

خصوصیات ضد باکتریایی نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی تهیه شده به روش برگشت فاز

نسیم شهبابی^۱، حسین تاجیک^۲، مهران مرادی^{۳*}، مهرداد فروغ^۴

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳. دانشجوی دکتری شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول: moradi.mehran@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۱۷

چکیده

این مطالعه، با هدف تهیه نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی و بررسی خصوصیات ضدباکتریایی آن بر علیه سالمونلا تیفی موریوم و لیستریا مونوسیتوزنز انجام گرفت. میانگین اندازه‌ی ذرات نانوامولسیون تهیه شده به روش برگشت فاز با استفاده از توئین ۲۰، به روش پراکنش نور دینامیک، اندازه گیری و ۶۶/۵ نانومتر گزارش گردید. ویژگی‌های ضد میکروبی نانوامولسیون به روش انتشار در آگار، انتشار در فاز بخار، حداقل غلظت مانع از رشد، حداقل غلظت کشندگی و رسم منحنی مرگ بر علیه دو باکتری در مواجهه با نانوامولسیون در محیط کشت BHI تعیین گردید. متوسط قطر هاله‌ی مهارى رشد در روش انتشار در آگار، برای سالمونلا تیفی موریوم و لیستریا مونوسیتوزنز به ترتیب ۸/۳ و ۸/۵۴ میلی‌متر و در روش انتشار در فاز بخار برای هر دو باکتری صفر گزارش شد. حداقل غلظت مانع از رشد و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب در سالمونلا تیفی موریوم ۵۰۰۰، ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در لیستریا مونوسیتوزنز، ۲۵۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. اثرات سه رقت ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ نانوامولسیون بر میزان مرگ باکتری در فواصل زمانی صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ دقیقه بررسی و نشان داد که رقت ۰/۱ و ۰/۰۱ نانوامولسیون به ترتیب باعث کاهش ۶ و ۴ سیکل لگاریتمی باکتری سالمونلا تیفی موریوم و در مورد لیستریا مونوسیتوزنز، رقت ۰/۱، باعث کاهش ۴ سیکل لگاریتمی باکتری در زمان ۶۰ دقیقه گردید. می‌توان به این جمع‌بندی رسید که نانوامولسیون تهیه شده می‌تواند به عنوان یک ترکیب ضد میکروب مطرح باشد و در صورت بهینه سازی فرآیند تولید، می‌توان از این روش در کنترل عوامل میکروبی در مواد غذایی نیز بهره جست.

واژگان کلیدی: نانوامولسیون، اسانس آویشن، ضدباکتریایی.

مقدمه

به دلیل خواص عملکردی مناسب از جمله خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی به عنوان جایگزینی برای ترکیبات ضد میکروب شیمیایی برای مقابله با عوامل بیماری‌زا مطرح است (Chang et al., 2012). آویشن شیرازی^۱ گیاهی متعلق به تیره نعنائیان^۲ می‌باشد که به صورت خودرو در قسمت‌های مرکزی و جنوبی ایران، افغانستان و پاکستان رشد می‌کند. خواص شیمیایی و دارویی زیادی شبیه به تایموس ولگاریس^۳ دارد. طبق اطلاعات موجود، اسانس آویشن شیرازی، حاوی درصد بالایی از تیمول و کاراکرول است که این ترکیبات، خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی دارند. از دیگر

لیستریا مونوسیتوزنز و سالمونلا تیفی موریوم از مهم ترین عوامل بیماری‌زای منتقله از مواد غذایی هستند که سالانه خسارات اقتصادی زیادی به بار می‌آورند. لذا پیشگیری و کنترل این عوامل و دیگر عوامل بیماری‌زا در محصولات غذایی از اهمیت شایانی برخوردار است (Bhargava et al., 2015). یکی از رویکردهای جدید در جهت ارتقاء سلامت میکروبی غذا و به دنبال آن افزایش سطح سلامت عمومی، فشار برای جایگزینی سریع نگهدارنده های شیمیایی و استفاده از نگهدارنده های طبیعی می‌باشد. از جمله ترکیبات طبیعی که می‌توانند به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی به کار گرفته شوند، اسانس‌ها هستند. اسانس‌های گیاهی، متابولیت‌های ثانویه، آروماتیک و هیدروفوب گیاهی هستند که

1. *Zataria multiflora* var. *elatior* Boiss

2. Lamiaceae

3. *Thymus vulgaris*

از این ترکیبات طبیعی در مواد غذایی به خصوص مواد آشامیدنی محدودیت داشته باشد (Liang et al., 2012). یک راهکار پیشرو برای غلبه بر این مشکل و استفاده بهینه از اسانسها در مواد غذایی، انکپسولاسیون اسانس به روش امولسیون روغن در آب (o/w) یا تهیه نانوامولسیون است. پس از انکپسولاسیون، ترکیبات ضد میکروب لیپوفیل اسانس را به راحتی می توان در مواد غذایی به خصوص آشامیدنی استفاده نمود. از این روش برای ترکیبات مهم دیگر از جمله مواد ضدتومور، ویتامینها و دیگر ترکیبات ضد میکروب نیز استفاده می گردد (Chang et al., 2012). هدف این مطالعه، تهیه نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی و ارزیابی اثرات ضد میکروبی آن بر علیه دو باکتری سالمونلا تیفی موریوم و لیستریا مونوسیتوزنز در شرایط آزمایشگاهی است.

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. اسانس، پس از آبگیری با سولفات سدیم و استریل کردن با استفاده از فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی، در دمای ۴ درجه سانتیگراد در شیشههای مخصوص دربدار تیره رنگ نگهداری گردید. جهت شناسایی و تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه، از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیفسنج جرمی به روش ساعی دهکردی و همکاران (۲۰۱۰) استفاده شد (Saei-Dehkordi et al., 2010).

تهیه و آماده سازی باکتری

باکتریهای مورد استفاده، ایزوله کلینیکی سالمونلا تیفی موریوم ST41 و لیستریا مونوسیتوزنز ATCC 19115 است که از کلکسیون میکروبی بخش بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه

ترکیبات اصلی در اسانس، پی-سایمن^۱ است که نقش ضد میکروبی بسیاری دارد. با بررسی توسط میکروگراف-های الکترونی مشخص شد که این ترکیبات طبیعت لیپوفیلیک دارند و باعث آسیبهای مورفولوژی روی غشای سلولی می شوند که در نتیجه نفوذپذیری غشاء و خارج شدن محتوای سلول افزایش می یابد (Sajed et al., 2013). امولسیون، مخلوط دو فاز مایع غیر قابل امتزاج و معلق در یکدیگر است. امولسیون بسته به فاز پخش شونده به دو دسته تقسیم می شوند: روغن در آب (O/W) که در آن قطرات روغن در آب حل شده است و آب در روغن (W/O) که در آن آب در روغن معلق هستند. سیستمهای امولسیونی مورد استفاده برای انتقال ترکیبات، به دو دسته ماکرو امولسیون معمولی و نانوامولسیون تقسیم می شوند (Chang et al., 2012). امولسیون معمولی و نانوامولسیون در بیشتر خصوصیات از جمله ترکیب، ساختار و خصوصیات ترمودینامیکی شبیه بهم هستند، فقط به خاطر تفاوت در اندازه ذرات، برخی خصوصیات متفاوت از هم نشان می دهند. اندازه ذرات نانوامولسیون بسیار کمتر از طول موج نور است، لذا نور را شدید پخش نکرده در نتیجه شفاف بوده و یا تا حدودی کدر هستند (Chang et al., 2013). نانوامولسیونها کاربردهای عملی بسیاری در ساخت مواد شیمیایی، دارویی و آرایشی و بهداشتی دارد. در صنایع آرایشی و بهداشتی از روغن سبوس برنج در فرمولاسیون کرمهای ضد آفتاب، ضد پیری و درمان بیماریهای پوستی استفاده می شود. اندازه قطرات در نانوامولسیونها حدوداً ۵۰۰-۲۰ نانومتر می باشد. اندازه و پخش پذیری نانوامولسیونها می تواند روی ویژگیهای ذرات مانند پایداری اندازه، رئولوژی، رنگ، بافت و زمان ماندگاری اثر بگذارد (Bernardi et al., 2011). متأسفانه برخی خصوصیات از جمله حلالیت پایین در آب، فرار بودن و بوی قوی اسانسها باعث شده استفاده

1. p-Cymene

ارزیابی خصوصیات ضد باکتریایی در محیط جامد(روش انتشار در آگار)

متعاقب تهیه باکتری با دوز تلقیح 10^6 باکتری در هر میلی لیتر (تنظیم دوز با استفاده از اسپکتوفتومتری با طول موج ۶۰۰ نانومتر)، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به روش سواب در BHI آگار کشت و سپس دیسک کاغذی ۶ میلی متری استریل را در فواصل معین توسط پنس استریل کنار شعله روی سطح پلیت قرار داده و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از اسانس خالص، اسانس ۵ درصد از آنجا که غلظت اسانس در نانوامولسیون ۵ درصد است لذا تیمار اسانس ۵ درصد نیز برای مقایسه انتخاب گردید. از دیسک‌های آنتی بیوتیک آمپی سیلین ۱۰ میکروگرم و کلرآمفنیکل ۳۰ میکروگرم به عنوان کنترل استفاده شد پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، قطر هاله (میلی متر) تشکیل شده با کولیس دیجیتالی اندازه گیری گردید (Buncic et al., 1997).

روش انتشار در فاز بخار^۶ متعاقب تهیه باکتری با دوز تلقیح 10^6 باکتری در هر میلی لیتر (تنظیم دوز با استفاده از اسپکتوفتومتری با طول موج ۶۰۰ نانومتر)، ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری به روش کشت سطحی در BHI آگار تلقیح، سپس مقداری محیط آگار نیمه مذاب روی قسمت داخلی مرکز درب پلیت ریخته و یک عدد کاغذ بلانک ۶ میلی متری استریل را روی آگار داخل درب پلیت قرار داده و ۲۰ میکرولیتر از اسانس خالص، اسانس ۵ درصد و نانوامولسیون اسانس روی کاغذ اضافه گردید. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، قطر هاله (میلی متر) تشکیل شده با کولیس دیجیتالی اندازه گرفته شد (Nedorostova et al., 2009).

ارومیه دریافت گردید. علت انتخاب این دو باکتری به دلیل اهمیت آنها در مواد غذایی و قابلیت ایجاد بیوفیلم در هر دو گونه بود. باکتری در کرایوتیوب دانه دار محتوی ماده نگه دارنده در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری و به روش دو مرحله ای و داخل محیط کشت BHI^۱ براث به تجدید کشت شد، به طوری که باکتری دو بار متوالی در محیط کشت BHI براث به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد (Wikler and Cockerill, 2008). برای تعیین تعداد باکتری از روش تعیین جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر ساخت شرکت پارماسیا^۲ انگلستان استفاده گردید.

تهیه نانوامولسیون

برای این منظور، از روش امولسیون سازی به روش برگشت فاز یا EPI^۳ و بر اساس فرمولاسیون ارائه شده توسط دورانه و همکاران (۲۰۱۵) تهیه و در دمای اتاق نگهداری می گردد. به این ترتیب که ۵ گرم اسانس و ۵ گرم توئین ۲۰، ابتدا با استفاده از همزن مگنت دار با دور ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. سپس بافر سدیم فسفات (۵ mM, pH=7) به میزان ۹۰ میلی لیتر با سرعت جریان ۳/۵ میلی لیتر در دقیقه به آن افزوده شد. مخلوط با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه هم زده شد. محلول تهیه شده در دمای اتاق نگهداری گردید. اندازه گیری اندازه و توزیع ذرات نانوامولسیون، با استفاده از دستگاه پراکندگی دینامیکی نور^۴ DLS ساخت شرکت مالورن اینسترومنت^۵ انگلستان و شماره مدل ZEN1600 تعیین گردید (Duarte et al., 2015).

ارزیابی خصوصیات ضد باکتریایی نانوامولسیون

1. Brain Heart Infusion
2. Pharmacia
3. emulsion phase inversion
4. Dynamic Light Scattering Technique
5. Malvern Instrument

6. Vapor phase diffusion tests

انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ در دقیقه انکوبه گردید و در فواصل زمانی صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه از هر کدام از لوله‌ها نمونه برداری و رقت‌سازی انجام و در پلیت‌های حاوی محیط کشت BHI آگار کشت داده شد. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. بعد از این مدت تعداد باکتری‌های زنده شمارش و منحنی زمان مرگ باکتری رسم گردید (Al-Adham et al., 2000).

روش کار آماری

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

نتایج

ترکیبات شیمیایی اسانس

بر اساس آنالیز ترکیبات اسانس آویشن شیرازی با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی، عمده ترین ترکیبات تشکیل دهنده ی اسانس، شامل تیمول (۴۴/۵ درصد)، گاما ترترپینن (۱۶/۱۲ درصد)، پی سیمن (۹/۱۳ درصد)، بتامیکرن (۶/۵ درصد)، آلفا تیوجن (۳/۷۱ درصد)، لینالول (۲/۷۶ درصد) و کارواکرول (۲/۴ درصد) بود. تعیین اندازه ذرات نانوامولسیون

شکل ۱، محلول نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی تهیه شده به رنگ سفید مات را نشان می‌دهد. اندازه ی ذرات محلول نانوامولسیون توسط روش پراکندگی دینامیکی نور اندازه گرفته شد. شکل ۲، توزیع اندازه ی ذرات نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی را نشان می-

ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی در محیط مایع

تعیین MIC^۱ و MBC^۲

برای تعیین MIC و MBC نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی، از روش میکرودايلوشن با استفاده از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. باکتری، ۱۸ ساعت قبل از انجام تست در محیط BHI براث کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. غلظت‌های مختلف اسانس خالص و نانوامولسیون اسانس شامل ۳۱۲۵، ۶۲۵۰، ۲۵۰۰۰، ۵۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. ابتدا در هر چاهک میکروپلیت، ۱۶۰ میکرولیتر محیط کشت BHI براث استریل اضافه (در حداقل سه تکرار) و سپس ۲۰ میکرولیتر از باکتری ۱۸ ساعته (که دوز تلقیح آن ۱۰^۷ 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 افزوده شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در ۲۵۰ دور در دقیقه هم‌زده شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای تعیین MIC و MBC از روش چشمی، رنگ آمیزی با رزازورین ۰/۰۱ درصد و کشت و شمارش استفاده شد (Wikler and Cockerill, 2008).

منحنی زمان مرگ باکتری در محیط براث

برای بررسی اثرات کشندگی و سرعت نابودکنندگی نانوامولسیون، در ۳ لوله آزمایش، ۸ میلی‌لیتر محیط براث BHI و ۱ میلی‌لیتر از کشت باکتری ۱۸ ساعته (دوز تلقیح ۱۰^۷ باکتری در میلی‌لیتر) تلقیح گردید. سپس با افزودن یک میلی‌لیتر از محلول نانوامولسیون به لوله‌ها، رقت‌های ۱/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ تهیه شد. یک لوله به‌عنوان کنترل فاقد نانوامولسیون و یک لوله حاوی اسانس ۵ درصد نیز در نظر گرفته شد. لوله‌ها در

1. Minimum Inhibitory Concentration
2. Minimum Bactericidal Concentration

تماس، باعث کاهش ۱۰۰ درصدی جمعیت اولیه باکتری گردید.

بحث

اثرات آنتی اکسیدانی و آنتی بیوتیکی اسانس‌های گیاهی و همچنین قابلیت همراهی آن‌ها با سایر ترکیبات نگهدارنده مانند پوشش‌های مورد استفاده برای نگهداری مواد غذایی، تحقیقات اخیر را به سمت بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس و عصاره گیاهان دارویی در محیط آزمایشگاهی و همچنین در مواد غذایی به جهت کنترل اکسیداسیون مواد غذایی و همچنین کنترل بیماری‌های غذازاد سوق داده است (Ali et al., 2000). عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس مورد استفاده در این تحقیق تیمول می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط ساعی دهکردی و همکارانش در مورد ترکیب شیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد-میکروبی اسانس آویشن شیرازی جمع آوری شده از نقاط مختلف ایران، ترکیبات اصلی اسانس به ترتیب میزان مربوط به تیمول، گاما ترپنین، پی سیمن و کارواکرول گزارش شد (Saei-Dehkordi et al., 2010). شد، تیمول (۶۴/۸۷ درصد)، گاما ترپنین (۹/۱۱ درصد)، پی سیمن (۵/۶۳ درصد) و کارواکرول (۴/۶۶ درصد) به عنوان ترکیبات اصلی اسانس آویشن شیرازی گزارش گردیدند (Moradi et al., 2012). تحقیقات ذکر شده در بالا با نتایج بدست آمده در بررسی حاضر که نشان داد تیمول ماده موثره اصلی اسانس آویشن شیرازی است مطابقت دارد. با این وجود، در مطالعه‌ای که توسط بستی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شد، کارواکرول به میزان ۷۲/۱۲ درصد به-عنوان ترکیبات اصلی گزارش گردید (Basti et al., 2007). اختلافات موجود در اجزای تشکیل دهنده اسانس یک گونه گیاه می‌تواند به علت تفاوت در منطقه جغرافیایی که گیاه از آن برداشت شده، تغییرات خاک،

دهد. با توجه به نتایج، میانگین اندازه ذرات $66/5^1$ نانومتر و شاخص پلی‌دیسپرسیتی $0/21^2$ بود.

خصوصیات ضد باکتریایی نانوامولسیون

روش انتشار در آگار

قطر هاله‌ی مهاری رشد باکتری تشکیل شده در روش انتشار در آگار (برحسب میلی‌متر) و روش انتشار فاز بخار بر علیه دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت به-ترتیب در جدول ۱ و ۲ آورده شده است. در روش انتشار در آگار، تفاوت معنی‌داری در اثر بخشی نانوامولسیون روی دو باکتری گرم مثبت و منفی مشاهده نگردید. در روش انتشار فاز بخار آنچنان که انتظار می‌رفت، نانوامولسیون به دلیل ماهیت پوشش دار خود، هیچ اثر ضد میکروبی روی باکتری‌های مورد مطالعه نداشت. در جدول شماره‌ی ۳، نتایج حاصل از ارزیابی خصوصیت ضد میکروبی اسانس خالص و نانوامولسیون به روش MIC و MBC علیه لیستریا مونوسیتوزنز، سالمونلا تیفی‌موریوم با استفاده از روش میکروداپلوشن آورده شده است. در این روش، اثرات نانوامولسیون روی باکتری گرم مثبت قوی‌تر از باکتری گرم منفی بود و تفاوت معنی‌داری بین اثرات ضد میکروبی اسانس نانوامولسیون مشاهده نگردید.

منحنی مرگ دو باکتری در محیط BHI برات

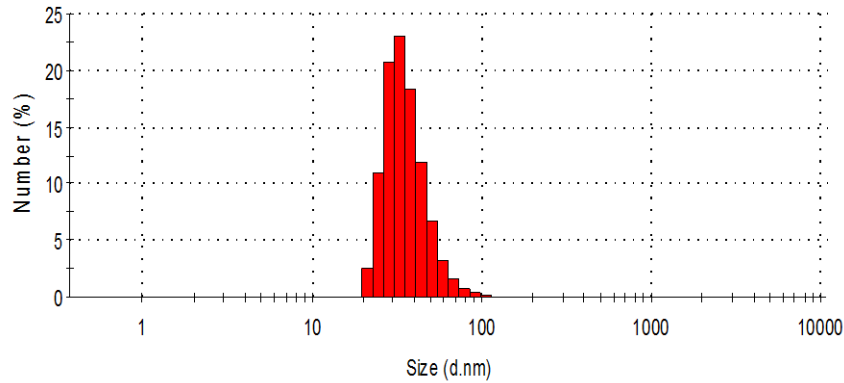
شکل ۳ و ۴ منحنی مرگ دو باکتری در مجاورت اسانس و غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس در مدت زمان ۶۰ دقیقه در محیط کشت BHI برات را نشان می‌دهد. رقت ۰/۱ و ۰/۰۱ نانوامولسیون اثرات باکتریوسیدی (کاهش حداقل سه سیکل لگاریتمی در تعداد اولیه باکتری) روی باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم داشتند ولی در لیستریا مونوسیتوزنز، تنها رقت ۰/۱ نانوامولسیون خاصیت باکتریوسیدی نشان داد. اسانس ۵ درصد در دو باکتری مورد مطالعه، در ۱۵ دقیقه اول

1. Z-average

2. Polydispersity Index(PDI)

گیری و نوع حلال به کار رفته باشد (Saei-Dehkordi et al., 2010).

تغییرات آب و هوا، سن گیاه، فصل برداشت، قسمت مورد استفاده گیاه برای تهیه اسانس، روش اسانس



شکل ۲- اندازه و توزیع ذرات نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی

جدول ۱- متوسط قطر هاله (میلی متر) تشکیل شده در روش انتشار در آگار

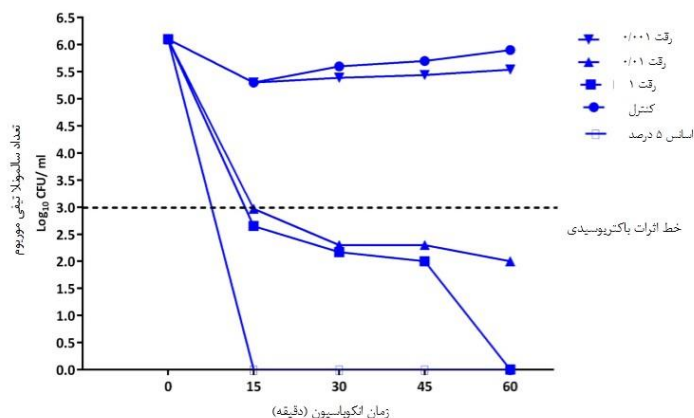
نوع باکتری	نانوامولسیون آویشن شیرازی	اسانس خالص	اسانس ۵ درصد	کلرآمفنیکل ۳۰ میکروگرم	آمپی سیلین ۱۰ میکروگرم
سالمونلا تیفی موریوم	۸/۳±۰/۳	۳۲/۵±۰/۴	۹/۲۶±۰/۳	۱۸/۷۴±۰/۳	۱۰/۲۵±۰/۳
لیستریا مونوسیتوزنز	۸/۵۴±۰/۴	۲۷/۱۷±۰/۳	۸/۸۴±۰/۲	۳۳/۳۱±۰/۴	۲۷/۴۴±۰/۲

جدول ۲- متوسط قطر هاله (میلی متر) تشکیل شده به روش انتشار فاز بخار

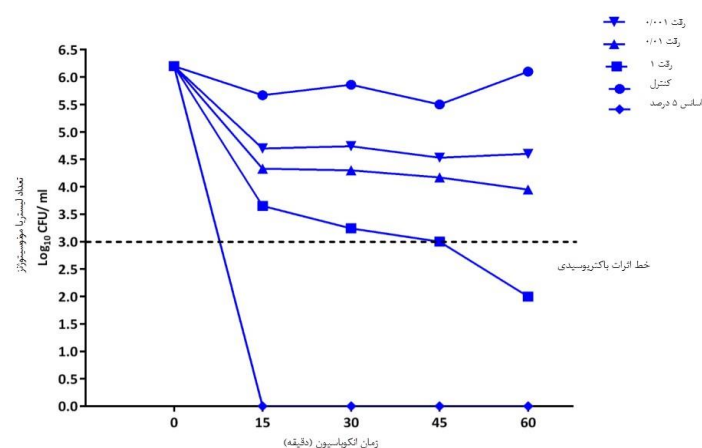
نوع باکتری	نانوامولسیون	خالص اسانس	اسانس ۵ درصد
سالمونلا تیفی موریوم	صفر	۲۲/۵۶±۰/۴	صفر
لیستریا مونوسیتوزنز	صفر	۳۰/۰۲±۰/۳	صفر

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

نوع باکتری	خالص (میکروگرم در میلی لیتر) اسانس	نانوامولسیون (میکروگرم در میلی لیتر)
	MIC	MBC
سالمونلا تیفی موریوم	۵۰۰۰	۵۰۰۰
لیستریا مونوسیتوزنز	۲۵۰۰	۲۵۰۰



شکل ۳- منحنی مرگ باکتری *سالمونلا تیفی موربوم* در محیط BHI برات در مواجهه با نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی.



شکل ۴- منحنی مرگ باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط BHI برات در مواجهه با نانوامولسیون آویشن شیرازی

توسط لندری و همکاران انجام گرفته است، میانگین اندازه ذرات نانوامولسیون کارواکرول تهیه شده به روش خودبه خودی، حدوداً ۱۰۰ نانومتر بوده است که پس از نگهداری در دمای اتاق به مدت ۳۰ روز، میانگین اندازه ذرات، به حدود ۲۰۰ نانومتر رسید. نگهداری نانوامولسیون در دمای اتاق برای طولانی مدت، باعث به هم چسبیدن قطرات و ناپایداری می گردد (Landry et al., 2014). مطالعات مختلف نشان می دهد اندازه و ثبات قطرات بستگی به عواملی از جمله روش تهیه، نوع و غلظت سورفکتانت و نوع و میزان اسانس دارد (Chang et al., McClements and Rao 2011; Ghosh et al., 2013). در این مطالعه قطر هاله‌ی مهاری تشکیل شده توسط اسانس و

نتایج شکل ۱ بیانگر تهیه امولسیون اسانس با شاخص نانو- یعنی اندازه ذرات کمتر از ۲۰۰ نانومتر- است. شاخص پلی دیسپرسیته توزیع ذرات نانو در داخل محلول را نشان می دهد. هرچه اندازه‌ی قطرات نانوامولسیون، کوچکتر باشد، پایداری در برابر رسوب افزایش می یابد. مهم ترین عامل ناپایداری نانوامولسیون، استوالد رایپنینگ^۱ می باشد که با افزایش غلظت سورفکتانت کاهش می یابد (Gadhav, 2014). در مطالعه‌ی داورت و همکاران (۲۰۱۵) میانگین اندازه ذرات نانوامولسیون اسانس رزماری^۲ در روز صفر، ۵۰ نانومتر بود (Duarte et al., 2015). در مطالعه‌ی که

1. Ostwald ripening (OR)
2. Rosmarinus

ضدمیکروبی، تعیین قطر هاله و MIC و MBC لازم است. نتایج حاصل از یک پژوهش نشان می‌دهد که فعالیت اسانس آویشن بر *سالمونلا تیفی* موریوم در مقایسه با دو آنتی‌بیوتیک فلوموکوئین و اکسی-تتراسیکلین بسیار بیشتر است و MIC آن ۱۵۶/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. همچنین میزان MBC آن ۳۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است (دخیلی، ۱۳۸۵). در مطالعه‌ی حاضر، میزان MIC و MBC برای نانوامولسیون و اسانس آویشن شیرازی برای باکتری *لیستریا مونوسی‌توزنز* ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای *سالمونلا تیفی* موریوم ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمده است. در مطالعه‌ای هم که توسط زو^۱ و همکاران روی فعالیت ضدمیکروبی اسانس آویشن کوهی و نانوامولسیون اسانس (۱۰ گرم اسانس امولسیفای شده با ۴ درصد سدیم کازئینات و ۵ درصد لستین) صورت گرفت، میزان MIC و MBC گزارش شده هم برای نانوامولسیون اسانس و هم برای اسانس برای باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سالمونلا اینتریتیدیس* به ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۳۵ گرم در لیتر و برای باکتری *لیستریا مونوسی‌توزنز* میزان MBC، ۰/۴۵ و میزان MIC برای اسانس ۰/۳۵ و برای نانوامولسیون، ۰/۳ گرم در لیتر گزارش شده است (Xue et al., 2015). در مطالعه‌ی دیگری که توسط گوش و همکاران (۲۰۱۳) در مورد ساخت و بررسی خواص باکتری‌کشی نانوامولسیون‌های خوراکی به روش امولسیفیکاسیون با اولتراسونیک انجام شد، تعداد باکتری‌های *اشرشیا کلی* در رقت ۰/۱ محلول نانوامولسیون ریحان، در زمان ۴۵، صفر شد و در رقت ۰/۰۱، در دقیقه ۶۰ تعداد باکتری‌ها صفر شد، اما در غلظت ۰/۰۰۱ تنها حدود ۲ سیکل لگاریتمی کاهش در ۶۰ دقیقه در تعداد باکتری‌ها مشاهده شد (Ghosh et al., 2013). تفاوت در نتایج منحنی مرگ به دست آمده در بررسی‌های مختلف را

1. Jia Xue

نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی به دو روش انتشار در آگار و انتشار فاز بخار بر علیه باکتری‌های *لیستریا مونوسی‌توزنز* و *سالمونلا تیفی* موریوم به روش انتشار در آگار اندازه‌گیری شد. قطر هاله‌ی مهاری ایجاد شده با توجه به نوع و ترکیب هر اسانس و نانوامولسیون و نوع باکتری متفاوت می‌باشد. اسانس آویشن شیرازی خالص اثرات مشابه با دو آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و آمپی-سیلین بر علیه *لیستریا مونوسی‌توزنز* داشت ولی روی *سالمونلا تیفی* موریوم اثرات دو برابر قوی‌تر از دو آنتی-بیوتیک بود. بر اساس نتایج بدست آمده، تهیه نانوامولسیون از اسانس، باعث کاهش یا افزایش اثرات آن در مقایسه با اسانس ۵ درصد در روش انتشار در آگار ندارد. علت مقایسه نانوامولسیون با اسانس ۵ درصد به این دلیل است که میزان اسانس مورد استفاده در تهیه نانوامولسیون، ۵ درصد است، لذا مقایسه اثرات ضدمیکروب نانوامولسیون با اسانس خالص منطقی نیست. در روش انتشار فاز بخار، به دلیل ماهیت نانوامولسیون که در آن قطرات اسانس توسط فاز آبی حاوی سورفکتانت پوشانده شده است، لذا اثرات ضدباکتریایی فاز فرار اسانس آنچنان که در خود اسانس خالص مشاهده گردید، در نانوامولسیون گزارش نشد. در مطالعه که توسط پنگ و همکارانش (۲۰۱۵) در مورد پایداری و خواص ضدباکتریایی نانولیپوزوم‌های اوژنول تهیه شده به روش میکروفلودیزاسیون انجام شد، قطر هاله ممانعت رشد در باکتری *اشرشیا کلی* O157: H7 در خود اسانس و نانولیپوزوم تهیه شده، به ترتیب ۱۵/۳ و ۱۰/۳ میلی‌متر گزارش شد (Peng et al., 2015). در تحقیقی دیگر که توسط دخیلی و همکاران (۱۳۸۵) روی اثرات ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی بر *سالمونلا تیفی* موریوم انجام گرفت، قطر هاله‌ی مهاری حاصل از اسانس آویشن شیرازی، ۳۱/۲ میلی‌متر بود (دخیلی، ۱۳۸۵)، که مشابه مطالعه حاضر است. برای تعیین میزان حساسیت هر میکروارگانیسم به ماده

نتایج بیانگر اثرات باکتریوسیدی بهتر نانوامولسیون روی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* در مدت زمان تماس ۶۰ دقیقه است. برای بهبود اثرات ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی پیشنهاد می‌شود از روش‌های تولید نانوامولسیون با انرژی بالا نظیر اولتراسوند و هموژنیزاسیون بجای روش‌های با انرژی پایین مثل روش امولسیون‌سازی به روش برگشت فاز استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به خاطر تاملین بودجه اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

- دخیلی، محمد، زهرایی صالحی، تقی، ترابی گودرزی، مجید و خاوری، احمد. (۱۳۸۵). ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس چهار گیاه دارویی بر *سالمونلا تیفی موریوم* و مقایسه آنها با آنتی بیوتیک‌های رایج در دامپزشکی. فصلنامه گیاهان دارویی، سال پنجم، شماره بیستم، صفحه ۲۶-۲۲.
- Al-Adham, I., Khalil, E., Al-Hmoud, N.D., Kierans., and Collier, P.J. 2000. Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems. *J Appl Microbiol.* 89(1): 32-39.
- Ali, M.S., Saleem, M., Ali, Z., and Ahmad, V.U. 2000. Chemistry of *Zataria multiflora (Lamiaceae)*. *Phytochemistry.* 55: 933-6.
- Basti, A.A., Misaghi, A., and Khaschabi, D. 2007. Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Lebensm-Wiss Technol.* 40: 973-981.

می‌توان به تفاوت در نوع و میزان مواد مؤثره فاز روغنی و غلظت‌های استفاده شده مربوط دانست. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی خواص باکتریوسیدی بهتر روی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* در مدت زمان ۶۰ دقیقه نشان داد، به طوری که رقت ۰/۱ نانوامولسیون باعث کاهش ۱۰۰ درصدی در تعداد اولیه باکتری در مدت زمان ۶۰ دقیقه گردید، در حالی که این رقت در همان زمان باعث کاهش ۴ سیکل لگاریتمی در تعداد باکتری *لیستریا مونوسی‌توزنز* شد. در مطالعه‌ای بارگوا^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثرات نانوامولسیون روغن در آب اسانس پونه کوهی تهیه شده به روش اولتراسوند با استفاده از توئین ۸۰ بر علیه *لیستریا مونوسی‌توزنز، سالمونلا تیفی موریوم* و *اشرشیا کلی* O57:H7 در کاهو تازه مورد بررسی قرار گرفت. رقت ۰/۰۵ نانوامولسیون به ترتیب باعث کاهش ۳/۴۴، ۲/۳۱ و ۳/۰۵ سیکل لگاریتمی در تعداد باکتری‌های *لیستریا مونوسی‌توزنز، سالمونلا تیفی موریوم* و *اشرشیا کلی* O57:H7 گردید. در صورت استفاده از رقت ۰/۱ نانوامولسیون، این کاهش، ۳/۵۷، ۳/۲۶ و ۳/۳۵ سیکل لگاریتمی در تعداد باکتری‌های اشاره شده بود (Bhargava et al., 2015).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان از اسانس آویشن شیرازی نانوامولسیونی تهیه کرد که اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر داشته باشد. اثرات ضد میکروبی نانوامولسیون تهیه شده، بر اساس روش بررسی خصوصیات ضد میکروبی و نوع میکروارگانیسم متفاوت است. در روش انتشار در آگار، اثرات نانوامولسیون روی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا مونوسی‌توزنز* مشابه هم بود. در روش برآث و رسم منحنی مرگ،

1. Kanika Bhargava

- Rev. Bras. Farmacogn. 25(2): 189-192.
11. Gadhave, A.D. 2014. Nanoemulsions: Formation, Stability and Applications. *Int J Res Sci & Adv Technol.* 2(3): 038-043.
 12. Ghosh, V., Saranya, S., Mukherjee, A., and Chandrasekaran, N. 2013. Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity. *J Nanosci Nanotechnol.* 13(1): 114-122.
 13. Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C.F., Li, Y., Zhong, F., and Huang, Q. 2012. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *J Agric Food Chem.* 60(30): 7548-7555.
 14. McClements, D.J., and Rao, J. 2011. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Crit Rev Food Sci.* 51(4): 285-330.
 15. Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S.M. 2012. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *Lebensm-Wiss Technol.* 46, 477-484.
 16. Nedorostova, L., Kloucek, P., kokoska, L., Stolcova, M., and Pullkrabel, J. 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control.* 20(2): 157-160.
 5. Bernardi, D.S., Pereira, T.A., Maciel, N.R., Bortolot, J., Viera, G.S., Oliveira, G.C., and Rocha-Filho, P.A. 2011. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: *in vitro* and *in vivo* assessments. *J Nanobiotechnology.* 9(1): 44.
 6. Bhargava, K., Conti, D.S., da Rocha, S.R.P., and Zhang, Y. 2015. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiol.* 47(0): 69-73.
 7. Buncic, S., Avery, S.M., and Moorhead, S.M. 1997. Insufficient antilisterial capacity of low inoculum *Lactobacillus* cultures on long-term stored meats at 4 degrees C. *Int J Food Microbiol.* 34(2): 157-170.
 8. Chang, Y., McLandsborough, L., and McClements, D.J. 2012. Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: influence of ripening inhibitors. *J Agric Food Chem.* 60(48): 12056-12063.
 9. Chang, Y., McLandsborough, L., and McClements, D.J. 2013. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *J Agric Food Chem.* 61(37): 8906-8913.
 10. Duarte, J. L., Amado, J.R.R., Oliveira, A.E.M.F.M., Cruz, R.A.S., et al. 2015. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil.

20. Shah, B., Davidson, P.M., and Zhong, Q. 2013. Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk. *Int J Food Microbiol.* 161(1): 5.59-3.
21. Wikler, M.A., and Cockerill F.R. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.
22. Xue, J., Davidson, P.M., and Zhong, Q. 2015. Antimicrobial activity of thyme oil co-nanoemulsified with sodium caseinate and lecithin. *Int J Food Microbiol.* 210: 1-8.
17. Peng, S., Zou, L., Liu, W., and et al. 2015. Storage stability and antibacterial activity of eugenol nanoliposomes prepared by an ethanol injection-dynamic high-pressure microfluidization method. *J Food Protec.* 78(1): 22-30.
18. Saei-Dehkordi, S.S., Tajik, H., Moradi, M., and Khalighi-Sigariidi, F. 2010. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. From different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food Chem Toxicol.* 48(6): 1562-1567.
19. Sajed, H., Sahebkar, A., and Iranshahi, M. 2013. *Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi thyme)—An ancient condiment with modern pharmaceutical uses. *J Ethnopharmacol.* 145(3): 686-698.

Antibacterial properties of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil nano emulsion formed by emulsion phase inversion

Shahabi N¹, Tajik H², Moradi M^{2*}, Forough M³

1. Graduated of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
3. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Urmia University, Urmia, Iran.

*Corresponding author: moradi.mehran@yahoo.com

Accepted: 19 October 2016

Received: 5 April 2016

Abstract

This study aimed to investigate preparation of a *Zataria multiflora* essential oil nanoemulsion and to evaluate its antibacterial against *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. The average particles size of nanoemulsion prepared by inversion phase using tween 20, which measured by dynamic light scattering, was 66.5 nm. The antibacterial activity of nanoemulsion has examined through agar diffusion, vapor-phase diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and time kill curves against *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in BHI. The average diameter of the zones of inhibition of nanoemulsion through agar diffusion was 8.3 and 8.54 mm for *S. typhimurium* and *L. monocytogene*, respectively. Also, average diameter of the zones of inhibition of nanoemulsion was zero against both bacteria according to vapor-phase diffusion. The results showed that nanoemulsion exhibited MIC and MBC of 5000 µg/ml on *S. typhimurium* and MIC and MBC of 2500 µg/ml on *L. monocytogene*. The effect of 10, 100 and 1000-fold diluted nanoemulsion on both bacterial kill in BHI at 0, 15, 30, 45 and 60 minutes and the results showed that in BHI, the 10 and 100 fold-diluted nanoemulsion caused a 6 and 4 log reduction at *S. Typhimurium* in 60 min and the 10-fold caused more than 4 log reduction of *L. monocytogene*. According to the results, it can be concluded that prepared nanoemulsion is suitable antimicrobial solution and by optimizing the process, it can be beneficial to control the bacterial microorganisms of foods.

Keywords: Nanoemulsion, *Zataria multiflora* essential oil, antibacterial.