



ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی نانولیپوزوم اسانس باریجه و اثر ضد میکروبی آن بر

باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7

مسعود نجف نجفی^{۱*}، آنتینا آریان مهر^۲، علی محمدی ثانی^۲

۱- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، قوچان، ایران

چکیده	مقاله پژوهشی اصیل
مقدمه <i>اشریشیا کلی</i> یک باکتری مهم بیمارزا است که از طریق آب و مواد غذایی آلوده منتقل می‌شود. هدف از این پژوهش، ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی نانولیپوزوم اسانس باریجه و اثر ضدباکتریایی آن بر روی <i>اشریشیا کلی</i> O157:H7 بود. مواد و روش‌ها نانولیپوزوم به روش هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت تولید شد. اندازه ذره‌ای، شاخص بس‌پاشیدگی و کارایی سیستم درون‌پوشانی مورد بررسی گرفت. حداقل غلظت بازدارنده رشد و حداقل غلظت کشندگی اسانس و نانولیپوزوم حاوی اسانس باریجه به روش رقیق کردن در محیط مایع بر علیه باکتری <i>اشریشیا کلی</i> O157:H7 تعیین گردید. همچنین رشد این باکتری در مجاورت غلظت‌های مختلفی از حداقل غلظت بازدارندگی رشد اسانس در دو حالت آزاد و درون‌پوشانی شده در زمان‌های منتخب پس از کشت انجام شد. یافته‌ها اندازه نانولیپوزوم خالی و نانولیپوزوم حاوی اسانس به ترتیب ۱۳۸/۷۶ و ۸۱/۴۷ نانومتر بود. همچنین نانولیپوزوم حاوی اسانس شاخص بس‌پاشیدگی کمتری داشت. کارایی درون‌پوشانی به میزان ۷۳/۲۶ درصد به دست آمد. حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی اسانس در حالت درون‌پوشانی نسبت به حالت آزاد کمتر بود. استفاده از اسانس آزاد با غلظت ۷۵ درصد حداقل غلظت کشندگی در مقایسه با نمونه کنترل سبب کاهش لگاریتمی تعداد باکتری CFU/mL ۳/۲۸ و ۱/۱۲ به ترتیب در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از کشت گردید. این کاهش در نانولیپوزوم حاوی اسانس به ترتیب CFU/mL ۳/۴ و ۲/۵۳ لگاریتم بود ($p < 0.05$). نتیجه‌گیری نانولیپوزوم اسانس باریجه به شکل مؤفقیت‌آمیزی به روش هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت تولید شد و اثر ضد میکروبی بیشتری بر روی <i>اشریشیا کلی</i> O157:H7 نسبت به اسانس آزاد داشت. کلیدواژه‌ها اسانس باریجه، نانولیپوزوم، ضد میکروبی، <i>اشریشیا کلی</i> O157:H7	تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۹ *نویسنده مسئول: مسعود نجف نجفی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی تلفن: ۰۵۱۳۸۷۱۷۱۲۴ پست الکترونیک: m.najafnaji@areeo.ac.ir



مقدمه

بیماری‌های منتقل شده از راه غذا یکی از مشکلات اصلی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌گردند که سالانه میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان بدان مبتلا و برخی نیز جان خود را از دست می‌دهند. باکتری‌هایی مانند *سالمونلا*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *شریشیا کلی* بیشتر از دیگر عوامل بیماری‌زا که به‌وسیله غذا منتقل می‌شوند سبب بروز و شیوع بیماری و حتی مرگ شده‌اند (۱). باکتری *شریشیا کلی* O157:H7 یک سویه انتروهموراژیک است که از نظر بهداشت عمومی از اهمیت جهانی برخوردار می‌باشد. دوز عفونت‌زایی این باکتری در انسان بسیار کم است و یکی از خطرناک‌ترین عوامل بیماری‌زا می‌باشد که از طریق آب و مواد غذایی مانند گوشت، شیر، آب‌میوه‌ها و سبزی‌ها منتقل شده و سبب ایجاد بیماری‌هایی نظیر کولیت خونریزی‌دهنده، سندرم کم‌خونی همولیتیک و آسیب‌های کلیوی می‌شود (۲). بنابراین، استفاده از نگهدارنده‌های کارآمد برای کنترل و از بین بردن این باکتری پاتوژن از محصولات غذایی ضروری است. در سال‌های اخیر، با توجه به نگرانی مصرف‌کنندگان در مورد ایمنی نگهدارنده‌های شیمیایی، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته است (۳). گیاهان مختلفی به‌خاطر دارا بودن اسانس با خواص ضد میکروبی شناخته شده‌اند (۴، ۵). خواص میکروبی اسانس‌های حاصل از این گیاهان در برابر طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها و قارچ‌ها تاکنون مورد بررسی قرار گرفته است (۴، ۵، ۶). استفاده از این اسانس‌ها به‌صورت آزاد با محدودیت‌هایی همراه است. اغلب اسانس‌ها نسبت به شرایط محیطی نظیر اکسیژن، نور و دما حساس هستند و در آب نامحلول می‌باشند. علاوه بر این، اسانس‌ها در محصولات ایجاد بو و مزه می‌کنند که این امر خوشایند مصرف‌کنندگان نیست (۷). یکی از روش‌های کاهش این محدودیت‌ها،

درون‌پوشانی کردن اسانس‌ها است که بر حسب اندازه ذرات تولید شده به دو گروه میکرو و نانو تقسیم می‌شوند. درون‌پوشانی اسانس‌ها در مقیاس نانو می‌تواند به محافظت آنها در برابر شرایط محیطی کمک بیشتری کند، حلالیت آنها را در آب افزایش دهد، به رهایش هدفمند آنها کمک کند و کارایی و دسترسی زیستی این قبیل ترکیبات آبریز را نیز افزایش دهد (۷، ۸). درون‌پوشانی با نانولیپوزوم‌ها یکی از تلاش‌های قابل توجه به این منظور است که در سیستم‌های غذایی و دارویی مورد توجه می‌باشد (۹). نانولیپوزوم‌ها ذرات کلئیدی تشکیل شده از مولکول‌های لیپیدی (عمدتاً فسفولیپیدها) هستند که به‌محض واکنش با آب به شکل سازمان یافته و به فرم غشاهای دولایه‌ای تجمع می‌یابند و در اثر وارد شدن انرژی و نیروی برشی (هموژنیزاسیون، سونیکاسیون) به‌صورت کروی (وزیکول) در می‌آیند و با توجه به ساختار منحصر به‌فرد و خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاص، می‌توانند هر سه گروه ترکیبات آب‌دوست، آبریز و دوگانه‌دوست را درون‌پوشانی کنند (۱۰). در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی برای استفاده از نانولیپوزوم‌ها به‌منظور درون‌پوشانی نگهدارنده‌های طبیعی انجام شده است (۱۱).

باریجه^۱ از خانواده چتریان^۲، گیاه علفی، چندساله و مونوکارپیک می‌باشد و در استان‌هایی نظیر سمنان، خراسان‌رضوی، خراسان‌شمالی، اصفهان و فارس پراکنده است (۱۲) و به دلیل داشتن ترکیبات شیمیایی مختلف از جمله ترپنوئید، کومارین، استرهای عطری، اسیدها و الکل‌های ترپنی مورد توجه زیادی است (۱۳). این گیاه علاوه بر کاربردهای صنعتی به‌عنوان یک ماده ضد تشنج، ضد افسردگی، ملین و ضد عفونی‌کننده کاربردهای متعدد

^۱ *Ferula gummosa* Boiss

^۲ *Apiaceae*



جرمی مدل Agilent 5977A، تجزیه شد. دتکتور FID (یونیزاسیون شعله هیدروژن)، گاز حامل هلیوم، سرعت جریان گاز حامل ۱/۱ میلی لیتر در دقیقه و انرژی یونیزاسیون در طیف سنجی جرمی معادل ۷۰ الکترون بود. برنامه دمایی ستون از ۶۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی گراد با سرعت افزایش ۵ درجه در دقیقه تنظیم شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰ درجه سانتی گراد ثابت ماند. شناسایی اجزای اسانس در نتیجه مقایسه طیف جرمی آنها با بانک طیفی و مقایسه ضرایب بازداری آنها با مقادیر مرجع صورت گرفت (۱۸).

تهیه نانولیپوزوم

نانولیپوزوم اسانس باریجه با استفاده از روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت مطابق روش محمدی و همکاران (۲۰۱۴) تهیه گردید (۹). برای این منظور، لستین-کلسترول به نسبت ۵:۱ در ترکیبی از حلال های دی کلرومتان - متانول با نسبت ۱:۱ حل شد. سپس اسانس باریجه به این مخلوط اضافه گردید. تبخیر حلال در اواپراتور چرخشی (Heidolph، مدل MB400، آلمان) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انجام شد. لایه نازک تشکیل شده توسط ۱۵ میلی لیتر آب مقطر استریل هیدراته گردید. لیپوزوم های تولید شده در این مرحله چندلایه و در مقیاس میکرومتری بودند (۱۹). هموزنی زاسیون نمونه ها توسط هموزنایزر (Heidolph، مدل ART31126، آلمان) با دور ۲۰۰۰ rpm و در دمای بالاتر از انتقال فاز لیپوزومی (۷۰ درجه سانتی گراد) به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (۹). در نهایت عمل سونیکاسیون نمونه های لیپوزومی توسط سونیکاتور پروب (مدل Up 200Ht، آلمان) با ۵ سیکل ۱ دقیقه ای و ۱ دقیقه استراحت بین هر سیکل، انجام شد.

دارویی نیز دارد (۱۲). همچنین خصوصیات ضد میکروبی اسانس باریجه توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. تأثیر اسانس باریجه بر /شیریشیا کلی و سودوموناس /ائروژینوزا (۱۴)، اثر آن بر میکروکوکوس /لوتئوس و /استافیلوکوکوس /پیدرمیدیس (۱۵)، اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی (۱۶) از جمله این مطالعات می باشد. اغلب تحقیقات انجام شده اثرات ضد میکروبی اسانس باریجه را به دو ترکیب عمده موجود در آن یعنی آلفا و بتا پنین نسبت داده اند (۱۲، ۱۵، ۱۷). تاکنون پژوهشی در خصوص تولید نانولیپوزوم اسانس باریجه و مقایسه اثر ضد میکروبی آن با اسانس آزاد انجام نشده است. لذا با توجه به اهمیت استفاده از اسانس های گیاهان دارویی در تولید مواد غذایی، این پژوهش با هدف تولید نانولیپوزوم اسانس باریجه به روش هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت و ارزیابی ویژگی های فیزیکی نانولیپوزوم و اثر ضدباکتریایی آن بر روی /شیریشیا کلی O157:H7 انجام گرفت.

مواد و روش ها

مواد

فسفولیپید (ال - آلفا - لستین گرانولار با درجه خلوص ۹۹ درصد، شرکت Across آمریکا)، کلسترول (با درجه خلوص ۹۵ درصد)، دی کلرومتان، متانول، محیط کشت های مورد استفاده و سایر مواد از شرکت مواد شیمیایی مرک (Darmstadt, Germany chemical Co. Merck) تهیه شدند. اسانس باریجه از شرکت باریج اسانس کاشان خریداری گردید.

شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس

نمونه اسانس با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی گازی جرمی (GC/MS) مدل Agilent 7890B حاوی ستون موئینه (به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) متصل به طیف سنج



تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات

متوسط قطر و توزیع اندازه نانولیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه زتاسایزر (Nano-Zeta sizer, UK مدل Malvern) بر اساس روش پراکندگی نور پویا در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زاویه پراش ۹۰ درجه اندازه‌گیری گردید. کلیه نمونه‌ها در سه تکرار اندازه‌گیری شدند و در انتها متوسط اندازه ذرات و شاخص بس‌پاشیدگی^۱ برای هر یک از نمونه‌ها گزارش گردید.

کارایی درون‌پوشانی

کارایی درون‌پوشانی توسط روش دیالیز در ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از یک غشای سلولزی (با وزن مولکولی ۱۰ کیلودالتون) برای جدا کردن نانولیپوزوم‌ها و اسانس‌های درون‌پوشانی شده تعیین گردید (۲۰). لیپوزوم‌های دیالیز شده بوسیله متانول (Darmstadt, Merck, آلمان) تخریب شد و مقدار اسانس درون‌پوشانی شده با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل Shimadzu UV 160A, ژاپن) در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

سویه باکتریایی

به‌منظور انجام تحقیق از سویه استاندارد باکتری گرم منفی /شریشیا کلی O157:H7 تهیه شده از مرکز ذخایر ژنتیک ایران استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

جهت آماده‌سازی میزان تلقیح سویه‌های باکتریایی، باکتری مورد نظر به لوله‌های حاوی محیط آگوست قلب و مغز (BHI) منتقل شدند و بعد از ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد از سوسپانسیون باکتریایی حاصل

در داخل کووت^۵ استریل به‌میزانی ریخته شد تا تراکم باکتریایی حدود 1×10^8 CFU/mL با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Shimadzu UV 160A, ژاپن) در طول موج ۶۰۰ نانومتر حاصل شود. برای تخمین تعداد سلول‌های باکتریایی در سوسپانسیون‌ها، از محیط کشت آگار قلب و مغز استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC)

برای تعیین MIC، روش رقیق کردن در محیط مایع^۶ مورد استفاده قرار گرفت (۳). پس از تهیه غلظت‌های مختلف فرم‌های آزاد و نانولیپوزومی از اسانس باریجه (بین صفر تا ۶ درصد) در لوله‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی آگوست BHI با ۵ درصد (V/V) دی متیل سولفوکسید (به‌عنوان امولسیفایر) و ۰/۰۵ درصد (w/v) آگار-آگار (به‌عنوان تثبیت کننده)، ۲۰ میکرومتر سوسپانسیون باکتریایی با 1×10^6 CFU/mL به هر لوله اضافه گردید. لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و در نهایت کدورت در لوله‌ها برای تعیین MIC مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین MBC، ۱۰۰ میکرومتر سوسپانسیون در هر لوله بدون رشد قابل مشاهده (کدورت) روی محیط کشت BHI آگار پخش شد و در دمای ۳۷ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد (۲۰).

ارزیابی رشد و تکثیر باکتری /شریشیا کلی تحت تأثیر

نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس باریجه

جهت اثبات خاصیت ضد میکروبی نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس باریجه از روش تهیه رقت در آگار استفاده شد.

^۵ Cuvett

^۶ Colony Forming Unit (CFU)

^۷ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

^۸ Broth Macrodilution

^۹ Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

^۱ Dynamic light scattering

^۲ z-average

^۳ Polydispersity index

^۴ Brain Heart Infusion



باکتری /شریشیا کلی با غلظت 1×10^5 CFU/mL در محیط آبگوشت قلب و مغز با غلظت‌های مختلف بازدارنده از نمونه‌های نانولیپوزوم حاوی اسانس و اسانس آزاد باریجه (MIC ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد) تهیه گردیدند و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. شمارش کلنی‌ها در ۰، ۱، ۳، ۵، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری بر روی محیط کشت BHI آگار انجام شد.

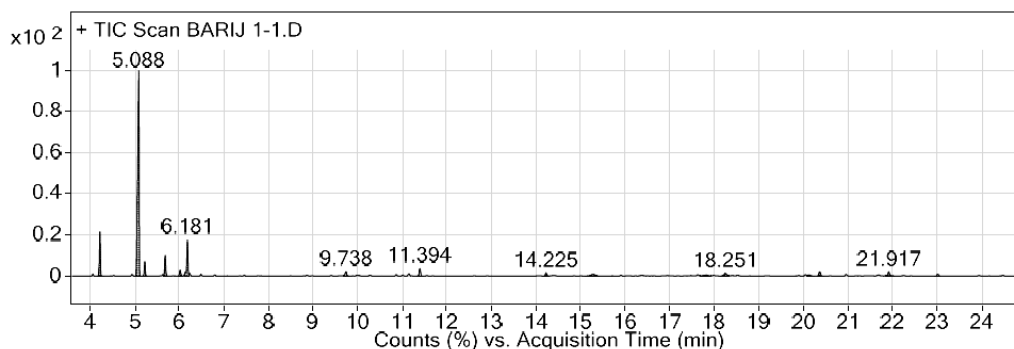
طرح آماری

آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نرم افزار آماری Minitab در سطح احتمال ۹۵ درصد ($p < 0.05$) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

بررسی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس باریجه

در این تحقیق ۱۶ ترکیب در اسانس باریجه شناسایی شد (جدول ۱). بتاپینن (۶۰/۸۴ درصد)، آلفاپینن (۹/۱۴ درصد) و بتافنالدین (۶/۹۴ درصد) عمده ترکیبات موجود در این اسانس بودند (شکل ۱). قاسمی و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که آلفاپینن (۲۷/۲۷ درصد)، بتاپینن (۴۳/۷۸ درصد) و میریسن (۳/۳۷ درصد) سه ترکیب عمده تشکیل دهنده اسانس باریجه هستند (۱۲). در تحقیق دیگری مشخص گردید که پس از سه ترکیب فوق، لینالول، آلفا ترپینولن، دلتا ۳ کارن و ترپینولن مهمترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس باریجه مورد بررسی بوده است (۲۱). پژوهش حاضر با شناسایی دو ترکیب عمده آلفا و بتاپینن مشابه نتایج سایرین بود و تفاوت‌های مشاهده شده در میزان مواد تشکیل دهنده اسانس با سایر گزارشات احتمالاً به دلیل تفاوت در روشگاه و زمان جمع‌آوری گیاه و روش اسانس‌گیری باشد.



شکل ۱- کروماتوگرام GC/MS اسانس گیاه باریجه



جدول ۱- ترکیب شیمیایی اسانس باریجه توسط دستگاه GC/ MS

ردیف	نام ماده	زمان بازداری	درصد (%)
۱	1R- α -Pinene	۴/۲۱۹	۹/۱۴
۲	β -Pinene	۵/۰۸۸	۶۰/۸۴
۳	β -Myrcene	۵/۲۲۳	۳/۰۵
۴	3-Carene	۵/۶۸۵	۴/۶۴
۵	β -Cymene	۶/۰۱۸	۱/۴۳
۶	β -Phellandrene	۶/۱۸۱	۶/۹۴
۷	1,3,5-Undecatriene, (E,Z)-	۹/۷۳۸	۱/۲۱
۸	p-Cymene, 2-methoxy	۱۱/۳۹۴	۲/۱۵
۹	α -Terpinyl acetate	۱۴/۲۲۵	۰/۹۳
۱۰	Guaiol	۱۵/۲۷۷	۱/۴۴
۱۱	2-(4a,8-Dimethyl-2,3,4,5,6,8a-hexahydro-1H-naphthalen-2-yl)propan-2-ol	۱۷/۸۳	۰/۷۷
۱۲	---	۱۸/۲۵۱	۱/۴۵
۱۳	Guaiac acetate	۲۰/۱۳۱	۰/۶۱
۱۴	---	۲۰/۳۶۹	۱/۳
۱۵	Bulnesol	۲۱/۹۱۷	۱/۴۹
۱۶	Guaiac acetate	۲۳/۰۱۶	۰/۶۳

تعیین اندازه ذره‌ای، شاخص بس‌پاشیدگی و کارایی

درون‌پوشانی

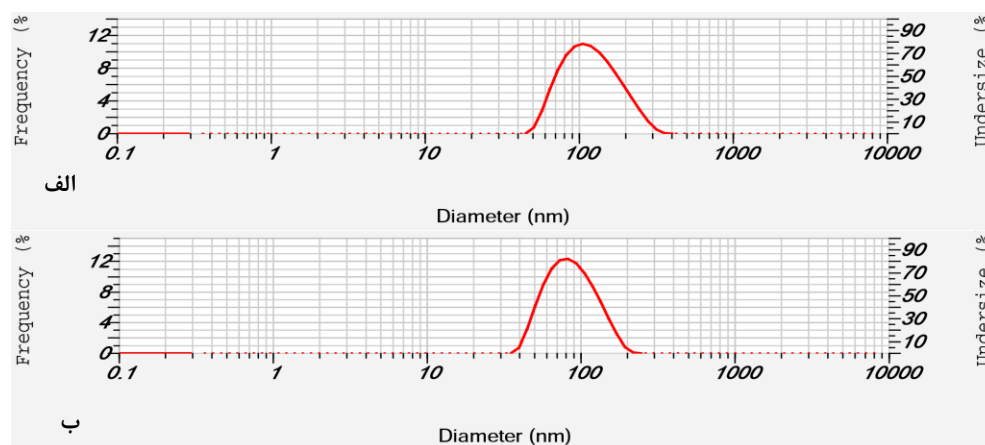
نتایج مربوط به میانگین اندازه ذره، شاخص بس‌پاشیدگی و کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم اسانس باریجه در مقایسه با نانولیپوزوم خالی در جدول ۲ آورده شده است. همان‌طور که

نتایج نشان می‌دهد اسانس توانسته است اندازه نانولیپوزوم را تحت تأثیر قرار دهد و نانولیپوزوم خالی اندازه بزرگتری داشت. نتایج شاخص بس‌پاشیدگی بیانگر پراکندگی در حدود ۰/۱۲ بود (شکل ۲). همچنین کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌ها حدود ۴۳/۲۶ درصد تعیین گردید (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین اندازه ذره‌ای، شاخص بس‌پاشیدگی و کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم اسانس باریجه

نمونه	متوسط اندازه (nm)	شاخص بس‌پاشیدگی	کارایی درون‌پوشانی (%)
نانولیپوزوم	$138.76 \pm 2.37^{a*}$	0.161 ± 0.05^a	-
نانولیپوزوم + اسانس	81.47 ± 2.93^b	0.113 ± 0.09^b	۴۳/۲۶

* حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($p < 0.05$).



شکل ۲- توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های الف) خالی و ب) حاوی اسانس باریجه

تعیین حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت

بازدارندگی

نتایج آزمون‌های ضد میکروبی در جدول ۳ آورده شده است. بر اساس نتایج حاصله مقادیر MIC و MBC برای

نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس باریجه به ترتیب ۰/۰۱۵ درصد و ۰/۰۳ درصد و برای اسانس باریجه آزاد ۰/۰۳ درصد و ۰/۰۴ درصد بود.

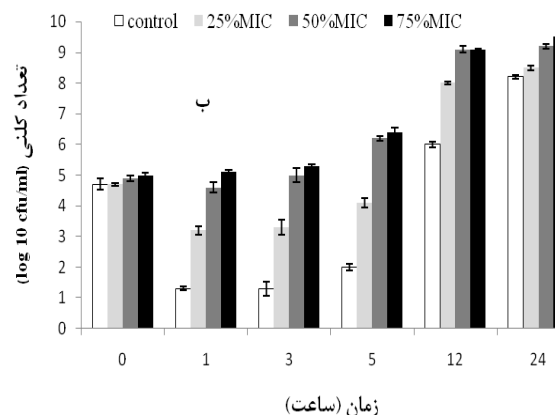
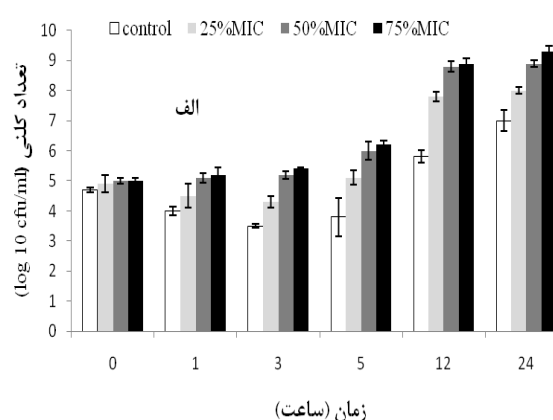
جدول ۳- مقادیر MIC و MBC اسانس آزاد و نانولیپوزوم حاوی اسانس بر علیه باکتری /شریشیا کلی O157:H7

نمونه	MIC	MBC
اسانس آزاد (V/V%)	۰/۰۳	۰/۰۴
نانولیپوزوم حاوی اسانس (V/V%)	۰/۰۱۵	۰/۰۳

* حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($p < 0.05$).

رشد /شریشیا کلی: نتایج رشد باکتری در حضور غلظت‌هایی از اسانس آزاد و نانولیپوزوم حاوی اسانس (۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد MIC) در شکل ۳ نشان داده شده است. بیشترین تأثیر اسانس بر رشد باکتری در غلظت ۷۵ درصد اسانس آزاد و نانولیپوزوم حاوی اسانس مشاهده گردید. شمارش باکتری در ۲ ساعت ابتدایی پس از تلقیح مخصوصاً در غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ درصد MIC کاهش نشان داد اما بعد از آن افزایش یافت. همچنین مشخص گردید که

نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس با غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ درصد MIC فعالیت ممانعت‌کننده‌ای بالاتری نسبت به اسانس آزاد در برابر باکتری داشتند. استفاده از اسانس آزاد با غلظت ۷۵ درصد MIC در مقایسه با نمونه کنترل سبب کاهش لگاریتمی تعداد باکتری CFU/mL ۳/۲۸ و ۱/۱۲ به ترتیب در ۱۲ و ۲۴ ساعت گردید. این کاهش در نانولیپوزوم حاوی اسانس به ترتیب CFU/mL ۳/۴ و ۲/۵۳ لگاریتم بود ($p < 0.05$).



شکل ۳- تشکیل کلنی /شریشیاکلی بر غلظت های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد MIC (الف) نانولیپوزوم حاوی اسانس باریجه و (ب) اسانس باریجه

شاخص، بیان گر توزیع ذره‌ای باریک‌تر است، بنابراین قطر ذرات یکنواخت‌تر می‌باشد (۲۵). مقدار کمتر از ۰/۱ برای این شاخص نشان می‌دهد که ذرات همگن هستند و بیش از ۰/۳ نشان‌دهنده ناهمگنی ذرات است (۲۶). با توجه به مطالب عنوان شده می‌توان نتیجه گرفت که روش تولید مورد استفاده (هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت) برای تولید لیپوزوم پایدار در مقیاس نانو و توزیع اندازه یکنواخت مناسب بوده است (شکل ۲).

مطالعات انجام شده به منظور شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس باریجه نشان داده است که حدود ۶۳-۷۵ درصد اسانس باریجه را هیدروکربن‌های مونوترپنی تشکیل می‌دهند که حاوی بتاپینن، آلفاپینن، دلتا-۳-کارن و هیدروکربن‌های دیگر مانند میرسن، پاراسیمن، لیمونن، ترپینولن، الکل‌های مونوترپنی و استات، سزکوئیت‌رین‌ها، آزلول‌ها، استرهای تیول، پیرازین‌ها و هیدروکربن‌های با اسکلت غیر ترپنی می‌باشد (۱۳) که بتا پینن (۶۹/۲-۲۶/۹ درصد) و آلفاپینن (۳۳/۹-۱/۴ درصد) دو ترکیب اصلی این اسانس هستند و دلتا-۳-کارن (۱۱/۸-۰/۶ درصد) و لیمونن

بحث

با بررسی تغییر اندازه ذرات مشاهده شد که حضور اسانس تغییر معنی‌داری در اندازه وزیکول‌ها ایجاد کرد و نانولیپوزوم حاوی اسانس از نانولیپوزوم خالی کوچک‌تر بود (جدول ۱) ($p < 0.05$). دلیل این پدیده مربوط به قابلیت اسانس‌ها برای ایجاد انسجام و فشردگی بیشتر بین زنجیره‌های غیرقطبی در وزیکول‌های غشایی است (۲۲). تورینا و همکاران (۲۰۰۶) پیشنهاد کردند که مونوترپن‌ها می‌توانند اندازه لیپوزوم‌ها را با افزایش انحنا سطح فسفاتیدیل کولین کاهش داده و آنها را روی گروه قطبی غشاء قرار دهند (۲۳). نتایج مشابهی توسط دتونی و همکاران (۲۰۰۹) و خطیبی و همکاران (۲۰۱۶) به ترتیب در خصوص زانتوکسیلوم تینگواسوبا و زاتاریا مولتی فلورا بیوس حاصل شده است (۲۰، ۲۳). همچنین سیستم نانولیپوزومی تهیه شده در این مطالعه، پراکندگی (شاخص بس‌پاشیدگی پایین) بهتری را برای وزیکول‌ها نشان داد (جدول ۲). کوچک بودن این

^۱ *Zanthoxylum tingoassuiba*

^۲ *Zataria multiflora* Bioss



(۹/۱۵-۱/۰۶ درصد) در رتبه‌های بعدی قرار می‌گیرند (شکل ۱) (۱۷). ترکیبات منوترپنی، خاصیت چربی‌دوستی نسبی دارند و در آب نیز حل می‌شوند در نتیجه باعث ایجاد اغتشاش در بخش لیپیدی پلاسما و غشاء زیستی میکروارگانیسم‌ها می‌گردند. این تغییرات منجر به نفوذپذیری غشاء و نشت ترکیبات داخل سلول و در نهایت مرگ سلول می‌گردد (۲۷). همچنین ممکن است اسانس باریجه توانایی عبور از غشاء را به دلیل هم‌خوانی ساختارش با ساختار غشاء میکروبی داشته باشد (۲۸). آلفا و بتا پنین دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بوده و اثر حشره‌کشی نیز دارند (۱۲). صالحی و همکاران (۲۰۱۴ و ۲۰۱۵) دریافتند عصاره الکلی گیاه باریجه بر *S. aureus* و *E. coli* و *C. albicans* اثر مهاری و کشندگی دارد (۲۹-۳۰). قاسمی و همکاران (۲۰۰۵) فعالیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و ضد قارچی اسانس باریجه را به میزان آلفا و بتا-پنین موجود در اسانس نسبت دادند (۱۲). عابدی و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت ضد میکروبی *S. aureus* را بررسی کردند. نتایج نشان داد اسانس این گیاه رشد *S. aureus* (MIC=۰/۲۵ µg/ml)، *S. aureus* / *Staphylococcus aureus* / *Staphylococcus aureus* (MIC=۳/۱۲۵ µg/ml) و *S. aureus* / *Staphylococcus aureus* (MIC=۶/۲۵) را مهار کرد (۱۴).

نتایج این تحقیق مشخص کرد که غلظت‌های MIC و MBC اسانس پس از درون‌پوشانی در نانولیپوزوم کاهش یافت (جدول ۳). این مطلب نشان‌دهنده افزایش فعالیت ضد باکتریایی در سیستم لیپوزومی نسبت به حالت آزاد می‌باشد. این امر می‌تواند به این دلیل باشد که در سطح غشاء باکتری‌ها حفراتی وجود دارد که محل ورود و خروج مواد می‌باشد، هرچه نانوذرات تولیدی کوچک‌تر باشد راحت‌تر می‌توانند به این حفرات وارد شده و ماده زیست فعال خود را

آزاد سازند. علاوه بر این، به دلیل اینکه جنس نانولیپوزوم از فسفولیپید بود، سیالیت غشایی بیشتری داشته در نتیجه در این حالت اسانس راحت‌تر می‌تواند از غشای باکتریایی به داخل سلول نفوذ کند و سبب تخریب دیواره سلولی شود (۳۱). وو و همکاران (۲۰۱۵) عنوان کردند که سیستم‌های تحویل در مقیاس نانومتری مانند نانولیپوزوم‌ها، با توجه به اندازه‌های کوچک سلولی، می‌توانند فعالیت‌های ضد میکروبی ترکیبات درون‌پوشانی شده را با افزایش مکانیسم جذب سلولی غیرفعال، کاهش مقاومت در برابر انتقال جرم افزایش دهند (۳۲). علاوه بر این، افزایش فعالیت ضد میکروبی اسانس لیپوزومی در این مطالعه ممکن است به برهم‌کنش مؤثر بین باکتری و ترکیبات زیست فعال مرتبط باشد. مکانیسم‌های متعددی برای برهم‌کنش لیپوزوم‌ها با سلول‌ها مانند انتقال غشاء داخلی، رهایش تماسی، جذب، فاگوسیتوز و امتزاج تاکنون پیشنهاد شده است (۳۳). ساچتلی و همکاران (۲۰۰۰) عنوان کردند که افزایش خاصیت ضد میکروبی سیستم لیپوزومی حاوی اسانس مربوط به ممانعت نفوذ پذیری و هیدرولیز آنزیمی با امتزاج بین لیپوزوم‌ها و غشاء باکتری می‌باشد (۳۴). نتایج مشابهی تاکنون در خصوص افزایش خاصیت ضد میکروبی اسانس‌ها پس از درون‌پوشانی در سیستم لیپوزومی مانند عصاره سیر (۳)، عصاره لیمو (۳۲)، عصاره چای سبز (۳۵) و اسانس میخک (۳۷) منتشر شده است.

همچنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس با غلظت ۵۰ و ۷۵ درصد MIC، به شکل معنی‌داری باعث کاهش رشد باکتری *S. aureus* کلی در مقایسه با اسانس آزاد گردید (شکل ۳) ($p < 0.05$). جمعیت نهایی باکتری‌ها (cfu/ml) در تمامی

^۱ Contact release

^۲ Fusion



ساعت‌های مورد بررسی مخصوصاً پس از ۲۴ ساعت، در مورد ۵۰ و ۷۵ درصد MIC کمتر از نمونه اسانس آزاد بود. این اثر می‌تواند به رهائش تدریجی اسانس از لیپوزوم‌ها مرتبط باشد که در ۲۴ ساعت بعد از تلقیح باکتری همچنان ادامه داشت.

نتیجه‌گیری

با افزایش روزافزون آگاهی مصرف‌کنندگان مواد غذایی نسبت به مضرات استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و تقاضای رو به رشد مصرف غذاهای سالم، گرایش به استفاده از مواد دارای فعالیت ضد میکروبی با منشأ طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی افزایش یافته است. اسانس‌ها و ترکیبات سازنده آنها به گرما، نور و اکسیداسیون حساس هستند و به راحتی تجزیه می‌شوند. لیپوزوم‌ها می‌توانند حامل‌های مناسبی برای اسانس‌ها باشند. آنها ضمن محافظت از اسانس‌ها، فعالیت بیولوژیکی، رسانش هدفمند و تحویل سلولی از طریق غشای سیتوپلاسمی را افزایش می‌دهند. قبل از مطالعه حاضر، اطلاعات کمی در مورد تأثیر درون‌پوشانی لیپوزومی اسانس باریجه بر فعالیت باکتری /شریشیاکلی O157: H7 وجود داشت. این مطالعه نشان داد که سیستم نانولیپوزومی حاوی اسانس باریجه به‌طور مؤثری فعالیت ضد میکروبی در برابر این باکتری را افزایش داد. لذا

استفاده از این سیستم در مواد غذایی، داروها، لوازم آرایشی و بهداشتی می‌تواند مفید باشد. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به این موضوع اشاره کرد که بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی نانولیپوزوم حاوی اسانس باریجه در محیط آزمایشگاهی بر روی باکتری /شریشیاکلی انجام گرفت. در آینده باید مطالعه‌ای طراحی کرد تا این بررسی بر روی یک مدل غذایی آلوده انجام گیرد تا توانایی ضد میکروبی این سیستم در یک محیط واقعی و تأثیر ترکیبات موجود در غذا بر روی فعالیت آن نیز ارزیابی شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان انجام شده است. بدینوسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این واحد دانشگاهی اعلام می‌دارد.

تعارض منافع

در این پژوهش هیچ گونه تضاد منافی برای نویسندگان وجود ندارد.

References

1. Garcia P, Rodriguez L, Rodriguez A, Martinez B. Food bio preservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. Trends Food Sci Tech 2010; 21(8):373-82.
2. Ateba CN, Mbewe M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: Public health implications. Res Microbiol 2011; 162(3):240-8.
3. Zabihi A, Akhondzadeh Basti A, Amoabediny G, Khanjari A, Tavakkoly Bazzaz J, Mohammadkhan F, Hajjar Bargh A, Vanaki E. Physicochemical characteristics of nanoliposome garlic (*Allium sativum* L.) essential oil and its antibacterial effect on *Escherichia coli* O157:H7. J Food Qual Hazards Control 2017; 4(1):24-8.
4. Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. Int J Food Microbiol 2007; 117(1):112-9.
5. Akhondzadeh 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.



6. Liu Y, He L, Mustapha A, Li H, Hu ZQ, Lin M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* 2009; 107(4):1193–201.
7. Ortan A, Campeanu G, Dinu--Pirv C, Popesco L. Studies concerning the entrapment of *Anethum graveolens* essential oil in liposomes. *Rom Biotechnol Lett* 2009; 14(3):4411–7.
8. Samperio C, Boyer R, Egle WN, Holland KW, Mckinney JS, O'keefe SF, Smith R, Marcy JE. Enhancement of plant essential oils' aqueous solubility and stability using alpha and beta cyclodextrin. *J Agric Food Chem* 2010; 58(24):12950–6.
9. Mohammadi M, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Rezayi Mokarram R, Mohammadifar MA. Physical properties of vitamin D3-loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration-sonication. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 2014; 8(4):175-88. [Persian]
10. Fan M, Xu S, Xia S, Zhang X. Effect of different preparation methods on physicochemical properties of salidroside liposomes. *J Agric Food Chem* 2007;55(8):3089–95.
11. Mozafari R, Johnson M, Hatziantoniou S, Demetzos, C. Nano liposomes and their applications in food nanotechnology. *J liposome res* 2008; 18(4):309-27.
12. Ghasemi Y, Faridi P, Mehregan I, Mohagheghzadeh A. *Ferula gummosa* fruits: an aromatic antimicrobial agent. *Chem Nat Compd* 2005; 41(3):311-4.
13. Jalali HT, Petronilho S, Villaverde JJ, Coimbra MA, Domingues MRM, Ebrahimian ZJ. Deeper insight into the monoterpene composition of *Ferula gummosa* oleo-gum-resin from Iran. *Ind Crops Prod* 2012;36(1):500–7.
14. Abedi D, Jalali M, Sadeghi N. Composition and antimicrobial activity of oleogumresin of *Ferula gumosa* Boiss. essential oil using Alamar Blue™. *Research in Pharmaceutical Sciences* 2009; 3:41-5.
15. Pavlović I, Petrović S, Radenković M, Milenković M, Couladis M, Branković S, *et al.* Composition, antimicrobial, antiradical and spasmolytic activity of *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (*Apiaceae*) essential oil. *Food chem* 2012; 130(2):310-5.
16. Leite AM, Lima EDO, Souza ELd, Diniz MFFM, Trajano VN, Medeiros IA. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Rev Bras Ciênc Farm* 2007; 43:121-126.
17. Kouyakhi ET, Naghavi M, Alayhs M. Study of the essential oil variation of *Ferula gummosa* samples from Iran. *Chem Nat Comp* 2008; 44:124–26.
18. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography /Mass Spectroscopy, 4^{ed} ed. Allured Publishing Co. IL. USA;2008.
19. Kirby C, Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Nat Biotechnol* 1984; 2(11):979-84.
20. Khatibi SA, Masaghi A, Moosavy MH, Akhondzadeh Basti A, Koohi MK, Khosravi P, Haghirosadat F. Encapsulation of *Zataria Multiflora* Boiss. Essential oil into nanoliposomes and in vitro antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Processing and Preservation* 2016; 41:1-10.
21. Nabavi, SF, Habtemariam, S, Sureda, A, Nabavi, SM. *Ferula gummosa* Boiss as a rich source of natural antioxidants with numerous therapeutic uses. *Res Signpost* 2012; 2:15-26.
22. Valenti D, De Logu A, Loy G, Sinico C, Bonsignore L, Cottiglia F, Garau D, Fadda AM. Liposome-incorporation *Santolina insularis* essential oil: Preparation, characterization and in vitro antiviral activity. *J Liposome Res* 2001; 11:73–90.
23. Turina AV, Nolan MV, Zygodlo JA, Perillo MA. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. *Biophys Chem* 2006; 122:101–13.
24. Detoni CB, Cabral-Albuquerque ECM, Hohlemweger SVA, Sampaio C, Barros TF, Velozo ES. Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuiba* loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. *J Microencapsul* 2009; 26:684–91.
25. Ruozi B, Tosi G, Forni F, Fresta M, Vandelli MA. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25:81–89.
26. Maitani Y, Soeda H, Junping W, Takayama K. Modified ethanol injection method for liposomes containing beta-sitosterol beta-D-glucoside. *J Liposome Res* 2001; 11:115–25.
27. Moreira MR, Ponce AG, Delvalle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food born pathogen. *LWT – Food Sci Technol* 2005; 38:565-70.
28. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(6):2474-8.



29. Salehi M, Hashemi Karuie S, Nasrolahi Omran A, Mobini M, Asghar Hedari M. Effect of aqueous and alcoholic extracts of roots of *Ferula gummosa* Boiss. On the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. J Gorgan Uni Med Sci 2013; 15(4):18-22. [Persian]
30. Salehi M, Hashemi Karoui M, Nasrollahi Omran A, Mobini M, Aaghar Heydari M. Antifungal activity of in vitro aqueous and alcoholic extracts of Barije root (*Ferula gummosa*). J Birjand Uni Med Sci 2015; 21(4):444-50. [Persian]
31. Gharenaghadeh S, Forghani S, Gharehnaghadeh S, Sowti M. Evaluation of antimicrobial properties of methanolic extract, essential oil and nanolipozom of *Mentha piperita*. Iran J Food Sci Technol 2017; 68(14):93-102. [Persian]
32. Wu J, Liu H, Ge S, Wang S, Qin Z, Li C, Zheng Q, Liu Q, Zhang Q. The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. Food Hydrocolloid 2015; 43:427-35.
33. Shoji Y, Nakashima H. Nutraceuticals and delivery systems. J Drug Target 2004; 12:385-91.
34. Sachetelli S, Khalil H, Chen T, Beaulac C, Senechal S, Lagace J. Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. Biochim Biophys Acta 2000; 1463:254-266.
35. Noudoost B, Noori N, Amo Abedini, G, Gandomi, H, Akhondzadeh Basti A, Jebeli Javan A, Ghadami F. Encapsulation of green tea extract in nanoliposomes and evaluation of its antibacterial, antioxidant and prebiotic properties. JMP 2015; 3(55):66-78.
36. Gortzi O, Lalas S, Tsaknis J, Chinou I. Enhanced bioactivity of Citrus limon (Lemon Greek cultivar) extracts, essential oil and isolated compounds before and after encapsulation in liposomes. Planta Medica 2007; 73: 184.
37. Ahmad N, Alam MK, Shehbaz A, Khan A, Mannan A, Rashid Hakim S, Bisht D, Owaise M. Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis. J Drug Target 2005; 13:555-61.



Evaluation of physical properties of nanoliposome Barije (*Ferula gummosa* Boiss.) essential oil and its antimicrobial effect on *Escherichia coli* O157:H7

Masoud Najaf Najafi ^{*1}, Anita Arianmehr ², Ali Mohammadi Sani ²

1- Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

2- Department of Food Science & Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran

Original Article

Received: 10 Jun, 2019

Accepted: 10 Jul, 2019

***Corresponding Author:**
Masoud Najaf Najafi,
Khorasan Razavi
Agricultural and Natural
Resources Research and
Education Center,
Mashhad, Iran
TEL: +98 5138717124
Email:
m.najafnajafi@areeo.ac.ir

ABSTRACT

Introduction

Escherichia coli is an important bacterial pathogen transmitted through contaminated water and food. The aim of this study was to evaluate the physical characteristics of nanoliposome essential oil (EO) and its antibacterial effect on *E. coli*.

Materials and Methods

Nanoliposomes were prepared by thin-film hydration and sonication. Particle size, polydispersity index, and encapsulation efficiency were assessed. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of free EO and nanoliposome barije EO were determined by broth macrodilution against *E. coli*. Also, effect of different concentrations of the MIC of EO was evaluated before and after encapsulation against the growth of bacteria over 24 h.

Results

The average particle sizes of the empty and EO loaded nanoliposome were 138.76 and 81.47 nm, respectively. Also, EO loaded nanoliposome had lower polydispersity. Moreover, the encapsulation efficiency of nanoliposomes was determined about 73.26%. MIC and MBC levels for EO loaded nanoliposomes decreased in comparison with free EO. Using 75% MIC of free EO in comparison with control, the bacterial count decreased by 3.528 and 1.12 log (CFU/mL) after 12 and 24 h, respectively. This reduction in the EO loaded nanoliposomes was 3.40 and 2.33 (CFU/mL) log ($p < 0.05$).

Conclusion

Nanoliposomes encapsulated barije EO were prepared successfully using the thin-film hydration and sonication method and showed enhancing antimicrobial activity against *E. coli* O157:H7 in comparison with the non-encapsulated one.

Keywords

Barije essential oil, nanoliposomes, antimicrobial, *E. coli* O157:H7

► **Please cite this article as:** Najaf Najafi M, Arianmehr A, Mohammadi Sani A. Evaluation of physical properties of nanoliposome Barije (*Ferula gummosa* Boiss.) essential oil and its antimicrobial effect on *Escherichia coli* O157:H7. J Neyshabur Univ Med Sci 2019;7(3):14-26.