

ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس و نانوامولسیون اسانس سیر بر باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی

اسما عزیزآبادی^{۱،۲}، اشرف کریمی نیک^{۱،۳*}

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۲. مرکز تحقیقات ایمن سازی مواد غذایی و کشاورزی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

* (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: a.kariminik@iauk.ac.ir

چکیده

با توجه به افزایش نیاز به حفظ کیفیت و پایداری محصولات فسادپذیر، استفاده از اسانس و نانوامولسیون آن‌ها به عنوان راهکارهایی نوین در افزایش پایداری میکروبی این محصولات، مورد توجه قرار گرفته است. این تحقیق با هدف مقایسه اثرات ضدباکتریایی اسانس سیر و نانوامولسیون آن بر باکتری‌های بیماری‌زا و ارزیابی پتانسیل استفاده از نانوامولسیون‌های اسانس سیر در صنایع غذایی انجام شد. اسانس سیر به روش تقطیر با بخار آب استخراج شد و ترکیبات آن با استفاده از روش کروماتوگرافی شناسایی گردید. نانوامولسیون اسانس سیر با استفاده از روش هموژنیزاسیون تهیه شد. سپس اثرات ضدباکتریایی اسانس سیر و نانوامولسیون آن بر پنج باکتری *شریشیا کلی*، *سالمونلا انتریکا*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* با استفاده از روش میکروتیتر پلیت، ارزیابی شد. دی آلیل دی سولفید، تری سولفید دی پروپیل، دی سولفید دی پروپیل و دی آلیل سولفید، ترکیبات اصلی اسانس بودند. نتایج این پژوهش نشان داد نانوامولسیون اسانس سیر نسبت به فرم خام آن، اثر ضدباکتریایی قوی‌تری بر پنج گونه پاتوژن غذایی دارد. این برتری در تمامی غلظت‌های مورد بررسی مشهود بوده و بیشترین حساسیت مربوط به *سالمونلا انتریکا* با مهار رشد ۹۹٫۸۹٪ در غلظت ۱٫۵۶ $\mu\text{g/ml}$ بود. مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی رشد و کشندگی در نانوفرمولاسیون به‌طور معناداری کاهش یافته و آزمون‌های آماری نیز تفاوت‌های معنادار بین غلظت‌ها را تأیید کردند ($p < 0.001$). یافته‌ها پتانسیل بالای کاربرد نانوامولسیون سیر را در صنایع غذایی به عنوان یک نگهدارنده طبیعی و مؤثر نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: اسانس سیر، نانوامولسیون، اثرات ضدباکتریایی، مواد غذایی

مقدمه

خواص ضدباکتریایی افزایش دهد. مطالعات اخیر همچنین نشان داده‌اند که نانوامولسیون‌ها می‌توانند در ایجاد سیستم‌های تحویل هوشمند برای اسانس‌ها نقش مهمی ایفا کنند، به‌طوری که رهایش اسانس‌ها تنها در مواقع نیاز به‌طور دقیق و کنترل شده انجام شود. این قابلیت می‌تواند در توسعه محصولات غذایی با خواص بهبود یافته و تأثیرات ضدباکتریایی و ضدویروسی مؤثرتر بسیار مفید باشد (Confessor et al., 2024). در این مطالعه، هدف بررسی تأثیرات ضد میکروبی اسانس سیر و نانوامولسیون آن بر روی چندین باکتری مولد فساد مواد غذایی، از جمله /شریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، سودوموناس اثرئوژینوزا و سالمونلا انتریکا، می‌باشد. از نظر کاربردی، نتایج این تحقیق می‌تواند منجر به توسعه بسته‌بندی‌های فعال زیست‌پایه یا پوشش‌های خوراکی با منشأ طبیعی شود که علاوه بر افزایش ایمنی و ماندگاری محصولات غذایی، نیاز به مواد نگهدارنده سنتتیک را کاهش داده و پذیرش مصرف‌کنندگان را ارتقاء دهد.

روش کار

استخراج اسانس سیر و شناسایی ترکیبات آن

سیر با نام علمی *Allium sativum* L. پس از برداشت در فصل تابستان از مزارع کشاورزی منطقه کرمان (زرنند)، جمع‌آوری شده و به‌مدت پنج روز در شرایط سایه و در دمای محیط خشک گردید. سپس نمونه‌های خشک‌شده به‌صورت پودر درآمدند. اسانس سیر به روش تقطیر با بخار آب و با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج شد. به‌منظور شناسایی ترکیبات موجود در اسانس، آنالیز با دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) صورت گرفت. شناسایی مواد تشکیل‌دهنده بر اساس مقایسه طیف‌های جرمی و شاخص‌های بازداری حاصل با داده‌های مربوط به ترکیبات استاندارد انجام پذیرفت. درصد نسبی هر یک از ترکیبات نیز با محاسبه سطح زیر منحنی کروماتوگرام‌ها تعیین شد. به‌طور کلی، تعیین اجزای اصلی

در دهه‌های اخیر، افزایش نگرانی‌ها نسبت به مصرف مواد نگهدارنده شیمیایی در صنعت غذا و دارو، پژوهشگران را به سوی بهره‌گیری از ترکیبات زیست‌فعال طبیعی سوق داده است. اسانس‌های گیاهی، به‌عنوان منابعی غنی از ترکیبات فنولی، ترپنوئیدی و آلی‌سولفیدی، به دلیل اثرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ایمنی بالا، در تحقیقات علمی به‌طور ویژه‌ای مورد توجه قرار گرفته‌اند. استفاده از اسانس‌ها در صنایع غذایی به دلیل ویژگی‌های ضدباکتریایی، ضدویروسی و طعم‌دهی برجسته، اهمیت فراوانی دارد. در میان اسانس‌های گیاهی، اسانس سیر (*Allium sativum*) به سبب دارا بودن ترکیبات گوگردی فعال مانند: آلیسین، دی‌آلیل دی‌سولفید و سایر ترکیبات فرار، دارای فعالیت‌های ضد میکروبی قابل توجهی در برابر طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و مولد فساد می‌باشد (Swangsri et al., 2024). با این حال، به کارگیری مستقیم اسانس سیر در محصولات غذایی با چالش‌هایی مانند ناپایداری در مقابل نور، حرارت و اکسیداسیون، همچنین طعم تند و ناخوشایند آن مواجهه است که مانع از بهره‌برداری گسترده و مؤثر از این اسانس در صنعت غذا می‌شود (Espitia et al., 2019). به منظور فائق آمدن بر این محدودیت‌ها، فناوری‌های نوین تحویل هدفمند، به‌ویژه استفاده از نانوامولسیون‌ها، مورد توجه قرار گرفته‌اند. نانوامولسیون‌ها که به‌عنوان سیستم‌های کلوئیدی با اندازه قطره‌ای کمتر از ۲۰۰ نانومتر، شناخته می‌شوند، به دلیل ویژگی‌های خاص خود از جمله سطح تماس بالا، قابلیت رهایش کنترل‌شده، و پایداری بالا در برابر شرایط محیطی مختلف، در بهبود کارایی اسانس‌ها مؤثر هستند (Chen & Zhong, 2022). این سیستم‌ها با افزایش پایداری اسانس‌ها، می‌توانند از تجزیه آن‌ها در برابر نور و حرارت جلوگیری کنند و همچنین اثرات جانبی طعمی ناخواسته را کاهش دهند. نانوامولسیون‌ها علاوه بر افزایش پایداری، توانایی بهبود حل‌پذیری اسانس‌ها در محیط‌های آبی را دارند. این ویژگی می‌تواند در بهبود انتشار اسانس‌ها در محصولات غذایی کمک کند و تأثیر آن‌ها را در طعم‌دهی و

زایلوز لیزین دی اکسی کولات آگار، ستریماید آگار، و بلاد آگار استفاده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای مناسب هر باکتری گرمخانه گذاری شدند. پس از رشد باکتری ها و تشکیل کلنی، تست های تشخیصی و بیوشیمیایی از قبیل: اکسیداز، کاتالاز، اوره از، تخمیر قند، حرکت و ایندول برای شناسایی هر باکتری انجام شد (Bantawa et al., 2018; Sepahvand et al., 2022).

آزمون مولکولی و بررسی حضور ژن ویبرولانس در باکتری های جدا شده از مواد غذایی

استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری سیناژن انجام شد. جهت تعیین کیفیت DNA های استخراج شده، دستگاه نانودراپ در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به ترتیب برای بررسی میزان جذب DNA و پروتئین ها و تعیین میزان خلوص DNA انجام گردید. لیست پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های ویبرولانس هدف در جدول (۱)، ذکر شده است (Aranda et al., 2004; Chen et al., 2000; Mehrotra et al., 2017). مخلوط واکنش پی سی آر در حجم کل ۲۰ میکرولیتری تهیه شد که شامل موارد زیر است: مسترمیکس به میزان ۱۰ میکرولیتر، هر یک از پرایمرهای فوروارد و ریورس به میزان ۱ میکرولیتر، DNA به میزان ۴ میکرولیتر، و آب دیونیزه استریل به میزان ۴ میکرولیتر. برنامه سیکل دمایی به صورت زیر اجرا شد: مرحله دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. سپس، سیکل های پی سی آر (تعداد ۳۵ سیکل) شامل مراحل زیر بودند: دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی گراد (بسته به نوع پرایمر) به مدت ۳۰ ثانیه، و پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه. مرحله پلیمریزاسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. در نهایت، محصول پی سی آر با استفاده از تکنیک الکتروفورز در ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت.

اسانس از طریق تحلیل طیف های جرمی و محاسبه شاخص بازداری آن ها صورت گرفت (Kariminik et al., 2019).

تهیه نانوامولسیون اسانس سیر

برای تهیه نانوامولسیون، از روش هموژنیزاسیون به کمک سورفکتانت غیر یونی توپین ۸۰، استفاده شد. در این فرایند، اسانس سیر به عنوان بخش اصلی فاز روغنی به کار گرفته شد. ابتدا مقدار مشخصی از اسانس سیر با روغن گیاهی مخلوط گردید تا یک فاز روغنی همگن حاصل شود. سپس، برای تثبیت امولسیون و کاهش کشش سطحی بین فازهای آبی و روغنی، بین ۱ تا ۵ درصد وزنی توپین ۸۰ به این مخلوط افزوده شد. در ادامه، فاز آبی به آرامی و به صورت تدریجی به ترکیب افزوده گردید و با هم زدن کامل، یک امولسیون اولیه شکل گرفت. امولسیون اولیه حاصل، تحت فرآیند هموژنیزاسیون با دور بالا قرار گرفت تا اندازه قطرات فاز روغنی به محدوده نانومتری (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) کاهش یابد. به منظور بررسی اندازه و مورفولوژی ذرات تشکیل شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی، استفاده شد (Hassanzadeh et al., 2022).

جداسازی و شناسایی باکتری های پاتوژن از مواد غذایی

جداسازی باکتری های *سالمونلا* / *انتریکا* از گوشت مرغ و *اشریشیا کلی*، *سودوموناس* / *ائروژینوزا* و *استافیلوکوکوس* / *اورئوس* از گوشت گاو قصابی ها و *لیستریا مونوسیتوژنز* از شیر خام انجام گرفت. تمامی ارزیابی ها مطابق با استاندارد متدهای میکروبی معتبر انجام گرفت. نمونه های گوشتی شامل مرغ و گوشت گاو تحت شرایط کاملاً استریل جمع آوری شدند. از هر نمونه، ۲۵ گرم به صورت تصادفی از نقاط مختلف محصول برداشته شد و در ۲۲۵ میلی لیتر آب پپتون بافر شده هموژنیزه گردید. جهت رشد باکتری های *اشریشیا کلی*، *سالمونلا* / *انتریکا*، *سودوموناس* / *ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس* / *اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب از محیط کشت مکانکی آگار،

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

توالی پرایمر (۵'→۳')	ژن هدف	بakterی	طول محصول (bp)
F: GGCGACAGATTATACCGTGC R: CGGTCTCTATATTCCCTGTT	lt	اشریشیا کلی	۴۵۰
F: GGTATCAATGTGCGGGTGG R: CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	sea	استافیلوکوکوس اورئوس	۲۷۰
F: GAGGAGGCCGATGAGTCG R: TCCTCGCCAGTTCGTTTC	exoS	سودوموناس آئروژینوزا	۳۵۰
F: ATGATGTAATTTCTATCGTC R: TTAATGCTAGTTCTGTTTG	stn	سالمونلا انتریکا	۲۶۰
F: CGGAGGTTCCGCAAAAGATG R: CCTCCAGAGTGATCGATGTT	hlyA	لیستریا مونوسایتوژنز	۳۰۰

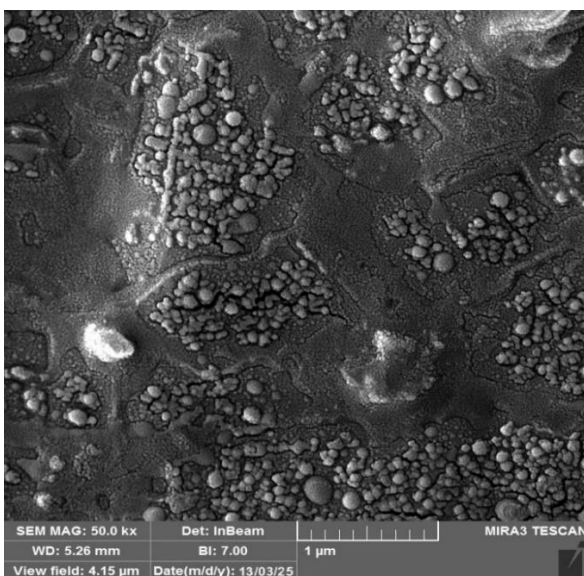
سولفوکسید یک درصد، بود. در نهایت، به ستون ۹ به عنوان کنترل مثبت، ۱۰۰ میکروتر آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین افزوده شد. به تمام خانه های ستون های ۱ تا ۷ و ۹، ۱۰۰ µl سوسپانسیون باکتری (CFU/ml ~ ۱/۵ × ۱۰^۸) اضافه شد. پلیت به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از فرآیند انکوباسیون، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شد، که شامل کمترین غلظتی از اسانس است که عدم رشد باکتری را در خانه های پلیت نشان می دهد. این ارزیابی هم به صورت دیداری با چشم غیرمسلح و هم با استفاده از میکروپلیت ریدر در OD₆₀₀ انجام شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از کمترین غلظت هایی که نشان دهنده عدم رشد کامل یا رشد ضعیف بودند، مقدار ۱۰ میکرولیتر نمونه برداشته و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای مناسب، عدم رشد کامل به عنوان MBC در نظر گرفته شد. همچنین، برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوامولسیون اسانس سیر، از روش مشابه با روش

بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس سیر با استفاده از روش میکروتیتر پلیت

فعالیت ضدباکتریایی اسانس سیر با استفاده از روش میکروتیتر پلیت بر باکتری های جدا شده از مواد غذایی و مورد تایید قرار گرفته به روش مولکولی، مورد بررسی قرار گرفت. غلظت های اسانس شامل ۰،۳۹، ۰،۷۸، ۱،۵۶، ۳،۱۲، ۶،۲۵ و ۱۲،۵ µg/ml در محیط مولر هینتون براث تهیه شدند. از دی متیل سولفوکسید یک درصد به عنوان کنترل منفی و سیپروفلوکساسین (۰/۵ - ۱۲۸ µg/ml) به عنوان کنترل مثبت، استفاده گردید. از سویه های باکتریایی /اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا انتریکا، و لیستریا سوسپانسیون باکتریایی در محلول سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد و غلظت آن با استاندارد نیم مک فارلند (CFU/ml ~ ۱/۵ × ۱۰^۸) تنظیم گردید. در این آزمایش، از میکروپلیت های ۹۶ خانه استفاده شد. ستون های ۱ تا ۶ هر یک با ۱۰۰ میکروتر از غلظت های مختلف اسانس سیر، پر شدند. ستون ۷ به عنوان کنترل رشد، شامل باکتری و محیط مولر هینتون براث، قرار گرفت. ستون ۸ به عنوان کنترل منفی، شامل محیط مولر هینتون براث و دی متیل

²Minimum bactericidal concentration¹Minimum inhibitory concentration

آلیل سولفید (۵,۶۴٪) بودند. این ترکیبات بخش عمده‌ای از محتوای شیمیایی اسانس را تشکیل داده و مسئول ویژگی‌های بیولوژیکی و آروما آن می‌باشند. بررسی نانومولسیون سیر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی در بزرگنمایی ۲۹,۶۰۰ برابر و فاصله کاری ۴,۵۴ میلی‌متر، ساختارهایی در مقیاس نانومتری با وضوح بالا را به‌نمایش گذاشت. همان‌طور که در شکل (۱)، مشاهده می‌شود، نانوذرات سیر عمدتاً دارای شکل کروی تا بیضی هستند و اندازه آن‌ها در محدوده‌ای بین ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر قرار دارد؛ این مقادیر با گزارش‌های پیشین پیرامون نانوفرمولاسیون‌های اسانس سیر همخوانی دارند. پراکندگی ذرات نسبتاً یکنواخت است؛ با این حال، حضور تعداد اندکی تجمعات کوچک (آگلومره) قابل مشاهده است که می‌تواند ناشی از ماهیت هیدروفوب ترکیبات گوگردی موجود در اسانس باشد. سطح نانوذرات دارای ناهمواری‌های مشخصی است که احتمالاً به‌دلیل حضور ترکیبات فنولی و پلی‌ساکاریدی در ترکیب شیمیایی اسانس سیر می‌باشد. کیفیت تصاویر حاصل نیز به‌دلیل کنتراست مطلوب (B1: 7.00) و تنظیمات بهینه دستگاه (WD: 4.54 mm) بالا بوده و امکان مشاهده دقیق و واضح مرزهای میان ذرات را فراهم ساخته است.



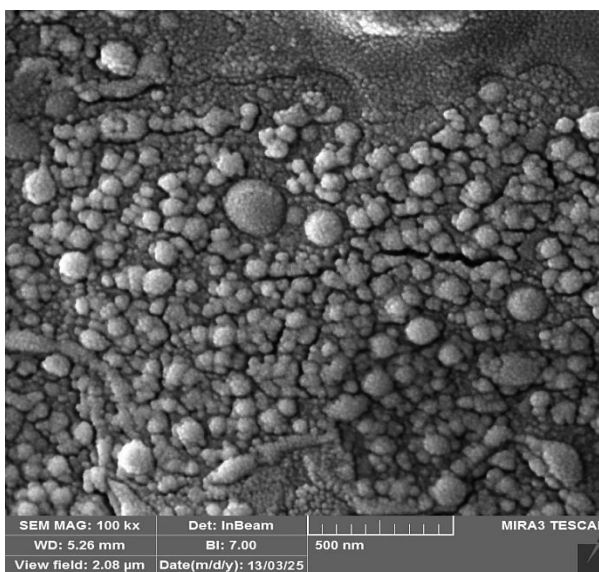
مورد استفاده برای اسانس سیر بهره گرفته شد (Tao et al., 2022).

بررسی آماری

تحلیل‌های آماری این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) بهره گرفته شد و جهت بررسی تفاوت‌های معنادار بین گروه‌ها، آزمون تعقیبی توکی (Tukey's post-hoc test) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's multiple range test) مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی تحلیل‌ها در سطح معنی‌داری ۵٪ ($p < 0.05$) انجام پذیرفتند.

نتایج

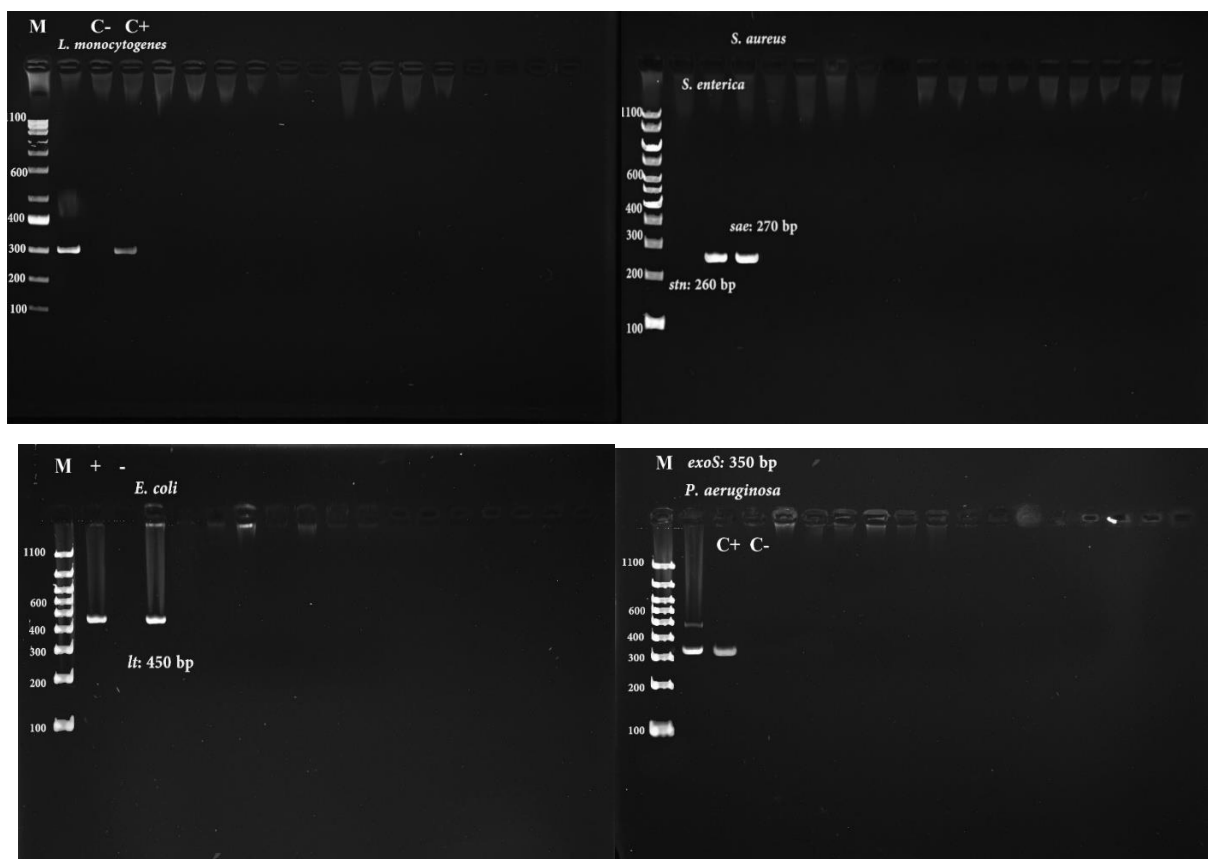
بر اساس نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس سیر، درمجموع ۲۲ ترکیب مختلف شناسایی گردید. از میان این ترکیبات، چهار ماده اصلی با بیشترین فراوانی به‌ترتیب: دی آلیل دی سولفید (۶۰,۱۵٪)، تری سولفید دی پروپیل (۱۴,۲۲٪)، دی پروپیل دی سولفید (۹,۱۶٪) و دی



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانومولسیون سیر

ژن‌های هدف با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌هایی که در این آزمون نتیجه مثبت نشان دادند، در مراحل بعدی برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس سیر و نانوامولسیون آن مورد استفاده قرار گرفتند.

بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی و تشخیصی باکتری‌شناسی انجام شده، گونه‌های باکتریایی شامل: /شریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا انتریکا، و لیستریا مونوسایتوزنز از نمونه‌های مواد غذایی جداسازی گردیدند. سپس، این جدایه‌ها از نظر وجود



شکل ۲: ژل الکتروفورز محصول پی سی ار تکثیر ژن‌های ویروالانس باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ژن‌های هدف شامل: *hlyA*/لیستریا مونوسایتوزنز (۳۰۰ bp)، *sea*/استافیلوکوکوس اورئوس (۲۷۰ bp)، *stn*/سالمونلا انتریکا (۲۶۰ bp)، *lt*/شریشیا کلی (۴۵۰ bp) و *exoS* سودوموناس آئروژینوزا (۴۵۰ bp).

این عملکرد شامل تخریب دیواره سلولی باکتری و افزایش استرس اکسیداتیو بوده که موجب مرگ سریع‌تر سلول‌های باکتریایی شده است. شاخص‌های MIC و MBC بر اساس اندازه‌گیری چگالی نوری پس از انکوباسیون با غلظت‌های معین از اسانس و نانوامولسیون سیر محاسبه گردیدند (جدول ۲). همچنین، میزان مهار نسبی رشد باکتری بر اساس فرمول ذیل محاسبه شد.

نتایج اثرات ضدباکتریایی اسانس و نانوامولسیون

اسانس سیر بر باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی

نانوامولسیون سیر، به دلیل اندازه کوچک ذرات آن (در بازه ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر) و افزایش نفوذپذیری، توانست در غلظت‌های بسیار پایین‌تر حتی ۰.۱۹ $\mu\text{g/ml}$ برای لیستریا) اثرات مهاری قوی‌تری از خود نشان دهد. مکانیسم احتمالی

$$\text{مهار رشد (\%)} = \left(1 - \frac{\text{OD تیمار}}{\text{OD کنترل}}\right) \times 100$$

جدول ۲: میزان بازدارندگی رشد باکتری‌ها در برابر غلظت‌های مختلف اسانس و نانوامولسیون سیر (اعداد اول و دوم به ترتیب نمایانگر درصد مهار رشد توسط اسانس سیر و نانوامولسیون سیر می باشند).

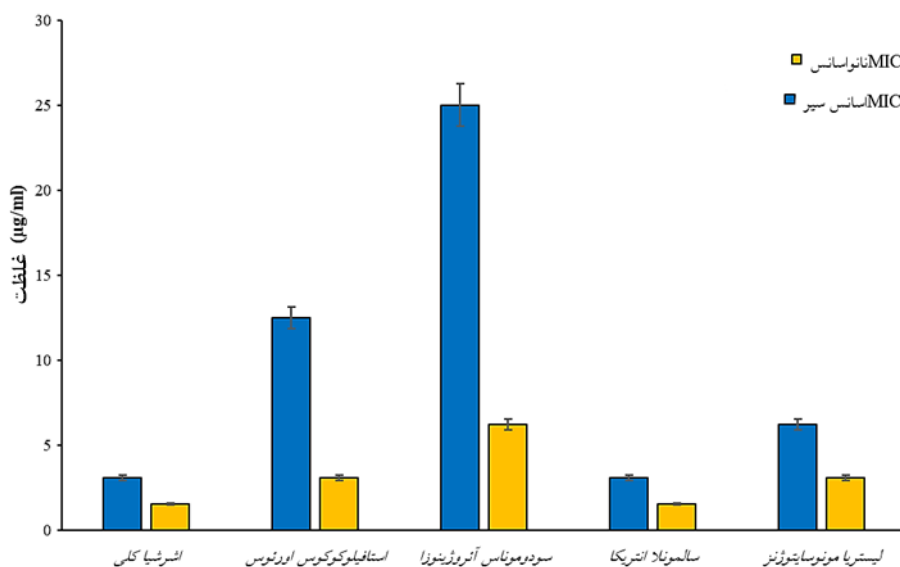
لیستریا مونوسایتوزنز	سالمونلا/انتریکا	سودوموناس آئروژینوزا	استافیلوکوکوس/اورئوس	اشریشیا کلی	غلظت (µg/ml)
۱۴,۷۲ / ۳۰,۶۸	۱۲,۰۸ / ۲۰,۸۷	۱۲,۳۵ / ۳۲,۸۵	۷,۴ / ۲۶,۳	۷,۶ / ۱۵,۲	۰,۰۹۷
۲۶,۱۳ / ۶۰,۲۲	۱۲,۰۸ / ۳۶,۲۶	۲۱,۳۴ / ۵۵,۱	۲۱ / ۵۲,۶	۱۳ / ۲۹,۳	۰,۱۹۵
۴۸,۸۷ / ۸۶,۳۷	۱۹,۷۸ / ۵۰,۵۴	۳۸,۲ / ۷۱,۹	۴۷,۴ / ۹۱,۵۷	۲۱,۷ / ۴۵,۷	۰,۳۹
۶۲,۵ / ۹۴,۳۲	۹۴,۵ / ۹۷,۸	۶۰,۶۷ / ۸۸,۸	۷۳,۷ / ۹۶,۷۵	۹۳,۴۷ / ۹۷,۸۲	۰,۷۸
۷۱,۶۱ / ۹۷,۷۳	۹۶,۹۳ / ۹۹,۸۹	۶۸,۵۳ / ۹۱,۵۷	۹۱,۳۷ / ۹۵,۲۶	۹۶,۷۳ / ۹۸,۹۱	۱,۵۶

است. در غلظت‌های ۰,۷۸ و ۱,۵۶ µg/ml، باکتری کاملاً حساس شد و مهار رشد به‌طور چشمگیری افزایش یافت. برای باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس، نیز روند مشابهی مشاهده شد. در غلظت‌های پایین، مقاومت نسبت به هر دو ترکیب وجود داشت. اما در غلظت ۰,۳۹ µg/ml، مهار رشد با اسانس به ۴۷,۴٪ و با نانوامولسیون به ۹۱,۵۷٪ رسید. در غلظت‌های بالاتر، نانوامولسیون همچنان عملکرد قوی‌تری داشت؛ به‌طوری‌که در حالی‌که اسانس ۹۱,۳۷٪ مهار رشد ایجاد کرد، نانوامولسیون به ۹۵,۲۶٪ رسید. سودوموناس آئروژینوزا در برابر هر دو ترکیب، به‌ویژه در غلظت‌های پایین، مقاومت نشان داد. با افزایش غلظت به ۰,۷۸ µg/ml، مهار رشد با اسانس به ۶۰,۶۷٪ و با نانوامولسیون به ۸۸,۸٪ رسید، که برتری چشمگیر نانوامولسیون را نشان می‌دهد. در غلظت ۱,۵۶ µg/ml، نانوامولسیون به مهار ۹۱,۵۷٪ دست یافت و اثربخشی قوی‌تری را نسبت به اسانس نشان داد. در مورد سالمونلا/انتریکا نیز در غلظت‌های پایین مقاومت مشاهده شد، اما با افزایش غلظت به ۰,۷۸ و ۱,۵۶ µg/ml، میزان مهار رشد به ترتیب به ۹۴,۵٪ (اسانس) و ۹۶,۹۳٪ (نانوامولسیون) افزایش یافت. این یافته‌ها گویای اثربخشی بالای نانوامولسیون در کنترل این پاتوژن غذایی هستند. لیستریا مونوسایتوزنز نیز در غلظت‌های پایین مقاومت نشان داد، اما با افزایش غلظت، مهار رشد به ۶۲,۵٪ برای اسانس و ۹۴,۳۲٪ برای

یافته‌های حاصل از ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی اسانس سیر و نانوامولسیون آن علیه پنج گونه از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی، نشان‌دهنده برتری قابل توجه نانوفرمولاسیون نسبت به فرم خام اسانس است. بر پایه نتایج ارائه شده در جدول (۲)، نانوامولسیون سیر در کلیه غلظت‌های مورد آزمایش در بازه ۰,۰۹۷ تا ۱,۵۶ µg/ml، میزان بالاتری از مهار رشد باکتریایی را نسبت به اسانس خام نشان داد. در میان باکتری‌های مورد بررسی، سالمونلا/انتریکا بیشترین حساسیت را نسبت به تیمارها از خود نشان داد. در این باکتری، نانوامولسیون سیر در غلظت ۱,۵۶ µg/ml موفق به مهار رشد باکتری به میزان ۹۹,۸۹٪ شد که به‌عنوان MIC نانو در نظر گرفته شد؛ در حالی‌که همین میزان مهار در اسانس سیر تنها در غلظت ۳,۱۲ µg/ml حاصل شد. همچنین در غلظت ۰,۷۸ µg/ml، میزان مهار رشد توسط نانوامولسیون ۹۷,۵٪ و در اسانس خام ۹۴,۵٪ گزارش گردید. این تفاوت‌ها بیانگر عملکرد بهبود یافته نانوفرمولاسیون در افزایش اثربخشی ضدباکتریایی اسانس سیر می‌باشد. در غلظت‌های پایین (۰,۰۹۷ و ۰,۱۹۵ µg/ml)، باکتری اشریشیا کلی مقاومت نسبی در برابر هر دو ترکیب نشان داد، به‌طوری‌که مهار رشد با اسانس ۷,۶٪ و با نانوامولسیون ۱۳٪ بود. با افزایش غلظت به ۰,۳۹ µg/ml، این مقدار به ترتیب به ۲۱,۷٪ و ۴۵,۷٪ رسید که بیانگر اثربخشی بالاتر نانوامولسیون

بهبود دوبرابری اثر مهاری است. این کاهش در لیستریا مونوسایتوزنز نیز دیده می‌شود، جایی که MIC از ۶,۲۵ به ۳,۱۲ $\mu\text{g/ml}$ رسید. اثربخشی نانوفرمولاسیون در استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا، حتی چشمگیرتر بود؛ به گونه‌ای که MIC اسانس به ترتیب از ۱۲,۵ و ۲۵ $\mu\text{g/ml}$ به ۳,۱۲ و ۶,۲۵ $\mu\text{g/ml}$ کاهش یافت، که حاکی از افزایش چهار برابری قدرت مهاری نانومولسیون است.

نانومولسیون رسید. در غلظت ۱,۵۶ $\mu\text{g/ml}$ ، نانومولسیون توانست مهار رشد ۹۳,۷۳٪ ایجاد کند. شکل (۳)، حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) اسانس و نانومولسیون سیر را برای پنج باکتری بررسی شده نمایش می‌دهد. نتایج به‌روشنی نشان می‌دهد که نانومولسیون سیر در تمامی موارد عملکرد مؤثرتری نسبت به اسانس خام دارد. به‌طور خاص، در *شریشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا*، MIC نانومولسیون به ۱,۵۶ $\mu\text{g/ml}$ کاهش یافته که نسبت به MIC اسانس به معنای



شکل ۳: مقایسه حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) بین اسانس سیر و نانومولسیون آن در برابر باکتری‌های مورد مطالعه

بین گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانومولسیون سیر بود.

نتایج آزمون توکی برای مقایسه‌های چندگانه نشان داد که در تمام گونه‌های باکتریایی مورد بررسی، افزایش غلظت نانومولسیون سیر به‌طور معنادار و تصاعدی موجب افزایش میزان مهار رشد شد. در این میان، *سالمونلا انتریکا* بیشترین حساسیت را نسبت به نانومولسیون از خود نشان داد، در حالی که *سودوموناس آئروژینوزا* کمترین حساسیت را داشت. همچنین، در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس*، غلظت

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (جدول ۳)، نشان‌دهنده تفاوت‌های معنادار آماری در اثرات مهاری نانومولسیون سیر بر رشد پنج باکتری پاتوژن غذایی در غلظت‌های مختلف بود. برای تمامی باکتری‌های مورد مطالعه، شامل *شریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسایتوزنز*، مقادیر p-value کمتر از ۰,۰۰۱ به دست آمد که بیانگر وجود تفاوت‌های بسیار معنادار

ضدباکتریایی بالاتری برخوردار است. این تأثیرات از نظر آماری کاملاً معنادار بوده و شواهد محکمی برای پشتیبانی از کاربردهای بالقوه بالینی و صنعتی نانوامولسیون سیر به عنوان یک عامل ضد میکروبی طبیعی فراهم می‌آورد.

۰,۷۸ µg/ml باعث مهار رشدی برابر با ۷۳,۷٪ گردید. این نتایج به وضوح بیانگر آن‌اند که نانوفرمولاسیون اسانس سیر نسبت به فرم خام آن، به دلیل افزایش سطح تماس و نفوذ بهتر ذرات در غشای سلولی باکتری‌ها، از اثربخشی

جدول ۳: نتایج تحلیل آماری اثرات اسانس سیر و نانوامولسیون آن بر هر باکتری

نتایج Tukey (غلظت‌های متفاوت)	p-value	F-value	باکتری
$1,56 \neq 0,78 \neq 0,097$	$0,001 <$	۴۵,۶	اشریشیا کلی
$0,78 \neq 0,195 \neq 0,097$	$0,001 <$	۶۲,۳	استافیلوکوکوس اورئوس
$1,56 \neq 0,78 \neq 0,097$	$0,001 <$	۳۸,۹	سودوموناس اتروژینوزا
$1,56 \neq 0,78 \neq 0,195$	$0,001 <$	۵۱,۲	سالمونلا انتریکا
$0,78 \neq 0,39 \neq 0,097$	$0,001 <$	۷۵,۸	لیستریا مونوسایتوژنز

* $p\text{-value} < 0,05$ نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین غلظت‌هاست.

** نتایج Tukey: غلظت‌هایی که حروف متفاوت دارند ($\neq$)، از نظر آماری تفاوت معنادار دارند.

بحث

ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس سیر به ترتیب: آلایل متیل تری سولفید (۲۳,۱۰٪) و دی آلایل سولفید (۱۹,۴۷٪) هستند (Sindhu et al., 2023). مقایسه ترکیبات اصلی متشکله اسانس سیر در تحقیق حاضر و تحقیقات مشابه بیانگر آن است که ترکیبات آلایل به ویژه آلایل تری سولفات از ترکیبات مشترک و شاخص اسانس سیر به شمار رفته و دلیل خاصیت ضد میکروبی اسانس سیر نیز به همین ترکیبات مربوط می‌باشد. محققین دیگری خواص ضد میکروبی برخی از ترکیبات آلایل را مورد بررسی و این موضوع را مورد تایید قرار داده‌اند. ترکیبات گوگردی موجود در اسانس سیر مانند: آلایل متیل سولفید، دی آلایل سولفید، آلایل متیل دی سولفید، دی آلایل دی سولفید، آلایل متیل تری سولفید و دی آلایل تری سولفید، نقش اصلی در خواص ضد میکروبی آن دارند. این ترکیبات گوگردی (به ویژه آلایل متیل تری سولفید)، فعالیت رادیکال‌زدایی بالایی دارند و می‌توانند از تشکیل ترکیبات سرطان‌زا مانند بنزوپیرن در فرآورده‌های گوشتی جلوگیری کنند. این خاصیت به مکانیسم ضدباکتری آن‌ها

با توجه به ضرورت حفظ کیفیت و افزایش پایداری محصولات فسادپذیر در طول نگهداری، استفاده از سامانه‌های طبیعی مانند نانوامولسیون‌ها و هیدروژل‌ها به عنوان رویکردهای نوین و مؤثر برای بهبود پایداری میکروبی مورد توجه روزافزون قرار گرفته است. در این پژوهش، اسانس سیر حاوی ۲۲ ترکیب شیمیایی شناسایی شده بود که ترکیبات غالب آن شامل دی آلایل دی سولفید (۶۰,۱۵٪)، تری سولفید دی پروپیل (۱۴,۲۲٪)، دی سولفید دی پروپیل (۹,۱۶٪) و دی آلایل سولفید (۵,۶۴٪)، بودند. در پژوهش دهاریا و همکاران (۲۰۲۱)، مشخص گردید که بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس سیر به ترتیب شامل دی آلایل دی سولفید (۴۸,۴۲٪)، دی آلایل سولفید (۷,۶۴٪)، آلایل متیل دی سولفید (۷,۲۷٪)، دی پروپیل و تری سولفید (۳,۴۶٪) می‌باشند (Dehariya et al., 2021). همچنین آنالیز اسانس سیر توسط سینجو و همکاران (۲۰۲۱)، نشان داد که فراوان

غلظت‌های پایین‌تر از اسانس، مهار رشد قوی‌تری ایجاد کند. در مجموع، نانوامولسیون سیر در مقایسه با اسانس خام، در بیشتر غلظت‌ها عملکرد ضدباکتریایی مؤثرتری نشان داده است. مقایسه نتایج اثرات ضدباکتریایی، می‌توان نتیجه گرفت که نانوامولسیون سیر نسبت به اسانس سیر عملکرد قوی‌تری دارد و باکتری‌های گرم‌مثبت حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی نشان داده‌اند. در مطالعه‌ای دیگر، اثر عصاره سیر پایدارشده با سورفکتانت و نانوامولسیون آب در روغن از نظر ویژگی‌های فیزیکی و فعالیت ضد میکروبی در کاربردهای غذایی بررسی شد. نتایج نشان داد که این نوع نانوامولسیون در غلظت‌های بالای عصاره سیر دارای خواص ضدباکتریایی مؤثری بوده و در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت اثربخشی بیشتری داشته است (Hassanzadeh et al., 2022). در مطالعه دیگری از نانوامولسیون اسانس سیر در سیستم‌های پوشش‌دهی غذایی مانند گوشت، سوسیس و روغن زیتون طعم‌دار جهت بررسی اثرات ضد میکروبی استفاده شده است. نانوامولسیون‌های اسانس سیر به کمک صمغ عربی باعث افزایش پایداری ترکیبات فرار و مؤثر موجود در اسانس سیر شدند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به حالت آزاد اسانس نشان دادند. در محصولاتی نظیر گوشت سرد، نانوامولسیون اسانس سیر توانست رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شریشیا کلی* را مهار کند و ماندگاری را تا یک هفته افزایش دهد. در محصولات گوشتی بسته‌بندی شده، فیلم‌های خوراکی حاوی نانوامولسیون اسانس سیر توانستند میزان بار میکروبی را به طور قابل توجهی کاهش دهند. این نتایج نشان‌دهنده اثر ماندگار و مؤثر ترکیبات سیر در جلوگیری از فساد مواد غذایی می‌باشد (Farazi et al., 2023). در مطالعه لیبو و همکاران (۲۰۲۴)، فعالیت‌های ضدباکتری، ضدبوفیلیم و مکانیزم اثر نانوامولسیون آبی اسانس سیر علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد بررسی قرار گرفت. نانوامولسیون اسانس سیر با اندازه ذره‌ای متوسط 136.43 نانومتر توانست رشد باکتری‌های پلانکتونی لیستریا را به طور قابل توجهی مهار کند. حداقل غلظت مهاری اسانس سیر در نانوامولسیون برابر با $512 \mu\text{g/ml}$ بود. اثر ضد میکروبی این نانوامولسیون وابسته

مرتبط است (Hu et al., 2021). وو و همکاران (۲۰۲۳)، در مطالعه‌ای به مقایسه ویژگی‌های ضدباکتریایی دو ترکیب آلایل متیل دی‌سولفید و دی‌متیل تری‌سولفید با ترکیبات فعال موجود در اسانس سیر پرداختند. در این تحقیق، فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات در برابر *شریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که هر دو ترکیب دارای اثر مهاری قابل توجهی بر رشد باکتری‌ها بوده و از پتانسیل بالایی برای کاربرد به‌عنوان عوامل ضدباکتریایی طبیعی در سیستم‌های زیستی برخوردار هستند (Wu et al., 2023). در پژوهش دیگری اثربخشی فعالیت فوق العاده ضد میکروبی دی‌آلیل دی‌سولفید، دی‌آلیل تتراسولفید، در مدل غذایی و آزمایشگاهی بر *شریشیا کلی* بررسی شد (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2008). تفاوت در نوع و میزان ترکیبات موجود در اسانس‌های گیاهی مانند اسانس سیر در مطالعات مختلف، به عوامل گوناگونی وابسته است. عواملی نظیر روش‌های کشت، ارتفاع از سطح دریا، شرایط آب‌وهوایی، نوع خاک، و زمان برداشت می‌توانند نقش مهمی در این تفاوت‌ها داشته باشند. افزون بر این، شیوه‌های استخراج اسانس نظیر تقطیر با بخار آب، استفاده از حلال‌های آلی یا روش فشردن، روش‌های مختلف آنالیز شیمیایی (کروماتوگرافی گازی یا طیف‌سنجی جرمی) هم می‌توانند به‌طور مستقیم بر نوع و نسبت ترکیبات استخراج‌شده در اسانس تأثیر بگذارند (Satyal et al., 2017; Vaičiulytė et al., 2022). در این مطالعه، نانوامولسیون سیر در اغلب موارد اثربخشی ضدباکتریایی بالاتری نسبت به اسانس سیر از خود نشان داده است. به‌عنوان نمونه، در غلظت $0.097 \mu\text{g/ml}$ ، میزان مهار رشد *شریشیا کلی* توسط نانوامولسیون 15.2% و توسط اسانس 7.6% بود. این تفاوت در غلظت‌های بالاتر نیز حفظ شده است. به‌طور کلی، *شریشیا کلی* و *سالمونلا* / *اتریکا* مقاومت بالاتری نسبت به سایر باکتری‌ها در برابر هر دو نوع فرمولاسیون نشان دادند، در حالی که *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* حساسیت بیشتری به اسانس و به‌ویژه نانوامولسیون سیر داشتند. در مورد *سودوموناس آئروژینوزا* نیز نانوامولسیون توانست در

وارد سلول‌های میکروارگانیسم‌ها شوند و اثرات ضد میکروبی خود را نشان دهند. اندازه نانو آن‌ها باعث می‌شود که بتوانند از طریق غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها عبور کنند و تأثیرات ضد میکروبی بیشتری ایجاد کنند (Paolino et al., 2021; Sharma et al., 2022). بررسی نتایج پژوهش‌های پیشین و تحقیق حاضر نشان می‌دهد که اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها در مقابل باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. دلیل این تفاوت در ساختار دیواره سلولی این دو گروه قرار دارد. باکتری‌های گرم مثبت دارای دیواره‌ای ضخیم‌تر و عمدتاً متشکل از لایه‌ای پپتیدوگلیکان هستند که ممکن است جذب اسانس‌های ضد میکروبی را تسهیل کند. در مقابل، باکتری‌های گرم منفی دارای دیواره‌ای پیچیده‌تر هستند که شامل غشای خارجی حاوی لیپیدها و پروتئین‌ها است. این غشا مانع نفوذ اسانس‌ها و ترکیبات ضد میکروبی به داخل سلول می‌شود. علاوه بر این، این باکتری‌ها سیستم‌های پمپ بیرون‌بر دارند که قادرند ترکیبات خارجی را از داخل سلول خارج کنند، و در نتیجه اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها کاهش می‌یابد. بنابراین، برای اثربخشی بیشتر اسانس‌ها بر باکتری‌های گرم منفی، نیاز به غلظت‌های بالاتری از این ترکیبات است (Angane et al., 2022; Seow et al., 2014).

نتیجه‌گیری

نانوآمولسیون‌ها به عنوان سامانه‌های نوین و کارآمد، قابلیت قابل توجهی در افزایش ایمنی و ماندگاری مواد غذایی از طریق مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فسادزا دارند. این سامانه‌ها، به واسطه‌ی پایداری فیزیکی بالا، قابلیت رهایش کنترل‌شده و فعالیت ضد میکروبی مؤثر، می‌توانند جایگزین مناسبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی متداول در صنایع غذایی باشند. به‌ویژه، نانوآمولسیون‌های حاوی اسانس سیر نسبت به اسانس خام، اثربخشی بیشتری در کنترل رشد میکروبی نشان داده‌اند. نتایج مطالعات حاکی از آن است که این ترکیبات می‌توانند به عنوان یک رویکرد طبیعی، ایمن و مؤثر برای افزایش طول عمر محصولات غذایی و کاهش

به زمان و غلظت بود، به این معنا که با افزایش مدت تماس یا غلظت، تأثیر آن تقویت می‌شد. همچنین، این اسانس توانست تشکیل بیوفیلم توسط لیستریا مونوسیتوژنز را به طور قابل توجهی کاهش دهد. نتایج این تحقیق نشان داد که نانوآمولسیون اسانس سیر تأثیر قابل توجهی بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز جداشده از شیر خام دارد و یافته‌ها با تحقیق حاضر، هم‌راستا هستند (Liu et al., 2024). لیو و همکاران (۲۰۲۲)، تأثیر نانوآمولسیون سیر در آب تهیه‌شده با امواج فراصوت با توان بالا را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جداشده از گوشت خوک بررسی نمودند. استفاده از امواج فراصوت با توان بالا اندازه ذرات اسانس سیر را از ۸۲۰٫۳ نانومتر به ۲۱۵ نانومتر کاهش داد. نانوآمولسیون بیشترین اثر ضد میکروبی با حداقل غلظت مهاری ۱٫۲۵ mg/ml را نشان داد. این نانوآمولسیون باعث مهار رشد سلولی باکتری و آسیب جدی به ساختار سلول شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که غشای سلولی به شدت آسیب دیده و ساختار سلول به کلی تخریب شده است. در تحقیق حاضر نیز نانوآمولسیون سیر اثر ضد میکروبی قابل توجهی بر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استاندارد و جدا شده از گوشت نشان داد (Liu et al., 2022). بررسی نتایج تحقیقات انجام شده بر روی اسانس‌های گیاهان نشان می‌دهد که هم اسانس و هم نانوآمولسیون اسانس سیر دارای اثرات ضدباکتریایی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مرتبط با مواد غذایی می‌باشند. اسانس‌ها به فرم کپسوله و نانو یا نانوآمولسیون نسبت به اسانس‌های خام دارای اثرات ضد میکروبی و پایداری بیشتری هستند. اسانس‌های خام به دلیل فرار بودن و حساسیت به شرایط محیطی مانند: نور، دما و اکسیژن، ممکن است سریعاً از بین بروند یا خواص خود را از دست بدهند. در مقابل، اسانس‌های کپسوله‌شده و نانوآمولسیون‌شده به دلیل محافظت توسط غلاف‌ها یا پوشش‌ها، مقاوم‌تر هستند و به راحتی تخریب نمی‌شوند. این پایداری بیشتر باعث می‌شود که این فرم‌های اسانس‌ها مدت زمان بیشتری مؤثر واقع شوند و از این رو می‌توانند در نگهداری مواد غذایی به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی استفاده شوند. در فرم نانوآمولسیون، اسانس‌ها قادرند به طور مؤثرتری

انجام شده است. در این راستا، نویسندگان از تمامی افرادی که در فرآیند انجام آن، همکاری و مساعدت نموده‌اند، قدردانی می‌نمایند.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ گونه تضاد منفعی ندارند.

وابستگی به ترکیبات نگهدارنده‌ی سنتتیک مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با همکاری مرکز تحقیقات ایمن سازی مواد غذایی و کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان

1. Angane, M., Swift, S., Huang, K., Butts, C. A., & Quek, S. Y. (2022). Essential oils and their major components: An updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry. *Foods*. 11(3): 464 .
2. Aranda, K. R. S., Fagundes-Neto, U., & Scaletsky, I. C. A. (2004). Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol*. 42(12): 5849-5853 .
3. Bantawa, K., Rai, K., Subba Limbu, D., & Khanal, H. (2018). Food-borne bacterial pathogens in marketed raw meat of Dharan, eastern Nepal. *BMC Res. Notes*. 11: 1-5 .
4. Chen, H., & Zhong, Q. (2022). Physical and antimicrobial properties of self-emulsified nanoemulsions containing three synergistic essential oils. *Int J Food Microbiol*. 365: 109557 .
5. Chen, J.-Q., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P., & Hu, Z. (2017). PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources, *Food Sci. Hum. Wellness*. 6(2): 39-59 .
6. Confessor, M. V. A., Agreles, M. A. A., Campos, L. A. d. A., Silva Neto, A. F., Borges, J. C., Martins, R. M., Cavalcanti, I. M. F. (2024). Olive oil nanoemulsion containing curcumin: antimicrobial agent against multidrug-resistant bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 108(1): 241 .
7. Dehariya, N., Guha, P., & Gupta, R. K. (2021). Extraction and characterization of essential oil of garlic (*Allium sativa* L.). *Int. J. Chem. Stud*, 9(1): 1455-1459 .
8. Espitia, P. J., Fuenmayor, C. A., & Otoni, C. G. (2019). Nanoemulsions: Synthesis, characterization, and application in bio-based active food packaging. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. 18(1):264-85.
9. Farazi, G., Asadi, G., & Gharachorloo, M. (2023). Investigating the effect of garlic essential oil nanoemulsion encapsulated with arabic gum on antioxidant activity, shelf life, and sensory properties of flavored olive oil. *J. Food Sci. Technol*. 20(140): 96-112 .
10. Hassanzadeh, H., Alizadeh, M., Hassanzadeh, R., & Ghanbarzadeh, B. (2022). Garlic essential oil-based nanoemulsion carrier: release and stability kinetics of volatile components. *Food Sci. Nutr*. 10(5):1613-25.
11. Hu, G., Cai, K., Li, Y., Hui, T., Wang, Z., Chen, C., Zhang, D. (2021). Significant inhibition of garlic essential oil on benzo [a] pyrene formation in charcoal-grilled pork sausages relates to sulfide compounds. *Food Res Int*. 141: 110127 .
12. Kariminik, A., Moradalizadeh, M., Foroughi, M. M., Tebyanian, H., & Motaghi, M. M. (2019). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils extracted from 4 medicinal plants (Labiatae) of Kerman, Iran. *J. Appl. Biotechnol. Rep*. 6(4): 172-179 .
13. Liu, M., Guo, W., Feng, M., Bai, Y., Huang, J., & Cao, Y. (2024). Antibacterial, anti-biofilm activity and underlying mechanism of garlic essential oil in water nanoemulsion against *Listeria monocytogenes*. *LWT*. 196: 115847 .
14. Liu, M., Pan, Y., Feng, M., Guo, W., Fan, X., Feng, L. Cao, Y. (2022). Garlic essential oil in water nanoemulsion prepared by high-power ultrasound: Properties, stability and its antibacterial mechanism against MRSA isolated from pork. *Ultrason. Sonochem*. 90: 106201 .
15. Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic

- shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol. 38(3): 1032-1035 .
16. Paolino, D., Mancuso, A., Cristiano, M. C., Froio, F., Lammari, N., Celia, C., & Fresta, M. (2021). Nanonutraceuticals: The new frontier of supplementary food. Nanomaterials, 11(3): 792 .
 17. Rattanachaikunsopon, P & Phumkhachorn, P. (2008). Diallyl sulfide content and antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria of chives (*Allium schoenoprasum*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 72(11): 2987-2991 .
 18. Satyal, P., Craft, J. D., Dosoky, N. S & Setzer, W. N. (2017). The chemical compositions of the volatile oils of garlic (*Allium sativum*) and wild garlic (*Allium vineale*). Foods. 6(8): 63 .
 19. Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H.-G. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. Crit Rev Food Sci Nutr. 54(5): 625-644 .
 20. Sepahvand, F., Rashidian, E., Jaydari, A., & Rahimi, H. (2022). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk of healthy sheep and goats. Vet. Med. Int. 2022(1):3206172.
 21. Sharma, S., Mulrey, L., Byrne, M., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2022). Encapsulation of essential oils in nanocarriers for active food packaging. Foods. 11(15): 2337 .
 22. Sindhu, M., Rajkumar, V., Annapoorani, C. A., Gunasekaran, C., & Kannan, M. (2023). Nanoencapsulation of garlic essential oil using chitosan nanopolymer and its antifungal and anti-aflatoxin B1 efficacy in vitro and in situ. Int. J. Biol. Macromol. 243:125160 .
 23. Swangsri, T., Reamtong, O., Saralamba, S., Rakthong, P., Thaenkham, U., & Saralamba, N. (2024). Exploring the antimicrobial potential of crude peptide extracts from *Allium sativum* and *Allium oschaninii* against antibiotic-resistant bacterial strains. Pharm. Biol. 62(1): 666-675 .
 24. Tao, J.-j., Xiang, J.-j., Jiang, M., Kuang, S.-f., Peng, X.-x., & Li, H. (2022). A microtitre plate dilution method for minimum killing concentration is developed to evaluate metabolites-enabled killing of bacteria by β -lactam antibiotics. Front. Mol. Biosci. 9: 878651 .
 25. Vaičiulytė, V., Ložienė, K., & Taraškevičius, R. (2022). Impact of edaphic and climatic factors on *Thymus pulegioides* essential oil composition and potential prevalence of chemotypes. Plants, 11(19): 2536 .
 26. Wu, C.-Y., Wang, C.-Y., Sun, G.-J., Li, Y.-Q., Liang, Y., Hua, D.-L., Mo, H.-Z. (2023). Antibacterial characteristics of allyl methyl disulfide and dimethyl trisulfide of *Allium tenuissimum* flower essential oil against *Escherichia coli* O157: H7. Ind. Crop. Prod. 202: 117058 .

Evaluation of the Antimicrobial Effects of Garlic Essential Oil and Nanoemulsion on Bacteria Isolated from Food Products

Azizabadi A^{1,2}, Ashraf Kariminik A^{*1,2}

¹Department of Microbiology, KeC., Islamic Azad University, Kerman, Iran

²Food and Agricultural Safety Research Center, KeC., Islamic Azad University, Kerman, Iran

*Corresponding Author) Email: kariminik@iauk.ac.ir

Abstract

Given the increasing need to preserve the quality and stability of perishable products, the use of essential oils and their nanoemulsions has emerged as a novel strategy for enhancing microbial stability in food systems. This study aimed to compare the antibacterial effects of garlic essential oil and its nanoemulsion against foodborne pathogenic bacteria, and to evaluate the potential application of garlic essential oil nanoemulsions in the food industry. Garlic essential oil was extracted via steam distillation, and its chemical composition was identified using gas chromatography. The nanoemulsion was formulated through a homogenization method. Antibacterial activity was assessed using the microtiter plate method against five bacterial species: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*. The main components of the essential oil were diallyl disulfide, dipropyl trisulfide, dipropyl disulfide, and diallyl sulfide. The results revealed that the garlic essential oil nanoemulsion exhibited significantly stronger antibacterial activity than the crude essential oil across all tested concentrations. *Salmonella enterica* showed the highest sensitivity, with 99.89% growth inhibition at 1.56 µg/ml. Both MIC and MBC values were notably lower for the nanoformulation, and statistical analyses confirmed significant differences between concentrations ($p < 0.001$). These findings highlight the high potential of garlic essential oil nanoemulsions as a natural and effective preservative for application in the food industry.

Keywords: Garlic essential oil, nanoemulsion, antibacterial effects, food products.