲۳,۱۸). طبق اطلاعات موجود، اسانس آویشن شیرازی، حاوی درصد بالایی از تیمول و کارواکرول است که این ترکیبات، خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی دارند (۱۹).

اسانس‌ها زمانی که به مواد غذایی اضافه می‌شوند، حلالیت پایین آن‌ها در آب و اتصال هیدروفوبیک آن‌ها به ترکیبات غذایی ازجمله چربی و پروتئین، باعث کاهش فعالیت آن‌ها می‌گردد. روش‌های مختلفی برای جلوگیری از این کاهش انجام گرفته شده است که ازجمله آن‌ها می‌توان به انکپسولاسیون و تولید میکرو و نانوامولسیون اشاره نمود. استفاده از این روش‌ها باعث کاهش اثرات سوء ترکیبات غذایی و نیز توزیع مناسب اسانس در ماده غذایی می‌گردد (۲۵).

در منابع علمی، از امولسیونی با ذرات ریز در حدود ۱۰۰ نانومتر تحت عنوان نانوامولسیون یاد می‌کنند. نانوامولسیون اسانس به‌عنوان ترکیب ضدمیکروب خوب مطرح می‌باشد. این ویژگی به خاطر کاهش اندازه ذرات و افزایش سطح تماس اسانس با باکتری است (۱۱). جهت دستیابی به سیستم امولسیون با خاصیت ضد میکروبی خوب در نانوامولسیون‌ها، باید حداقل دو نیاز فراهم شود: امولسیون باید در طول مدت نگهداری ازنظر فیزیکی پایدار باشد و دارای خاصیت ضد میکروبی مؤثر باشند (۷). نانوامولسیون به دو روش با انرژی پایین و انرژی بالا تولید می‌شود. در روش با انرژی بالا از روش‌های مکانیکی ازجمله سونیکاتور و هموژنیزاتور استفاده می‌گردد. روش‌های با انرژی پایین به‌دلیل سادگی و ارزان بودن بسیار موردتوجه هستند. یکی از روش‌های تولید نانوامولسیون به روش انرژی پایین، روش برگشت فاز است (۱۲).

در سال‌های اخیر، با توجه به افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان به جنبه‌های کیفیت و ایمنی مواد غذایی، مواد ضدمیکروب طبیعی موردتوجه قرار گرفته‌اند. اسانس و دیگر ترکیبات گیاهی به‌دلیل طبیعی بودن و نداشتن اثرات سمی مشابه با ترکیبات شیمیایی، بیشتر موردتوجه قرار گرفته است. در رابطه با ترکیبات ضدمیکروب، انکپسولاسیون و تهیه نانوامولسیون می‌تواند باعث افزایش غلظت ترکیبات دارای فعالیت زیستی در غذا شود (۸). لذا این مطالعه باهدف بررسی ویژگی‌های ضد باکتریایی نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی تهیه‌شده به روش برگشت فاز علیه اشرشیاکلی در محیط آزمایشگاهی و شیر پاستوریزه با چربی متفاوت موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

گیاه آویشن شیرازی پس از خریداری از عطاری در شیراز و پس از شناسایی، اسانس آن به روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر تهیه گردید (۱۸). پس از آب‌گیری توسط پودر سولفات سدیم و استریل کردن، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در شیشه‌های مخصوص درب‌دار تیره رنگ نگهداری گردید.

تهیه و آماده‌سازی باکتری:

باکتری اشرشیاکلی ATCC 25922 O157: H7 از کلکسیون میکروبی بخش بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه دریافت و در کرایوتیوب دانه‌دار محتوی ماده نگه‌دارنده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌گردد. احیاء باکتری به روش دومرحله‌ای و داخل محیط کشت BHI براث مطابق روش استاندارد CLSI انجام گردید. برای به دست آوردن تعداد باکتری از روش تعیین جذب نوری در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفوتومتر ساخت شرکت پارماسیا[1] انگلستان استفاده گردید (۲۴).

تهیه نانوامولسیون:

از روش امولسیون‌سازی به روش برگشت فاز یا EPI و بر اساس فرمولاسیون ارائه‌شده توسط دوراته و همکاران (۲۰۱۵) نانو امولسیون تهیه و در دمای اتاق نگهداری می‌گردد. به‌این‌ترتیب که اسانس و توئین ۲۰، با استفاده از همزن مگنت‌دار با دور ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. سپس بافر سدیم فسفات (pH=7، ۵ mM) با سرعت جریان ۳/۵ میلی‌لیتر در دقیقه به آن

[1] Pharmacia

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

افزوده شد. مخلوط با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۶۰ دقیقه هم زده شد. محلول تهیه‌شده در دمای اتاق نگهداری گردید. اندازه‌گیری اندازه و توزیع ذرات نانوامولسیون، با استفاده از دستگاه پراکندگی دینامیکی نور DLS ساخت شرکت مالورن اینسترومنت[1] انگلستان و شماره مدل ZEN1600 در روز صفر تعیین گردید (۱۱).

ارزیابی خصوصیات ضد باکتریایی نانوامولسیون:

ارزیابی خصوصیات ضد باکتریایی در محیط جامد به روش انتشار در آگار:

میزان ۱۰۰ میکرولیتر باکتری با دوز تلقیح 10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر به روش سواب در BHI آگار کشت و سپس دیسک کاغذی ۶ میلی‌متری را در فواصل معین و در شرایط روی سطح پلیت قرار داده و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از اسانس خالص، اسانس ۵ درصد و نانو امولسیون اسانس آویشن شیرازی به آن اضافه و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، قطر هاله (میلی‌متر) تشکیل‌شده با کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری گردید (۶).

روش انتشار در فاز بخار[2]:

میزان ۱۰۰ میکرولیتر باکتری با دوز تلقیح 10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر به روش سواب در BHI آگار کشت، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر آگار نیمه مذاب روی قسمت داخلی مرکز درب پلیت ریخته و یک عدد کاغذ بلانک ۶ میلی‌متری را روی آگار داخل درب پلیت قرار داده و ۲۰ میکرولیتر از اسانس خالص، نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی روی کاغذ اضافه گردید. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، قطر هاله (میلی‌متر) تشکیل شده با کولیس دیجیتالی اندازه گرفته شد (۱۵).

ارزیابی خصوصیات ضدمیکروبی در محیط مایع:

تعیین MIC[3] و MBC[4]:

برای تعیین MIC و MBC نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی، از روش میکرودایلوشن با استفاده از پلیت ۹۶ خانه‌ای و روش CLSI استفاده گردید. باکتری موردنظر، ۱۸ ساعت قبل از انجام تست در محیط BHI براث کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. رقت‌های مختلف نانوامولسیون (رقت‌های ۳۱۲۵، ۶۲۵۰، ۲۵۰۰۰، ۵۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه گردید. همچنین رقت‌های مختلف اسانس با استفاده از توئین 5 درصد (رقت‌های ۳۱۲۵، ۶۲۵۰، ۲۵۰۰۰، ۵۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. در هر چاهک، ۱۶۰ میکرولیتر محیط کشت براث استریل اضافه (حداقل سه تکرار) و سپس ۲۰ میکرولیتر از باکتری ۱۸ ساعته (که دوز تلقیح آن 10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر می‌باشد) به آن اضافه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف اسانس و نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۳۰ ثانیه با ۲۵۰ دور در دقیقه شیک و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای تعیین MIC و MBC از روش چشمی، رنگ‌آمیزی با رزازورین ۰/۰۱ درصد و کشت و شمارش استفاده شد (۲۴).

منحنی زمان مرگ باکتری در محیط براث:

برای بررسی اثرات کشندگی و سرعت نابودکنندگی نانوامولسیون، در ۳ لوله‌آزمایش، ۸ میلی‌لیتر محیط براث BHI و ۱ میلی‌لیتر از کشت باکتری ۱۸ ساعته (دوز تلقیح 10^7 باکتری در میلی‌لیتر) تلقیح گردید. سپس با افزودن یک میلی‌لیتر از محلول نانوامولسیون به لوله‌ها، رقت‌های ۱/ ۰و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ تهیه شد. یک لوله به‌عنوان کنترل فاقد نانوامولسیون و یک لوله حاوی اسانس ۵ درصد در نظر گرفته شد. سپس لوله‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ در دقیقه انکوبه گردید و در فواصل زمانی صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه از هرکدام از لوله‌ها نمونه‌برداری و رقت‌سازی به روش ده‌تایی[5] در داخل آب پپتونه ۰/۱ درصد انجام و در پلیت‌های حاوی محیط کشت BHI آگار کشت خطی داده شد. سپس محیط‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. بعدازاین مدت تعداد باکتری‌های زنده شمارش و منحنی زمان مرگ باکتری رسم گردید (۱۴).

رسم منحنی مرگ در شیر پاستوریزه گاو:

شیر پاستوریزه با درصد چربی ۱/۵ و ۳/۲ درصد چربی از بازار خریداری و قبل از استفاده، به دمای محیط رسانده و به‌خوبی برای اختلاط چربی همگن شد. برای بررسی اثرات کشندگی و سرعت نابودکنندگی نانوامولسیون در ۳ لوله آزمایش، ۸ میلی‌لیتر شیر و ۱ میلی‌لیتر از کشت باکتری ۱۸ ساعته (دوز تلقیح 10^7 باکتری در میلی‌لیتر) تلقیح گردید. سپس با افزودن یک میلی‌لیتر از محلول نانوامولسیون به لوله‌ها، رقت‌های ۰/۱و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ تهیه شد. یک لوله به‌عنوان کنترل فاقد نانوامولسیون و یک لوله حاوی اسانس ۵ درصد در نظر گرفته شد. سپس لوله‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با

[1] Malvern Instrument

[2] Vapor phase diffusion tests

[3] Minimum Inhibitory Concentration

[4] Minimum Bacterocidal Concentration

[5] Ten-fold

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

دور ۱۵۰ در دقیقه انکوبه گردید و در فواصل زمانی صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه از هرکدام از لوله‌ها نمونه‌برداری و رقت سازی به روش ده‌تایی در داخل آب پپتونه ۰/۱ درصد انجام شد و در پلیت‌های حاوی محیط کشت سوربیتول مک کانکی آگار کشت داده شد. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و بعدازاین مدت تعداد باکتری‌های زنده شمارش و منحنی زمان مرگ باکتری رسم گردید (۱).

روش کار آماری:

آزمایش‌ها در حداقل سه تکرار انجام گردید. اطلاعات به‌دست‌آمده، توسط نرم‌افزار GraphPad(version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California (USA مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. تحلیل واریانس با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست مقایسه چندگانه Newman-Keuls post صورت گرفت. تعداد باکتری‌ها به‌صورت لگاریتمی محاسبه گردید.

یافته‌ها

خصوصیات ضد باکتریایی نانوامولسیون:

روش انتشار در آگار:

قطر هاله‌ی مهاری رشد باکتری اشرشیاکلی O157: H7 روش انتشار در آگار و روش انتشار فاز بخار اندازه‌گیری و به‌ترتیب در جداول شماره‌ی ۱ و ۲ آورده شده است. در روش انتشار در آگار، تفاوت معنی‌داری در اثربخشی نانوامولسیون روی باکتری مشاهده نگردید. در روش انتشار فاز بخار آن‌چنان‌که انتظار می‌رفت، نانوامولسیون به‌دلیل ماهیت پوشش‌دار خود، هیچ اثر ضدمیکروبی روی باکتری موردمطالعه نداشت.

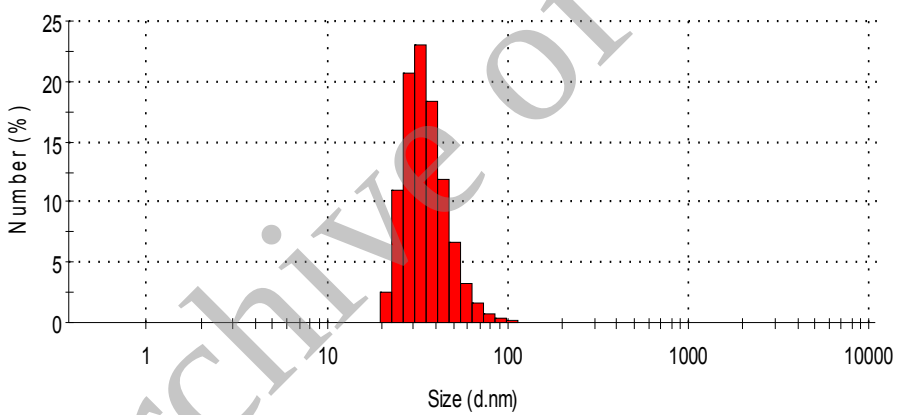
جدول(۱): متوسط قطر هاله (میلی‌متر) تشکیل شده در روش انتشار در آگار

نوع باکتری	اسانس خالص	اسانس۵ درصد	نانوامولسیون آویشن شیرازی
اشرشیا کلی O157: H7	۱۵/۸۶±۰/۳	۸/۷۴±۰/۴	۹/۷۲±۰/۳

تعیین اندازه ذرات نانوامولسیون:

میانگین اندازه ذرات محلول نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی تهیه‌شده به رنگ سفید مات، ۶۶/۵ نانومتر گزارش گردید. شکل ۱ ۲، به‌ترتیب نمونه‌ای از محلول نانوامولسیون و نمودار توزیع اندازه‌ی ذرات نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی را نشان می‌دهد.

شکل (۱): محلول نانوامولسیون تهیه‌شده به روش برگشت فاز



شکل (۲): اندازه و توزیع ذرات نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی.

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

جدول(۲): متوسط قطر هاله (میلی‌متر) تشکیل شده به روش انتشار فاز بخار

نوع باکتری	نانوامولسیون	اسانس خالص	اسانس ۵ درصد
اشرشیا کلیO157: H7	صفر	۲۷/۵۴ ± ۰/۴	صفر

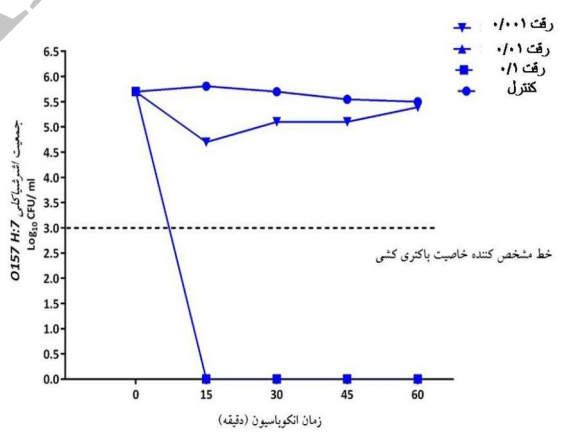
نتایج حاصل از ارزیابی خصوصیت ضدمیکروبی اسانس خالص و نانوامولسیون به روش MIC و MBC علیه اشرشیاکلیO157: H7 با استفاده از روش میکرودایلوشن در جدول شماره‌ی ۳، آورده شده است. در این روش، تفاوت معنی‌داری بین اثرات ضدمیکروب اسانس و نانوامولسیون مشاهده نگردید. علت یکسان شدن نتایج MIC و MBC ممکن است به‌دلیل فاصله زیاد رقت رقت‌های متوالی اسانس و یا نانوامولسیون است.

جدول(۳): نتایج حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

نوع باکتری	اسانس خالص (میکروگرم در میلی‌لیتر)		نانوامولسیون (میکروگرم در میلی‌لیتر)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
اشرشیا کلیO157: H7	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۲۵۰۰

منحنی مرگ دو باکتری در محیط BHI براث:

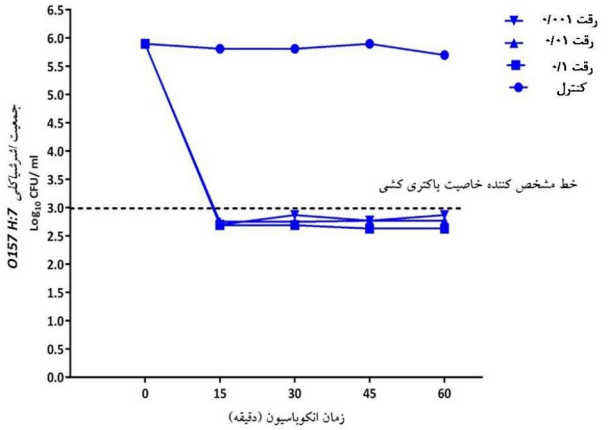
شکل ۳، ۴ و ۵ منحنی مرگ باکتری اشرشیاکلیO157: H7 در مجاورت اسانس و غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس در مدت‌زمان ۶۰ دقیقه به‌ترتیب در محیط کشت BHI براث، شیر پاستوریزه گاو ۱/۵ درصد چربی وشیر پاستوریزه گاو ۳/۲ درصد چربی را نشان می‌دهد. با توجه به رفتار باکتری در مقایسه نمونه‌ی کنترل، رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ باعث کاهش ۱۰۰ درصدی باکتری در ۱۵ دقیقه اول در محیط کشت BHI براث می‌شود. همچنین در این محیط، رقت ۰/۰۰۱ ابتدا باعث کاهش بیش از ۰/۵ سیکل لگاریتمی شده ولی بعدازآن تفاوت معنی‌داری با نمونه کنترل نشان نداد ($P > ۰/۰۵$). با توجه به شکل شماره ۴، اثر نانوامولسیون با رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ بر باکتری اشرشیا کلی O157: H7 در محیط شیر با درصد چربی ۱/۵، دارای اثر باکتریوسیدی (کاهش بیش از ۳ سیکل لگاریتمی باکتری) بر باکتری بوده‌اند و این سه رقت تفاوت معنی‌داری باهم نشان ندادند ($P > ۰/۰۵$). شکل ۵ اثر نانوامولسیون با سه رقت متفاوت بر باکتری موردنظر در محیط شیر پاستوریزه‌ی ۳/۲ درصد چربی است. سه رقت نانوامولسیون باعث کاهش بیش از ۲ سیکل لگاریتمی باکتری شده‌اند و این سه رقت تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند ($P >۰/۰۵$).



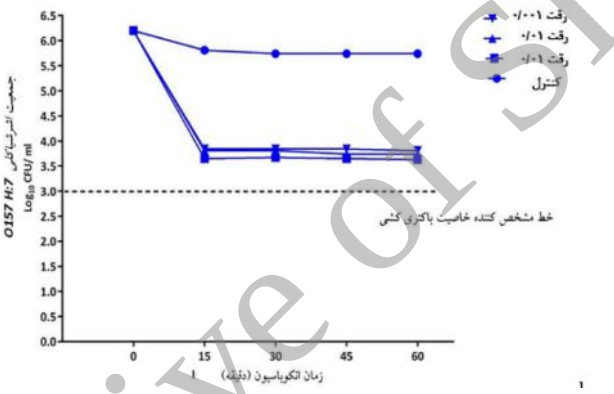
شکل (۳): منحنی مرگ باکتری اشرشیا کلی در محیط BHI براث در تیمار با نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID



شکل (۴): منحنی مرگ باکتری اشرشیا کلی در شیر پاستوریزه ۱/۵ درصد چربی در تیمار با نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی



شکل (۵): منحنی مرگ باکتری اشرشیا کلی در شیر پاستوریزه ۳/۲ درصد چربی در تیمار با نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی

بحث و نتیجه‌گیری

هرچه اندازه‌ی قطرات نانوامولسیون کوچک‌تر باشد، پایداری در برابر سدیمنتاسیون یا خامه‌ای شدن افزایش می‌یابد. مهم‌ترین عامل ناپایداری نانوامولسیون، استوالد رایپنینگ می‌باشد که با افزایش غلظت سورفکتانت کاهش می‌یابد. خواص فیزیکی اجزای تشکیل‌دهنده‌ی نانوامولسیون، نوع سورفکتانت و غلظت آن، روش آماده‌سازی، شرایط ذخیره‌سازی نقش مهمی در حفاظت نانوامولسیون از استوالد رایپنینگ دارد (۱۰). در مطالعه‌ای که پنگ و همکارانش در مورد پایداری ماندگاری و فعالیت‌های ضد باکتریایی نانولیپوزوم اوژنول تهیه شده به روش میکروفلودیزاسون انجام گرفته است، اندازه ذرات به‌دست‌آمده به‌طور متوسط ۳/۴±۵۸/۶ نانومتر شد(۱۶). در بررسی دیگری که توسط رامالیگان و همکاران در مورد خواص ضد میکروبی نانوامولسیون بر روی پلانکتون‌های عامل پوسیدگی و ارگانیسم‌هایی که تولید بیوفیلم می‌کنند انجام شد، اندازه ذرات نانوامولسیون تهیه شده ۳۰۸ نانومتر گزارش شد (۱۷).

در بررسی انجام شده توسط سارایانا و همکارانش که روی خواص ضد باکتریایی نانوامولسیون اسانس اکالیپتوس بر علیه پروتئوس میرابیلیس انجام شد اندازه ذرات نانو امولسیون تهیه شده به‌طور متوسط ۲۰ نانومتر شد (۲۰). تفاوت در اندازه ذرات نانو تهیه شده به علت تفاوت در انواع روش‌های تولید، خواص فیزیکوشیمیایی فاز پراکنده و فاز ثابت می‌باشد.

قطر هاله‌ی مهاری تشکیل شده توسط اسانس و نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی به دو روش انتشار در آگار و انتشار فاز بخار بر علیه اشرشیا کلیO157: H7 به روش انتشار در آگار اندازه‌گیری شد (جدول ۱). در مطالعه‌ای که توسط فاضلی و همکارانش در مورد اثرات ضدمیکروبی سماق ایرانی و آویشن شیرازی بر علیه باکتری‌های منتقله از غذا انجام گرفت، قطر هاله ممانعت رشد باکتری اشرشیاکلی به روش دیسک و فاز بخار به‌ترتیب، ۱۰ و ۲۲ میلی‌متر گزارش شد (۹). علت مقایسه نانوامولسیون با اسانس ۵ درصد به این دلیل است که میزان اسانس مورداستفاده در تهیه

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

نانوامولسیون، ۵ درصد است، لذا مقایسه اثرات ضدمیکروب نانوامولسیون با اسانس خالص منطقی نیست. در روش انتشار فاز بخار، به‌دلیل ماهیت نانوامولسیون که در آن قطرات اسانس توسط فاز آبی حاوی سورفکتانت پوشانده شده است، لذا اثرات ضدباکتریایی فاز فرار اسانس آن‌چنان‌که در خود اسانس خالص مشاهده گردید، در نانوامولسیون گزارش نشد.

در مطالعه‌ی دیگری که توسط شریفی‌فر و همکارانش در موردبررسی خواص آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی آویشن شیرازی انجام گرفت، قطر هاله منطقه ممانعت رشد به‌دست آمده برای باکتری ۱/۳±۹ میلی‌متر شد (۲۲). در مطالعه دیگری که توسط پنگ و همکارانش در مورد پایداری ماندگاری و خواص ضدباکتریایی نانولیپوزوم‌های اوژنول تهیه شده به روش میکروفلودیزاسیون انجام شد، قطر هاله یا منطقه ممانعت رشد در باکتری اشرشیاکلی O157: H7 در خود اسانس و نانولیپوزوم تهیه شده، به‌ترتیب ۰/۶±۱۵/۳ و ۱۰/۳ میلی‌متر شد (۱۶). تفاوت در میزان تاثیرگذاری اسانس را می‌توان مربوط به تفاوت در ترکیبات موجود در اسانس دانست. در مطالعه‌ای که توسط پنگ و همکارانش در مورد پایداری و خواص ضدباکتریایی نانولیپوزوم‌های اوژنول تهیه شده به روش میکروفلودیزاسیون انجام شد، قطر هاله حاصل از اسانس و نانولیپوزوم تهیه شده در باکتری اشرشیاکلی O157: H7 ، به‌ترتیب ۱۵/۳ و ۱۰/۳ میلی‌متر گزارش شد (۱۶). قطر هاله‌ی مهاری ایجاد شده با توجه به نوع و ترکیب هر اسانس و نوع باکتری متفاوت می‌باشد.

در مطالعه‌ی حاضر، میزان MIC و MBC اسانس آویشن شیرازی و نانوامولسیون، ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و تفاوتی بین اسانس خالص و نانوامولسیون مشاهده نگردید. در بررسی که توسط زو و همکارانش در مورد فعالیت‌های نانوامولسیون اسانس آویشن تهیه شده با سدیم کازئینات و لسیتین انجام گرفت، در باکتری اشرشیاکلی O157: H7 هم برای اسانس خالص و هم برای نانوامولسیون، MIC و MBC، ۰/۳۵ گرم بر لیتر به‌دست آمد (۲۵). در مطالعه‌ای که توسط پنگ و همکارانش در مورد پایداری و فعالیت‌های آنتی‌باکتریالی نانولیپوزوم‌های اوژنول با استفاده از روش میکروفلودیزاسیون انجام گرفت، MIC و MBC نانوامولسیون برای باکتری اشرشیاکلی به‌ترتیب ۱/۵ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای اسانس ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد (۱۶).

در بررسی انجام شده، تأثیر رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ محلول نانوامولسیون بر باکتری موردنظر در محیط BHI براث نشان داد که رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ از نانوامولسیون اثر باکتری‌سیدی داشته و بلافاصله بعد از زمان ۱۵ دقیقه تعداد باکتری‌ها به صفر رسید، ولی در رقت ۰/۰۰۱، تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشته است.

در مطالعه‌ی دیگری که توسط گوش و همکارانش در مورد ساخت و بررسی خواص باکتری‌کشی نانوامولسیون‌های خوراکی به روش امولسیفیکاسیون با اولتراسونیک انجام شد، تعداد باکتری‌های اشرشیاکلی در رقت ۰/۱ نانوامولسیون ریحان، در دقیقه‌ی ۴۵ و در رقت ۰/۰۱، در دقیقه‌ی ۶۰ صفر شد. اما در غلظت ۰/۰۰۱ تنها حدود ۲ سیکل لگاریتمی کاهش در تعداد باکتری‌ها مشاهده شد (۱۱). در مطالعه‌ای که توسط شاه و همکارانش در مورد تقویت خواص آنتی میکروبی نانوذرات اوژنول بر علیه اشرشیاکلی O157: H7 و لیستریا مونوسیتوژنز در شیرگاو انجام شد، به‌طوری‌که از سه غلظت اسانس ۳/۵، ۴/۵ و ۵/۵ برای تهیه نانوذرات استفاده شد. درنهایت در بررسی بقای باکتری اشرشیاکلی O157: H7 تحت تأثیر نانوذرات اوژنول در شیرهایی با درصد چربی متفاوت، مشخص شد که در شیر پس چرخ هر سه غلظت تأثیر داشته، اما در غلظت‌های ۴/۵ و ۵/۵ تعداد باکتری‌ها به صفر رسید. اما در شیر با چربی ۲ درصد و ۳/۵ درصد تنها در غلظت ۵/۵ تعداد باکتری‌ها به صفر رسید (۲۱).

در این مطالعه، رفتار باکتری اشرشیاکلی O157: H7 و منحنی مرگ آن در دو نوع شیر با درصد چربی ۱/۵ و ۳/۲ درصد که تحت تأثیر سه رقت متفاوت ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی قرار گرفت، بررسی شد. از تأثیر سه رقت نانوامولسیون در مدت‌زمان ۶۰ دقیقه در محیط شیر پاستوریزه با چربی ۱/۵ درصد به‌عنوان مدل غذایی، نشان داد که سه رقت، تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند ($P > 0/05$) و همه اثر باکتریوسیدی(کاهش بیش از ۳ سیکل لگاریتمی) بر باکتری داشته‌اند. اما بررسی منحنی مرگ در شیر پاستوریزه با چربی ۳/۲ درصد، نشان داد که در مدت‌زمان ۱۵ دقیقه، سه رقت ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱، باعث کاهش بیش از ۲ سیکل لگاریتمی باکتری گردیده و نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند ($P > 0/05$).

این مطالعه اولین مطالعه در خصوص تهیه و بررسی خصوصیات ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی است که انجام شده است. اثرات ضدمیکروبی نانوامولسیون، در محیط جامد و در محیط مایع بررسی گردید. در روش براث و رسم منحنی مرگ، نتایج بیانگر اثرات باکتریوسیدی بهتر نانوامولسیون روی باکتری در محیط شیر با چربی ۱/۵ درصد نسبت به محیط براث، در مدت‌زمان ۶۰ دقیقه بود. از طرف دیگر نشان داده شد که در BHI براث، رقت ۰/۱، ۰/۰۱ و اسانس ۵ درصد، محلول نانوامولسیون، تعداد باکتری‌های اشرشیاکلی را در زمان ۱۵ دقیقه به صفر رساند. در استفاده از شیر پاستوریزه به‌عنوان مدل غذایی، مشاهده شد که سه رقت نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی در شیر با چربی ۱/۵ درصد،

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

می‌تواند اثر باکتریوسیدی بر باکتری‌ها داشته باشد، اما در شیر با چربی ۳/۲ درصد، اثر هر سه رقت باعث کاهش تعداد باکتری‌ها به بیش از ۲ سیکل لگاریتمی شده که می‌توان به اثر محافظتی چربی شیر بر باکتری ربط داد. نتیجه کلی این مطالعه بیانگر آن است که نانومولسیون اسانس آویشن شیرازی تهیه شده به روش برگشت فاز، می‌تواند به‌عنوان یک ماده ضد باکتریایی مطرح شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به خاطر تأمین بودجه اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References:

1. Al-Adham I , Khalil E, Al-Hmoud ND, Kierans M, Collier PJ. Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems. J Appl Microbiol 2000; 89: 32-9.
2. Basti A, Misaghi A, Khaschabi D. Growth response and modelling of the effects of Zataria multiflora Boiss. essential oil, pH and temperature on Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus. LWT-Food Sci Technol 2007; 40(6): 973-81.
3. Bernardi D, Pereira T, Maciel N, Bortoloto J, Viera G, Oliveira G, et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. J Nanobiotechnology 2011; 9(1): 44.
4. Berry E and Wells J. Escherichia coli O157: H7: recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. Adv Food Nut Res 2010; 60: 67-117.
5. Bhargava K, Conti D, Da Rocha ST, Zhang Y. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. Food Microbiol 2015; 47(0): 69-73.
6. Moradi M, Tajik H, Razavi Rohani SM, Oromiehie A. Effectiveness of Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract impregnated chitosan film on ready-to-eat mortadella-type sausages during refrigerated storage. J Sci Food Agri 2011; 91: 2850-7.
7. Chang Y, McLandsborough L, McClements D. Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: influence of ripening inhibitors. J Agric Food Chem 2012; 60(48): 12056-63.
8. Donsi F, Annunziata M, Sessa M, Ferrari G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. LWT-Food Sci Technol 2011; 44: 1908-14.
9. Fazeli M, Amin G, Attari M, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (Zataria multiflora) against some food-borne bacteria. Food control 2007; 18(6): 646-9.
10. Gadhave, Ashish D. Nanoemulsions: Formation, Stability and ApplicationsInt J Res Sci Adv Technol 2014; 2(3): 38-43.
11. Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Formulation and characterization of plant essential oil based nanoemulsion: evaluation of its larvicidal activity against aedes aegypti. Asian J Chemistry 2013; 25 (Supplementary Issue): S321.
12. Landry K, Chang Y, McClements D, McLandsborough L. Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against Salmonella enterica Enteritidis and Escherichia coli O157: H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. Int J Food Microbiol 2014; 187: 15-21.
13. Moradi M, Tajik H, Rohani S, Oromiehie A, Malekinejad H, Aliakbarlu J, et al. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with

www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract. LWT-Food Sci Technol 2012; 46(2): 477-84.

14. Muhammad Shaiq A, Muhammad S, Zulfiqar A, Viqar Uddin A. Chemistry of Zataria multiflora (Lamiaceae). Phytochemistry 2000; 55: 933-6.
15. Nedorostova L, Kloucek P, Kokoska L, Stolcova M, Pulkrabek J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. Food Control 2009; 20(2): 157-60.
16. Peng S, Zou L, Liu W, Gan L, Liu W, Liang R., et al. Storage stability and antibacterial activity of eugenol nanoliposomes prepared by an ethanol injection–dynamic high-pressure microfluidization method. J Food Protect 2015; 78(1): 22-30.
17. Ramalingam K, Amaechi B, Ralph RH, Lee VA. Antimicrobial activity of nanoemulsion on cariogenic planktonic and biofilm organisms. Arch Oral Biol 2012; 57: 15-22.
18. Saei-Dehkordi SS, Tajik H, Moradi M, Khalighi-Sigaroodi F. Chemical composition of essential oils in Zataria multiflora Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. Food Chem Toxicol 2010; 48(6): 1562-7.
19. Sajed H, Sahebkar A, Iranshahi M. Zataria multiflora Boiss. (Shirazi thyme)—An ancient condiment with modern pharmaceutical uses. J Ethnopharmacology 2013; 145(3): 686-98.
20. Saranya S, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Antibacterial activity of Eucalyptus Oil nanoemulsion againest Proteus Mirabilis. Int J Pharmacy Pharmacu Sci 2012;4: 0975-1491.
21. Shah B, Davidson PM, Zhong Q. Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against Escherichia coli O157: H7 and Listeria monocytogenes in bovine milk. Int J Food Microbiol 2013; 161(1): 53-9.
22. Sharififar F, Mansouri M, Khodashenas M . In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic Zataria multiflora Bois. Food Control 2007; 18: 800-5.
23. Simbar M, Azarbad Z, Mojab F, Majid H. A comparative study of the therapeutic effects of the Zataria multiflora vaginal cream and metronidazole vaginal gel on bacterial vaginosis. Phytomedicine 2008; 15: 1025-31.
24. Wikler MA, Cockerill FR. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
25. Xue J, Davidson PM, Zhong Q. Antimicrobial activity of thyme oil co-nanoemulsified with sodium caseinate and lecithin. Int J Food Microbiol 2015; 210: 1-8.
26. Zhang Z, Vriesekoop F, Yuan Q, Liang H. Effects of nisin on the antimicrobial activity of d-limonene and its nanoemulsion. Food Chem 2014;150:307–12.

Archive of SID
www.SID.ir
www.SID.ir

Archive of SID

Original Article

ANTIMICROBIAL EFFECTS OF *ZATARIA MULTIFLORA* BOISS. ESSENTIAL OIL NANOEMULSION AGAINST *ESCHERICHIA COLI* O157:H7

Valiollah Masoomi[1], Hossein Tajik[2], Mehran Moradi [3], Mehrdad Forough [4], Nasim Shahabi[5]*

Received: 27 May, 2016; Accepted: 25 Aug, 2016

Abstract

Background & Aims: Escherichia coli O:H7 is a zoonotic pathogen and has been found as an important foodborne and waterborne microorganism. The objective of this study was to investigate the antimicrobial properties of *Zataria multiflora boiss*. essential oils nanoemulsion on *Escherichia Coli O157:H7* in pasteurized milk and in vitro.

Materials & Methods: The essential oil's nano-emulsion was prepared by inversion phase and its particle size distribution was analyzed by dynamic light scattering method. Nano-emulsion's antimicrobial properties in BHI and pasteurized milk (1.5 and 3.2 % fat) were investigated by different methods such as agar diffusion, vapor phase diffusion, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration, (MBC) and microbial inactivation curve after 0, 15, 30, 45, and 60 min.

Results: The average droplet size was 66.5 nm. The diameter of inhibition zone in agar diffusion method was 8.74±0.4 mm, and in the vapor phase diffusion zone was not formed measurable. And MIC and MBC were 2500 µL/ml. Effects of three nanoemulsion dilution 0.1, 0.01, 0.001 on microbial inactivation in BHI broth showed that in 0.1 and 0.01 dilution after 1 hour, 6 log reduction can be observed in microbial population. In pasteurized milk with 1.5% fat, in the dilutions mentioned above, decreased by approximately 3.5 log was observed in the growth of bacteria. In pasteurized milk containing 3.2% fat, about 2.5 log reduction in microbial population for all three dilutions.

***Conclusion*:** According to the results obtained in this study, we concluded that by optimizing this method, this nanoemulsion can be used to adequately control microbial pathogens.

Keywords: *Escherichia Coli O157:H7,* Nanoemulsion, *Zataria multiflora boiss*. Essential oil, antimicrobial.

Address: Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University

Tel: +984431942559

Email: m.moradi@urmia.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2016: 27(7): 617 ISSN: 1027-3727

Archive of SID

[1] *Master in Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*

[2] *Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*

[3] *Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)*

[4] *PhD Candidate in Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran*

[5] *Master in Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*

www.SID.ir
www.SID.ir