

علمی پژوهشی

## بررسی تاثیر نانوامولسیون اسانس ترخون بر بیان ژن های حدت اشرشیاکلی انتروهموراژیک

مریم عزیزخانی<sup>۱\*</sup>، فهیمه توریان<sup>۲</sup>، پولین شهره<sup>۳</sup>، راضیه پرتوی<sup>۲</sup>، محمدحسن شاهوی<sup>۴</sup>

۱- دکترای تخصصی، دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن آوری های نوین آمل، آمل، ایران.

۲- دکترای تخصصی، استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن آوری های نوین آمل، آمل، ایران.

۳- دکترای تخصصی، استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن آوری های نوین آمل، آمل، ایران.

۴- دکترای تخصصی، استادیار، گروه مهندسی، دانشکده فناوری های نوین مهندسی، دانشگاه تخصصی فن آوری های نوین آمل، آمل، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۴/۲۸)

### چکیده

اشرشیاکلی O157:H7 انتروهموراژیک از مهمترین و شایع ترین پاتوژن های غذایی در سراسر دنیاست که در حال کسب مقاومت در برابر برخی ترکیبات ضد میکروبی سنتزی رایج می باشد. هدف از این پژوهش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) نانوامولسیون اسانس ترخون (*Artemisia dracunculus*) برای سویه انتروهموراژیک اشرشیاکلی و سپس تاثیر غلظت های تحت MIC آن بر نرخ رشد و بیان ژن های حدت (*stx1* و *stx2*) بود. نانوامولسیون اسانس ترخون به روش فراصوت تهیه و اندازه قطرات و پتانسیل زتای آنتیجین شد. MIC و MBC اسانس و نانوامولسیون با استفاده از روش میکرودايلوشن براث تعیین شد. میزان رشد و بیان ژن های *stx1A* و *stx2A* در اشرشیاکلی پس از تیمار با غلظت های مختلف تحت MIC بررسی شد. استراگول به عنوان اصلی ترین ماده تشکیل دهنده اسانس شناسایی شد. قطر ذرات نانوامولسیون به طور متوسط ۵۰ نانومتر و پتانسیل زتا  $-30 \pm 0/20$  میلی ولت بود. مقادیر MIC اسانس و نانوامولسیون، به ترتیب،  $0/11 \pm 0/58$  و  $0/07 \pm 0/33$  میلی گرم در میلی لیتر و MBC معادل، به ترتیب،  $0/20 \pm 0/65$  و  $0/15 \pm 0/38$  میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. نانوامولسیون نسبت به اسانس خالص دارای اثر مهارکنندگی بیشتری در برابر رشد باکتری بود. در پایان دوره ۷۲ ساعته، تیمار با نانوامولسیون در غلظت ۷۵ درصد MIC منجر به کاهش نسخه برداری از *stx1A* و *stx2A* به ترتیب برابر  $3/75$  و  $4/10$  برابر گردید در حالی که در غلظت ۷۵ درصد MIC اسانس، میزان نسخه برداری از *stx1* و *stx2* در مقایسه با شاهد به ترتیب  $1/91$  و  $2/02$  برابر کاهش یافت. بیشتر بودن فعالیت مهارکنندگی نانوامولسیون اسانس ترخون در مقایسه با اسانس خالص در برابر رشد و تولید شیکاتوکسین اشرشیاکلی پتانسیل آن را برای کاربرد به عنوان نگهدارنده خوراکی طبیعی و نیز راه حلی جهت مشکل جهانی ظهور میکروب های مقاوم به آنتی بیوتیک نشان می دهد.

کلیدواژگان: اسانس، اشرشیاکلی انتروهموراژیک، ترخون، شیکاتوکسین، نانوامولسیون

\* مسئول مکاتبات: m.azizkhani@ausmt.ac.ir

## ۱- مقدمه

بیماری‌های انتقال یافته از مواد غذایی تحت عنوان عفونت یا مسمومیت‌هایی تعریف می‌شوند که از طریق مصرف مواد غذایی آلوده به میکروارگانیسم‌های بیماریزا یا توکسین آنها ایجاد می‌گردند [۱]. *اشرشیاکلی* باکتری گرم منفی و میله‌ای شکل می‌باشد که معمولاً به صورت منفرد و یا جفت یافت شده و توسط فلاژل پری‌تریش حرکت می‌کند، این باکتری بی‌هوازی اختیاری بوده و دمای بهینه رشد آن  $37^{\circ}\text{C}$  است. براساس فاکتورهای بیماریزایی و نیز نوع بیماری که *اشرشیاکلی* بوجود می‌آورد به ۵ زیر گروه مختلف تقسیم می‌شود که شامل *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک (EPEC)، *اشرشیاکلی* انتروآگرگیتو (EAEC)، *اشرشیاکلی* حمله کننده به روده (EIEC)، *اشرشیاکلی* مولد انتروتوکسین (ETEC) و *اشرشیاکلی* مولد خونریزی روده ای (EHEC) می‌باشد. هر کدام از گروه‌های فوق از طریق مواد غذایی مختلفی در ایجاد عفونت نقش دارند، همه گونه‌های EHEC شیگاتوکسین تولید می‌کنند که شبیه توکسین تولید شده توسط شیگلا دیساتری تیپ ۱ بوده و توانایی تخریب رده‌های سلولی ورو (Vero) در شرایط آزمایشگاهی را دارد. *اشرشیاکلی* O157:H7 از اعضای گروه *اشرشیاکلی* EHEC می‌باشد [۲]. *اشرشیاکلی* تولید کننده شیگاتوکسین از پاتوژن‌های انتقال یافته از آب و مواد غذایی و عامل طیف گسترده‌ای از بیماری‌های انسانی، از اسهال خفیف تا کولیت خونریزی دهنده، ترومبوسیتوپنی و سندرم اورمیک همولیتیک محسوب می‌گردد. سرو تیپ O157:H7 *اشرشیاکلی* منبع اصلی شیوع مسمومیت ناشی از مواد غذایی در سراسر جهان می‌باشد [۳].

استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های شیمیایی علاوه بر غیر ایمن بودن و ایجاد عوارضی مانند حساسیت‌زایی در افراد مصرف کننده، موجب ظهور پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک گردیده‌است [۱،۳]. بسیاری از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از لحاظ خوراکی خطر شناخته شده‌اند و واجد قابلیت کاربرد در مواد غذایی جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماریزا یا عامل فساد می‌باشند [۴]. ترکیبات موجود در اسانس‌ها و عصاره‌ها به

دلیل ویژگی چربی‌دوستی و نفوذ به داخل غشای دو لایه فسفولیپیدی میکروارگانیسم‌ها، موجب افزایش نفوذپذیری و از دست دادن تمامیت غشاء، آسیب به سیستم‌های آنزیمی و یا تخریب ماده ژنتیکی میکروارگانیسم دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشند [۴،۵]. گیاه ترخون با نام علمی *Artemisiadracunculus L.* از گذشته به عنوان ادویه و طعم دهنده مواد غذایی مورد استفاده بوده است. مهم‌ترین مناطق رویش این گیاه در ایران، سیستان و بلوچستان، آذربایجان، اصفهان، خوزستان، فارس، کرمان و خراسان است. عمده ترکیبات ترخون شامل استراگول، بتا و سیس اوسیمین می‌باشد و گزارش شده است که عصاره و اسانس آن دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضدباکتریایی در مقابل *سودوموناس آئروجینوزا*، *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک، *سالمونلا* تیفی *موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشند [۶،۷].

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تیمار مواد غذایی با ترکیبات ضد میکروبی طبیعی می‌تواند موجب کاهش تاثیر فاکتورهای مهاجمی باکتری‌ها مانند چسبندگی، آبگریزی سطح سلول، تشکیل بیوفیلم و افزایش حساسیت به استرس اکسیداتیو و نیز وضعیت حرکت میکروارگانیسم‌ها گردد [۷]. کاربرد اسانس‌های گیاهی در غلظت‌های بالا باعث تغییر در ویژگی‌های حسی از جمله عطر و طعم فرآورده می‌گردد که ممکن است کاربرد بسیاری از اسانس‌ها، حتی با عملکرد ضد میکروبی قوی، را محدود سازد. همچنین، علیرغم فعالیت ضد میکروبی قابل توجه اسانس‌های گیاهی مشکلاتی از قبیل فراریت زیاد ترکیبات تشکیل دهنده و حلالیت پایین در آب باعث محدودیت کاربرد آنها در مواد غذایی گردیده است. به منظور محافظت از ترکیبات زیست فعال آبگریز در برابر شرایط نامساعد محیطی و افزایش حلالیت و ثبات آنها در سیستم‌های غذایی از روش‌های مختلف ریزپوشانی از جمله میکروریزپوشانی، نانوریزپوشانی، تهیه میکروامولسیون و نانوامولسیون استفاده می‌شود. نانوامولسیون‌ها به دلیل اندازه کوچک قطرات، شفاف یا نیمه شفاف بوده و از مقاومت ترمودینامیکی بالایی در برابر ترسیب و تجمع برخوردارند [۸]. لذا، در این مطالعه جهت افزایش انحلال اسانس ترخون و فعالیت ضد میکروبی آن، نانوامولسیون اسانس تهیه و تاثیر آن بر نرخ رشد و میزان بیان ژن‌های مهاجمی مسوول تولید شیگاتوکسین در

1. Generally Recognized as Safe

## ۲-۴- تهیه نانوامولسیون

تهیه نانوامولسیون مطابق روش Shahavi و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد [۱۰]. نانوامولسیون روغن در آب‌اسانس ترخون در دمای محیط با استفاده از دستگاه فراصوت (۴۰۰ وات، ۲۴ کیلوهرتز، مدل UP400S، شرکت Hielscher، آلمان) از طریق مخلوط کردن ۱۰ درصد وزنی اسانس ترخون، ۸۵ درصد وزنی آب و ۵ درصد از مخلوط سورفاکتانت ها (Tween® 80 / Span® 80) تشکیل شد. نانوامولسیون اسانس ترخون، با زمان فراصوت‌دهی ۳۰۰ ثانیه، چرخه فراصوت ۰/۷۵ درصد و شدت فراصوت ۲۰۸ وات بر سانتی‌متر مربع توسط دستگاه فراصوت تهیه گردید.

## ۲-۵- اندازه‌گیری اندازه قطرات نانوامولسیون

روش تفرق دینامیکی نور (Dynamic light scattering) با استفاده از دستگاه نانو زتاسایزر (model Series Nano (ZEN 3600, Malvern, UK) با زاویه ثابت پراکنش ۱۷۳ درجه، اندیس رفرکتیو ۱۴۵ و اندیس دیسپرسیون ۱۳۳، ویسکوزیته ۰/۸۷۲ سانتی‌پوازو لیزر He-Ne (۴ نانوات) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد برای اندازه‌گیری قطر ذرات نانوامولسیون به کار رفت. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر محاسبه و کلیه نمونه‌ها در سه تکرار آزمون شدند. نرم افزار مورد استفاده برای جمع‌آوری و آنالیز داده‌ها Zetasizer Software (version 7.03) بود.

پتانسیل زتا با استفاده از سل موئین مدل DTS1070 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) دستگاه نانو زتاسایزر (model Series Nano ZS) (ZEN 3600, Malvern, UK) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تعیین شد. کلیه نمونه‌ها در آب فوق خالص پراکنده شده (۰/۰۱ درصد حجمی-حجمی) و هر نمونه ۱۰ بار در ۲۵ درجه سانتیگراد بررسی شد.

## ۲-۶- سویه باکتریایی

سلول‌های اشرشیاکلی (ATCC 35218) O157: H7 واجد پتانسیل تولید توکسین‌های Stx1A و Stx2A از گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی - دانشگاه تهران، تهیه شد.

باکتری اشرشیاکلی O157:H7 در محیط براث مورد بررسی قرار می‌گیرد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- تهیه و آماده‌سازی گیاه ترخون

گیاه ترخون، از مزارع اطراف شهر اصفهان جمع‌آوری شده و سپس برگ‌های آن از ساقه‌ها جدا گردید. نمونه‌ها برای رسیدن به وزن ثابت، در آون تحت خلاء در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خشک شدند. نمونه‌های خشک شده توسط آسیاب به پودر تبدیل و در نهایت به منظور جلوگیری از نفوذ رطوبت، در بسته‌های نایلونی بسته‌بندی و تا زمان شروع آزمایش در یخچال (با دمای ۴- درجه سانتیگراد) نگهداری شدند.

### ۲-۲- استخراج اسانس

استخراج اسانس ترخون با استفاده از دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب به مدت ۲ ساعت انجام شد.

### ۲-۳- تعیین ترکیبات اسانس

ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس به روش کروماتوگرافی و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به طیف‌نگار جرمی تعیین و اندازه‌گیری گردید. ابتدا نمونه آماده شده اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و مناسب‌ترین برنامه ریزی دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیبات اسانس بدست آورده شد. سپس اسانس به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌نگار جرمی نیز تزریق شده، طیف جرمی ترکیبات بدست آمد و با استفاده از شاخص بازداری، بررسی طیف‌های جرمی و مقایسه آن‌ها با طیف‌های مرجع، شناسایی هر یک از اجزای اسانس انجام شد [۹]. در این مطالعه دستگاه GC-MS از نوع Agilent 6890 با ستون موئینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS با برنامه دمایی ستون در ابتدا با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد با توقف ۲ دقیقه در این دما، سپس افزایش دما تا ۲۲۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۵ درجه سانتیگراد در هر دقیقه، و افزایش دمای ستون تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه استفاده شد.

## ۷-۲- تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد

## (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی

## (MBC) اسانس خالص و نانوامولسیون

مقدار MIC اسانس و نانوامولسیون به روش میکروداپلوشن در محیط برات تعیین گردید. محیط کشت تریپتیک سوی برات (TSB) با ۵ درصد حجمی-حجمی دی متیل سولفوکسید (DMSO) به عنوان ماده امولسیون کننده و غلظت‌های مختلف اسانس و نانوامولسیون مخلوط شد. سطح تلقیح باکتریایی در هر چاهک ۸ لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر بود. میکروپلیت‌های تلقیح شده در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. کمترین غلظتی از اسانس یا نانوامولسیون که در آن هیچ رشدی مشاهده نشد به عنوان MIC در نظر گرفته شد. جهت تعیین MBC، ۵۰ میکرولیتر از هر چاهک فاقد رشد باکتریایی در پلیت حاوی تریپتیک سوی آگار (TSA) کشت سطحی داده شد و در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید [۱۱].

## ۸-۲- تعیین تاثیر بازدارندگی اسانس و

## نانوامولسیون بر نرخ رشد اشرشیاکلی

اسانس و نانوامولسیون در غلظت‌های تحت بازدارنده (۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد) به محیط کشت TSB حاوی ۵ درصد حجمی-حجمی DMSO اضافه شدند، سپس لوله‌ها با حدود ۸ لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر باکتری تلقیح و در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نگهداری شدند. شمارش کلنی با تهیه رقت‌های متوالی از محیط‌های ذکر شده در بالا و کشت روی محیط TSA انجام شد [۱۱].

## ۹-۲- تعیین تاثیر بازدارندگی اسانس و

نانوامولسیون بر بیان ژن‌های *Stx2A* و *Stx1A*

## در اشرشیاکلی

باکتری اشرشیاکلی در محیط TSB حاوی مقادیر تحت MIC اسانس و نانوامولسیون در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد. RNA باکتری در هر تیمار با استفاده از CinnaPure RNA Purification Kit (شرکت سیناژن، تهران، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، در فواصل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، استخراج شد. سپس، cDNA با استفاده از RNA استخراج شده و کیت Sinacolon First Strand cDNA Synthesis (شرکت سیناکلون، تهران، ایران) مطابق دستورالعمل سازنده سنتز گردید. واکنش RT-Real time PCR با استفاده از کیت Power SYBR Green (Applied Biosystems) و با بکارگیری سیستم تشخیص توالی ABI PRISM 7500 انجام شد (Applied Biosystems، Courtaboeuf، فرانسه). جدول ۱ جفت‌های پرایمری مورد استفاده در واکنش را نشان می‌دهد [۱۲، ۱۳]. شرایط چرخه حرارتی به شرح زیر تنظیم شد: یک چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و یک چرخه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه. سطوح mRNA ژن‌های هدف (*stx2A* و *stx1A*) در مقابل سطح mRNA گلیسیرالدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن مرجع نرمالایز گردید و مقادیر نرمال شده به منظور محاسبه نسبت سطح بیان ژن‌ها در نمونه‌های تیمار شده با اسانس یا نانوامولسیون به سطح بیان در نمونه‌های کنترل (تیمار نشده) به کار رفت. جهت انجام محاسبات از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  مطابق بولتن کاربری شماره ۲، ۱۶ شرکت Applied Biosystems استفاده شد [۱۴]. از آنجا که سیستم سایبرگرین هر DNA دو رشته‌ای از جمله DNA بیگانه، پرایمر دایمرها، و محصولات PCR حاصل از اتصال اشتباه پرایمرها به یکدیگر را جستجو می‌کند، منحنی ذوب محصولات پس از پایان PCR تهیه شد.

**Table 1** Primers used in real-time PCR

Target gene	Size (base pair)	Sequence (5'-3')
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	299	Fw: TCCGTGCTGCTCAGAAACG Rev: CACTTTCTTCGCACCAGCG
Shiga toxin 1 Subunit A ( <i>stx1A</i> )	296	Fw: CCATTCTGGCAACTCGCG Rev: GCAAGAGCGATGTTACGGT
Shiga toxin 2 Subunit A ( <i>stx2A</i> )	184	Fw: TGCTGTGGATATACGAGGGC Rev: TCCGTTGTCATGGAAACCG

### ۲-۱۰- آنالیز آماری نتایج حاصله

تمام آزمون‌ها (اندازه گیری قطر ذرات، تعیین MIC و MBC، نرخ رشد و PCR) در سه تکرار انجام شد و داده‌ها با به کار گیری نرم افزار SPSS 22.0 با استفاده از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند. اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد تعیین گردید.

### ۳- یافته‌ها

#### ۳-۱- ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ترخون

در بین ترکیبات موجود در اسانس ترخون استراگول (۵۱/۵۱ درصد)، پارا-سیمن (۱۳/۷۸ درصد)، گاما ترپینن (۹/۰۳ درصد)، آلفا پینن (۷/۴۲ درصد) و  $\alpha$ -سینئول (۳/۳۵ درصد) بیشترین درصد ترکیبات را تشکیل می‌دادند. ۱۸ ترکیب شناسایی شده (جدول ۲) در مجموع ۹۷/۴۴ درصد کل ترکیبات تشکیل دهنده اسانس را شامل شدند.

**Table 2** Chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil identified by GC/MS

Compounds	Retention Time (min)	Amount (%)
Alpha-thujene	4.38	0.65
Alpha-pinene	4.52	7.42
Camphene	4.78	0.95
Beta-myrcene	5.44	0.75
Alpha-terpinene	5.92	1.87
Para-cymene	6.08	13.78
Beta- phellandrene	6.15	1.05
1,8-cineole	6.19	3.35
Gamma-terpinene	6.67	9.03
Camphor	8.14	0.58
Cyclohexane	8.72	1.58
Isobornyl propionate	9.11	0.93
Carvacrol	11.06	1.41
Estragole	11.16	51.1
Trans-caryophyllene	13.60	1.93
Germacrene D	14.88	0.29
Delta-cadinene	15.79	0.38
Cis-alpha-bisabolene	16.17	39
Total		97.44

### ۳-۲- اندازه قطرات نانوامولسیون و پتانسیل زتا

در این مطالعه، متوسط اندازه (قطر) قطرات نانوامولسیون اسانس ترخون معادل ۵۰ نانومتر و پتانسیل زتا برابر با ۳۰- میلی‌ولت بود.

و نانوامولسیون کمتر از شاهد (تیمار نشده) بود ( $p < 0/05$ ). پس از نگهداری باکتری به مدت ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت در دمای گرمخانه گذاری، غلظت ۷۵ درصد MIC اسانس ترخون (شکل ۱a) موجب کاهش جمعیت نهایی باکتری به میزان ۱/۴۰، ۳/۰۶ و ۴/۴۳ لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر در مقایسه با تیمار شاهد شده است ( $p < 0/05$ ). در حالی که غلظت ۷۵ درصد MIC نانوامولسیون (شکل ۱b)، تعداد سلولهای اثرشیاکلی را به میزان ۲/۵۴، ۳/۵۶ و ۵/۹۰ لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر در مقایسه با کنترل طی مدت زمان مشابه کاهش داد ( $p < 0/05$ ). کاهش سرعت رشد در مقایسه با شاهد برای اسانس و نانوامولسیون از نظر آماری معنی دار بود ( $p < 0/05$ ) و نانوامولسیون اثر مہار بیشتری در برابر رشد اثرشیاکلی در مقایسه با اسانس خالص نشان داد ( $p < 0/05$ ).

### ۳-۳- نتایج تعیین MIC و MBC برای اسانس

#### و نانوامولسیون

نتایج تعیین MIC اسانس خالص و نانوامولسیون اسانس ترخون برای اثرشیاکلی، به ترتیب، برابر  $0/58 \pm 0/11$  و  $0/33 \pm 0/07$  میلی گرم در میلی لیتر و MBC (حداقل غلظت باکتری کشی) معادل، به ترتیب،  $0/65 \pm 0/20$  و  $0/38 \pm 0/15$  میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. میزان MIC و MBC نانوامولسیون به طور تقریبی ۱/۵ برابر کمتر از اسانس بود ( $p < 0/05$ ).

### ۳-۴- تاثیر اسانس و نانوامولسیون بر نرخ رشد

نتایج مربوط به بررسی تاثیر اسانس و نانوامولسیون بر میزان رشد باکتری اثرشیاکلی طی دوره نگهداری ۷۲ ساعته در ۳۵-۳۷ درجه سانتیگراد در شکل ۱ آورده شده است. در کل دوره گرمخانه گذاری جمعیت سلولی نمونه های تیمار شده با اسانس

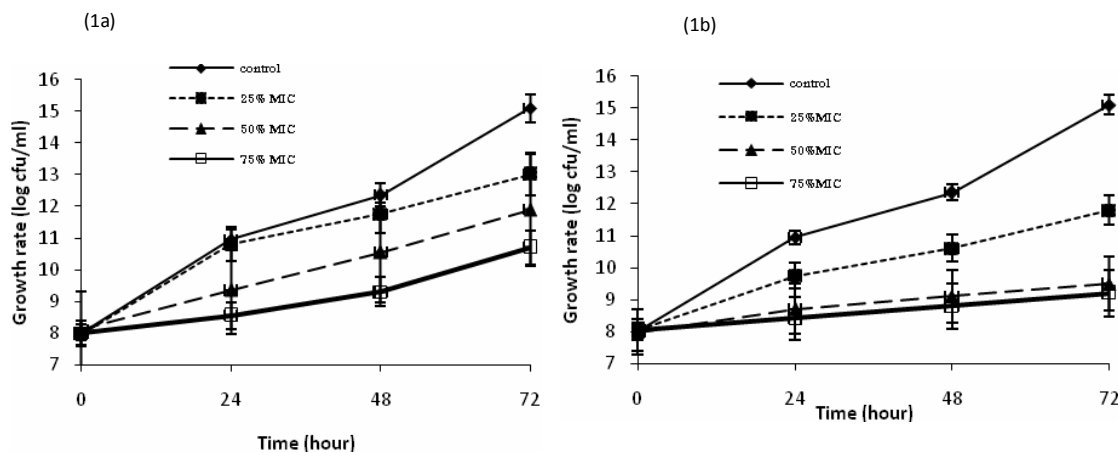


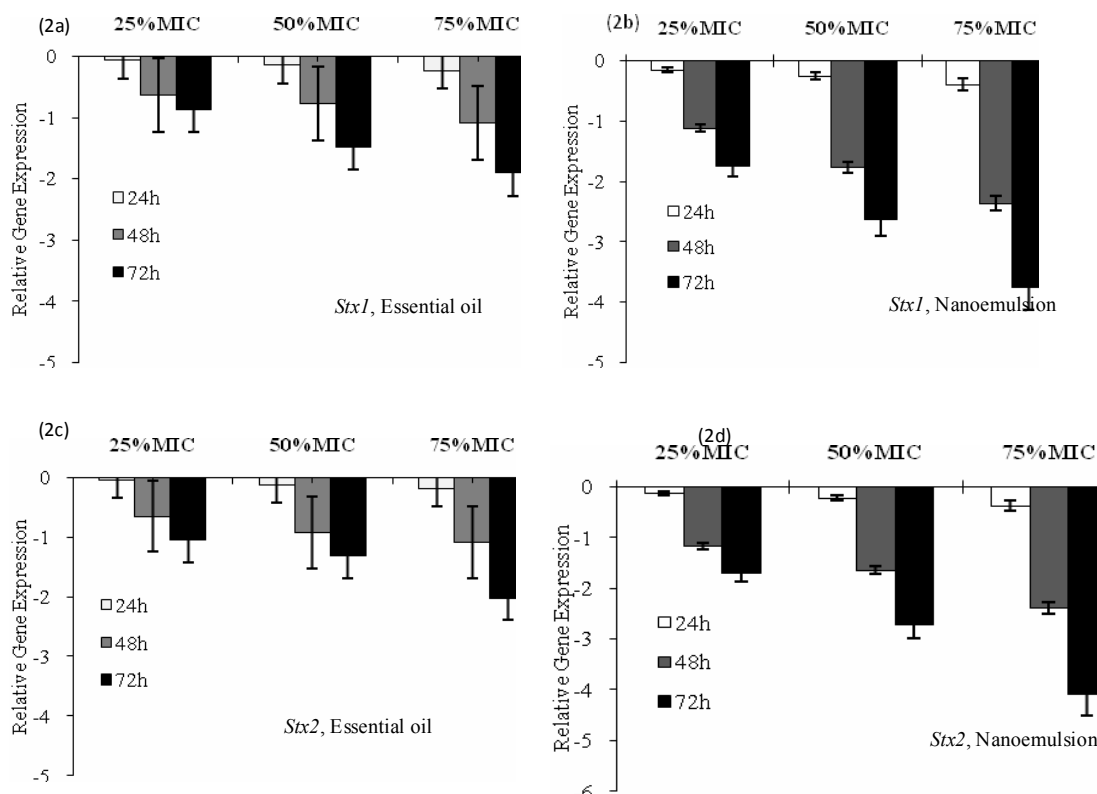
Fig 1 Inhibitory effect of tarragon essential oil (1a) and nanoemulsion (1b) on *E. coli* O157:H7 growth at 35 °C.

با ۷۵ درصد MIC اسانس سطح رونویسی *stx1A* و *stx2A* به ترتیب،  $0/24$  و  $0/19$  برابر پس از ۲۴ ساعت و  $1/91$  و  $2/02$  برابر بعد از ۷۲ ساعت در مقایسه با شاهد (باکتری تیمار نشده) کاهش یافت ( $p < 0/05$ ). مواجهه باکتری با ۷۵ درصد MIC نانوامولسیون منجر به کاهش میزان نسخه برداری از *stx1A* و *stx2A* به ترتیب  $0/40$  و  $0/38$  برابر بعد از ۲۴ ساعت و  $3/75$  و  $4/10$  برابر بعد از ۷۲ ساعت در مقایسه با شاهد شد ( $p < 0/05$ ).

### ۳-۵- تاثیر اسانس و نانوامولسیون بر میزان بیان

#### ژنهای شیگاتوکسین

داده های حاصل از بررسی منحنی ذوب نشان داد که هیچگونه پرایمر دایمر یا DNA آلوده کننده در واکنش ها وجود نداشته است. دمای ذوب *stx1A* و *stx2A* به ترتیب  $81/2$ ،  $83/5$  و  $79/5$  درجه سانتیگراد به دست آمد. مطابق نتایج با افزایش غلظت اسانس و نانوامولسیون رونویسی ژنهای *stx1A* و *stx2A* در اثرشیاکلی کاهش یافت (شکل ۲). طی تیمار باکتری



**Fig 2** Effect of tarragon essential oil and nanoemulsion on relative expression of genes *stx1A* and *stx2A* in *E. coli* O157:H7. The housekeeping gene *GAPDH* was used to normalize the expression level of *stx1A* and *stx2A*

#### ۴- بحث

(۲۰۱۹)، استراگول بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانسترخونرا با مقدار ۸۱/۸۹٪ شامل می‌شد [۱۸]. همچنین، نتایج حاضر مشابه داده‌های گزارش شده توسط Norouzi و همکاران (۲۰۱۸) و Fraternalه و همکاران (۲۰۱۵) می‌باشد که اجزای اصلی فرار به دست آمده از قسمت‌های هوایی اسانس ترخون عبارت بودند از استراگول، لیمونن، بتا-اوسمین و بتا-پینن [۱۹،۶]. Karimi و همکاران (۲۰۱۵) نیز ترکیبات استراگول، ترپینولن، لیمونن، بتا-اوسمین، آلفا-پینن و اوژنول متیل را به عنوان اصلی ترین ترکیبات اسانس این گونه ترخون شناسایی نمودند [۲۰]. Sharafati Chelshtori و همکاران (۲۰۱۳) ۱۹ ترکیب را در اسانس ترخون شناسایی و ترکیبات اصلی آن را استراگول، ترانس اوسمین، بتا اوسمین و لیمونن گزارش نمودند که مشابه نتایج تحقیق حاضر، ترکیب اصلی شامل استراگول بوده است [۱۷]. ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌های یک گونه گیاهی مشخص بر

گزارش‌های متعددی مبنی بر پتانسیل اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی و ترکیبات آنها در مهار رشد و فعالیت میکروبیو کاربرد به عنوان نگهدارنده مواد غذایی منتشر شده‌اند [۱۶،۱۵،۶]. همچنین، مطالعاتی در رابطه با ویژگی‌های ضد باکتریایی گیاه ترخون انجام و اظهار شده که فعالیت قابل ملاحظه آن در مهار باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد مواد غذایی مربوط به طیف گسترده ترکیبات تشکیل دهنده آن مانند استراگول، ترپینولن، لیمونن، بتا-اوسمین، آلفا-پینن، بتا-پینن، اوژنول و اوژنول می‌باشد [۱۷،۵،۴]. در مطالعه حاضر، نتایج آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ترخون نشان داد که استراگول، پارا-سیمین، گاما-ترپینن، آلفا-پینن و اوژنول بیشترین درصد ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهند. همانطور که مشاهده می‌شود، اجزای اصلی اسانس ترخون در این مطالعه از ترپین‌ها و ترپنوئیدها و سایر عناصر تشکیل دهنده معطر و آلیفاتیک تشکیل شده است. در مطالعه Azizkhani و Feizi

در این تحقیق، MIC و MBC اسانس بالاتر از نانوامولسیون بود و چنانچه در مطالعه Donsi و همکاران (۲۰۱۶) ذکر شده طی ریزپوشانی برخی از اسانس‌ها به منظور بهبود فعالیت ضد میکروبی آنها، مقادیر MIC ترکیبات ضد میکروبی ریزپوشانی شده به عنوان نانوامولسیون پایین‌تر یا مساوی با ترکیبات خالص به دست آمد، این نتایج نشان دهنده تسهیل انتقال اسانس از طریق دیواره سلولی پاتوژن‌های هدف به درون سلول می‌باشد [۲۷].

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که اسانس و نانوامولسیون سرعت رشد و همچنین تولید شینگاتوکسینرا در *اشرشیاکلی* طی روندی وابسته به دوز کاهش داده‌اند و نانوامولسیون به میزان قابل ملاحظه‌ای اثر مهارتی داشته است. در مطالعات مختلف میکرومولسیون‌ها و نانوامولسیون‌های تهیه شده از اسانس‌های گیاهی مانند دارچین و آویشن باغی [۲۸]، میخک [۲۹،۲۳]، اوکالیپتوس [۳۰] و ریحان [۳۱] فعالیت مهارکنندگی قوی‌تری در برابر رشد باکتری‌های بیماری‌زای رودهای (*اشرشیاکلی*)، گونه‌های *سالمونلا* و *شیگلا دیسانتری*) و سایر پاتوژن‌ها در مقایسه با اسانس خالص نشان داده‌اند. با توجه به نتایج این محققان، تبدیل اسانس به نانوامولسیون موجب تسهیل دسترسی اسانس به سلول‌های باکتریایی و افزایش توانایی آن در ایجاد اختلال در یکپارچگی دیواره سلولی می‌گردد.

مطابق داده‌های این مطالعه، غلظت‌های تحت بازدارنده نانوامولسیون اسانس ترخون به طور قابل ملاحظه‌ای بیان ژن‌های *stx1A* و *stx2A* را کاهش داده و حتی سطوح پایین غلظت‌های تحت بازدارنده آن اثر مهارتی بیشتری نسبت به سطوح بالای غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس خالص داشته است. مطالعات بسیار اندکی در خصوص تاثیر نانوامولسیون‌ها بر بیان ژن‌های ویروانس و بیماری‌زایی باکتری‌های پاتوژن منتشر شده است. در این رابطه، یافته‌های مشابهی توسط Prateeksha و همکاران (۲۰۱۹) مبنی بر کاهش رونویسی ژن‌های مربوط به توکسین شبه شینگاتوکسین، بیماری‌زایی و اتصال و تشکیل بیوفیلم در *اشرشیاکلی* توسط نانوامولسیون اسانس *Gaultheriafragrantsissima* Wall منتشر شده است [۳۲]. ترکیب اصلی اسانس ترخون در مطالعه حاضر استراگول است که

اساس شرایط آب و هوایی منطقه کشت، جنس خاک و زمان برداشت متفاوت است.

خصوصیات فیزیکوشیمیایی یک نانوامولسیون مانند اندازه ذرات، شکل و همچنین بار سطحی ذره عوامل تعیین کننده‌ای در میزان و سرعت رهایش ماده موثره و میزان جذب نانوذرات توسط سلول به شمار می‌روند. جذب نانوذرات توسط سلول‌های میکروبی فرآیندی دو مرحله‌ای است که شامل مرحله اتصال به غشای سلولی و سپس ورود به داخل سلول می‌باشد [۲۱]. بار سطحی ذرات امولسیون تأثیر قابل توجهی در اتصال نانوذرات به غشای سلولی دارد [۲۲]. در مطالعه حاضر، اندازه متوسط قطرات نانوامولسیون اسانس ترخون معادل ۵۰ نانومتر به دست آمد که مشابه نتایج به دست آمده توسط Shahavi و همکاران (۲۰۱۵) می‌باشد، در مطالعه ایشان قطر ذرات نانوامولسیون اسانس میخک معادل ۵۰ نانومتر و با قدرت نفوذ سلولی قابل ملاحظه به دست آمد [۲۳]. پتانسیل زتای نانوامولسیون ترخون در این پژوهش معادل -۳۰ میلی‌ولت بود. پتانسیل زتا معیاری از بزرگی بار الکتریکی یا دافعه و جاذبه الکترواستاتیک بین ذرات است که عامل اصلی پدیده‌هایی مانند پراکندگی، لخته شدن یا انعقاد و تجمع می‌باشد، از این رو یکی از پارامترهای اصلی برای ارزیابی پایداری دیسپرسیون‌ها، امولسیون‌ها و سوسپانسیون‌هاست [۲۴]. در یک محیط مایع، پتانسیل زتا نشان دهنده تفاوت بین پتانسیل فاز پراکنده و فاز ثابتی است که در تماس با فاز پراکنده می‌باشد [۲۵]. نتایج یک مطالعه توسط Patil و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که هرچه پتانسیل زتای منفی نانوذرات یک امولسیون بالاتر (منفی‌تر) باشد، جذب سلولی نانو ذرات در مقایسه با سایر نانوذرات با بار منفی کمتر یا بار مثبت بیشتر خواهد بود [۲۲]. به نظر می‌رسد که پتانسیل زتای ذرات نانوامولسیون اسانس ترخون در این پژوهش (۳۰- میلی‌ولت) منجر به نفوذ مقدار قابل ملاحظه اسانس به داخل سلول‌های میکروبی و اعمال اثرات ضد میکروبی گردیده است. همچنین، Kumar و همکاران (۲۰۱۷) اظهار داشتند که پتانسیل زتای بالاتر از ۳۰- یا ۳۰+ میلی‌ولت موجب افزایش پایداری امولسیون و نیز موندیسپرسیته ذرات فاز پراکنده در فاز ثابت می‌گردد، به عبارت دیگر بزرگی پتانسیل زتا نشانگر پایداری فیزیکی سیستم کلوتیدی می‌باشد [۲۶].



تحقیقات بیشتر در خصوص بررسی تاثیر اجزای اصلی اسانس و مکانیسم آن در کاهش رونویسی ژن‌های حدت می‌باشد.

## ۶- سپاسگزاری

این مقاله حاصل پروژه تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی (شماره ۸/۸۹۵/پ) دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل بوده است.

## ۷- منابع

- [1] Brusa, V., Lirón J.P., Aliverti, F., Aliverti, V., Brocardo, S., Leotta, G.A. 2011. Desarrollo y evaluación de dos PCR-RT para la detección de genes stx en carne picada, in: First International Congress of Zoonoses and Emerging Diseases and VII Zoonoses Argentine Congress, Abstract book (Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis).
- [2] Simjee, S. 2007. Foodborne diseases. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA.
- [3] Karmali, M. A., Gannon, V., Sargeant, J. M. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140, 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011>
- [4] Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- [5] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- [6] Norouzi, F., Hojjati, M., Jooyandeh, H., Barzgar, H. 2018. Study of the possibility of application of tarragon essential oil in mayonnaise as a natural additive. *Journal of Food Research*, 28(3), 85–99.
- [7] Mousavi Nadoshan, S., Owlia, P., Moein Najafabadi, L., Rasooli, I., Saderi, H., Salari, M. 2010. Effects of Sub-inhibitory Concentrations of Essential Oils of *Mentha spicata* and *Cuminum cyminum* on Virulence

یک متابولیت ثانویه گیاهی با ساختار فنیل پروپن، شامل یک حلقه بنزنی دارای یک گروه متوکسیل و یک گروه آلیل، است لذا ترکیبی هیدروفوب و ایزومر آنتول می‌باشد. این ویژگی ساختاری موجب کاهش فعالیت مهای استراگول بر باکتری‌های گرم منفی‌گردد زیرا غشای خارجی غنی از لیپیدی ساکارید آنها موجب ایجاد وضعیت آبدوستی در سطح غشاء و ممانعت از نفوذ ترکیبات آبگریزی مانند استراگول می‌شود [۳۳]. قرار گرفتن ترکیبات آبگریز مانند استراگول در ساختار نانومولسیون موجب تسهیل نفوذ آنها به غشاهای آبدوست می‌گردد. در مطالعه Auezova و همکاران (۲۰۲۰) فعالیت ضدباکتریایی آنتول، استراگول، اوژنول و ایزواوژنول در حالت خالص و ریزپوشانی شده بر علیه *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ایشان نشان داد که آنتول و استراگول فعالیت ضد میکربی بالاتری داشته و *اشرشیاکلی* حساسیت بیشتری نسبت به *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* در برابر این ترکیبات نشان داد [۳۴]. به طور کلی، از یافته‌های این پژوهش و نتایج سایر محققان استنباط می‌شود که تبدیل اسانس به نانومولسیون به علت کاهش اندازه ذرات و نیز افزایش حلالیت ترکیبات موجب نفوذ بیشتر اسانس به دیواره سلولی و سلول باکتری و در نتیجه بهبود فعالیت ضد میکربی می‌گردد.

## ۵- نتیجه گیری

چنانکه در نتایج مشاهده شد نانومولسیون اسانس ترخون فعالیت مهارکنندگی بیشتری در برابر رشد و نیز میزان رونویسی ژن‌های عامل تولید شینگاتوکسین در *اشرشیاکلی* O157:H7 در مقایسه با اسانس ترخون داشته است. به نظر می‌رسد پتانسیل قابل ملاحظه نانومولسیون در کاهش فعالیت باکتری به علت توانایی قطرات نانومولسیون در نفوذ مؤثر به سلول باکتری، واکنش با اجزای سلولی و ایجاد اختلال در مکانیسم‌های درون سلولی کاهش بیان ژن‌های تنظیم کننده حدت است. در این زمینه، نیاز به

- [16] Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control, 18, 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>
- [17] Sharafati Chaleshtori, R., Rokni, N., Razavilar, V., Kopaei, M.R. 2013. The evaluation of the antibacterial and antioxidant activity of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) essential oil and its chemical composition. Jundishapur Journal of Microbiology, 6(9), 7877.
- [18] Feizi, P., Azizkhani, M. 2019. Increasing oxidative stability of precooked trout fillet using herbal essential oils. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, <https://doi.org/10.15547/bjvm.2212>.
- [19] Fraternali, D., Flamini, G., Ricci, D. 2015. Essential oil composition and antigermination activity of *Artemisia dracunculus* (Tarragon). Natural product communications, 10(8), 1469-1472.
- [20] Karimi, A., Hadian, J., Farzaneh, M., Khadivi-Khub, A. 2015. Phenotypic diversity and volatile composition of Iranian *Artemisia dracunculus*. Industrial Crops and Products, 65, 315-323. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.003>
- [21] Ciani, L., Ristori, S., Bonechi, C., Rossi, C., Martini, G. 2007. Effect of the preparation procedure on the structural properties of oligonucleotide/cationic liposome complexes (lipoplexes) studied by electron spin resonance and Zeta potential. Biophysical chemistry, 131(1-3), 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.09.011>
- [22] Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W., Seal, S. 2007. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. Biomaterials, 28(31), 4600-4607. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.029>
- [23] Shahavi, M.H., Hosseini, M., Jahanshahi, M., Meyer, R.L., Darzi, G.N. 2015. Evaluation of critical parameters for preparation of stable clove oil nanoemulsion. Arabian Journal of Chemistry, 12(8): 3225-3230. <https://doi.org/10.1016/j.arabjch.2015.08.024>
- Factors of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Medicinal Plants, 9(6), 124-130.
- [8] Gutiérrez, J., González, C., Maestro, A., Sole, I., Pey, C., Nolla, J. 2008. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 13, 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.02.063>
- [9] Adams, M.R. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
- [10] Shahavi, M.H., Hosseini, M., Jahanshahi, M., Meyer, R.L., Darzi, G.N. 2016. Clove oil nanoemulsion as an effective antibacterial agent: Taguchi optimization method. Desalination and Water Treatment, 57(39), 18379-18390. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1092893>
- [11] Azizkhani, M., Misaghi, A., Basti, A.A., Gandomi, H., Hosseini, H. 2013. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. International journal of food microbiology, 163(2-3), 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.020>
- [12] Mahmoudzadeh, M., Hosseini, H., Nasrollahzadeh, J., et al. 2016. Antibacterial activity of *Carum copticum* essential oil against *Escherichia coli* O157: H7 in meat: Stx genes expression. Current Microbiology, 73(2), 265-272. <http://doi.org/10.1007/s00284-016-1048-2>
- [13] Carey, C.M., Kostrzynska, M., Thompson, S. 2009. *Escherichia coli* O157: H7 stress and virulence gene expression on Romaine lettuce using comparative real-time PCR. Journal of Microbiological Methods, 77(2), 235-242. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.02.010>
- [14] Applied Biosystems, User bulletin no. 2. 1997. Relative quantification of gene expression.
- [15] Ameeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., Fawzi Mahomoodally, M. 2016. Chemical composition, antimicrobial and antibiotic potentiating activity of essential oils from 10 tropical medicinal plants from Mauritius. Journal of Herbal Medicine, 6(2), 88-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2016.02.002>

- nanoparticles in alcohol-free microemulsion. *Journal of Oleo Science*, 61, 641–648. <https://doi:10.5650/jos.61.641>
- [30] Sugumar, S., Ghosh, V., Nirmala, M.J., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. 2014. Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. *Ultrason Sonochem*, 21, 1044–1049. <https://doi:10.1016/j.ultsonch.2013.10.021>.
- [31] Ghosh, V., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. 2013. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrason Sonochem*, 20, 338–344. <https://doi:10.1016/j.ultsonch.2012.08.010>
- [32] Prateeksha, Barik SK, Singh BN. 2019. Nanoemulsion-loaded hydrogel coatings for inhibition of bacterial virulence and biofilm formation on solid surfaces. *Scientific Reports*, 9(1), 6520. <https://doi:10.1038/s41598-019-43016-w>
- [33] Dorman, H.J.D., Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316. <https://doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- [34] Auezova, L., Najjar, A., Kfoury, M., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H. 2020. Antibacterial activity of free or encapsulated selected phenylpropanoids against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *Applied Microbiology*, 128(3), 710-720. <https://doi:10.1111/jam.14516>.
- [24] Dickinson, E.2009. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6),1473-1482. <https://doi:10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>
- [25] Kutscher, H.L., Chao, P., Deshmukh, M., Sundara Rajan, S., Singh, Y., Hu, P., Joseph, L.B., Stein, S., Laskin, D.L., Sinko, P.J. 2010. Enhanced passive pulmonary targeting and retention of PEGylated rigid microparticles in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 402(1-2), 64-71. <https://doi:10.1016/j.ijpharm.2010.09.020>
- [26] Kumar, R., Kaur, K., Uppal, S., Mehta, S.K.2017. Ultrasound processed nanoemulsion: A comparative approach between resveratrol and resveratrol cyclodextrin inclusion complex to study its binding interactions, antioxidant activity and UV light stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 478-489. <https://doi:10.1016/j.ultsonch.2017.02.004>
- [27] Donsì, F., Ferrari, G.2016. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233,106-120. <https://doi:10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>
- [28] Ma, Q., Davidson, P.M., Zhong, Q. (2016). Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80. *International Journal of Food Microbiology*, 226, 20–25. <https://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.011>
- [29] Hamed, S.F., Sadek, Z., Edris, A. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of clove bud essential oil and eugenol

## Evaluating the effect of Nanoemulsion of *Artemisia dracunculus* Essential Oil on Expression of virulence genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Azizkhani, M. <sup>1\*</sup>, Tooryan, F. <sup>1</sup>, Shohreh, P. <sup>2</sup>, Partovi, R. <sup>1</sup>, Shahavi, M. <sup>3</sup>

1. Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
2. Ph.D, Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
3. Ph.D, Assistant Professor, Faculty of Engineering Modern Technologies, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

(Received: 2020/04/29 Accepted: 2020/07/18)

*Escherichia coli* O157: H7 is one of the most important and common foodborne pathogens in the world which is being resistant against some current synthetic antimicrobials. The aim of this study was to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bacterial concentration (MBC) of *Artemisia dracunculus* (tarragon) essential oil and its nanoemulsion for enterohemorrhagic strain of *Escherichia coli* and then the effect of sub-MIC concentrations on growth rate and gene expression of virulence genes (*stx1A* and *stx2A*). Nanoemulsion of tarragon essential oil was prepared by the ultrasound method and the droplet size and zeta potential were determined. MIC and MBC of essential oil and nanoemulsion were determined using the broth microdilution method. The growth rate and expression of *stx1A* and *stx2A* genes in *Escherichia coli* were assessed after treatment with different concentrations of sub-MICs of essential oil and nanoemulsion. Estragol was identified as the main component in the essential oil. The average diameter of nanoemulsion particle was 50 nm and the zeta potential was -30 mV. The MIC values of essential oil and nanoemulsion were  $0.58 \pm 0.11$  and  $0.33 \pm 0.07$  mg/ml, respectively, and their MBC were  $0.65 \pm 0.20$  and  $0.38 \pm 0.15$  mg/ml, respectively. Nanoemulsion had a greater inhibitory effect against bacterial growth than free essential oil. At the end of the 72-hour period, nanoemulsion treatment at 75% MIC resulted in a reduction in *stx1A* and *stx2A* transcription of 3.75 and 4.10 folds, respectively, while at 75% MIC of essential oil *stx1A* and *stx2A* transcripts were reduced 1.91 and 2.02 folds compared with control, respectively. Higher activity of nanoemulsion of tarragon essential oil to reduce the growth and shigatoxin production of *E. coli* compared to pure EO, reveals its potential to be used as a natural food preservative and a solution to the global problem of emergence of antibiotic-resistant microbes.

**Keywords:** Enterohemorrhagic *E. coli*, Essential oil, Nanoemulsion, Shigatoxin, Tarragon

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: m.azizkhani@ausmt.ac.ir