



ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی علیه باسیلوس

سرئوس (ATCC 11778) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 9027)

پروین سوری^۱، آریو امامی‌فر^{۲*}، نفیسه دعوتی^۳

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد فناوری مواد غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۳- استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

چکیده

اطلاعات مقاله

در این پژوهش منحنی زمان - کشندگی اثر نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی علیه باسیلوس سرئوس (ATCC 11778) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 9027) در محیط کشت آزمایشگاهی بررسی شد. دو روش آب پوشانی لایه نازک و حرارتی در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی در نسبت‌های مختلف لسیتین به نانو ذرات اکسیدروی (۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی- وزنی) مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسید روی در مقایسه با نانوذرات اکسید روی بدون پوشش علیه سویه‌های باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژینوزا تعیین گردید. نتایج نشان داد که استفاده از نانوذرات اکسید روی درون پوشانی شده در سامانه‌های نانولیپوزومی به صورت معنی‌داری قدرت ضد میکروبی آن‌ها را افزایش داد ($p < 0.05$). نانولیپوزوم حاوی نانوذرات اکسید- روی تولید شده به روش آب پوشانی لایه نازک در مقایسه با روش حرارتی در بیشترین نسبت لسیتین به نانو ذرات اکسیدروی (۲۵:۱ وزنی- وزنی)، قدرت ضد میکروبی بالاتری داشتند. بر اساس منحنی های زمان- کشندگی، در حضور نانولیپوزوم‌های حاوی نانو ذرات اکسیدروی تولید شده به روش آب پوشانی لایه نازک با نسبت لسیتین به نانوذرات اکسید (۲۵:۱ وزنی- وزنی)، طول فاز لگاریتمی باکتری‌های باسیلوس سرئوس (۸ ساعت) و سودوموناس آئروژینوزا (۶ ساعت) به ترتیب در مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی به ۳ و ۳ ساعت و حداقل غلظت کشندگی به ۱ و کمتر از یک ساعت کاهش یافت.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۱۹

کلمات کلیدی:

فعالیت ضد میکروبی،
نانولیپوزوم،
نانو اکسیدروی.

DOI: 10.22034/FSCT.20.146.106

* مسئول مکاتبات:

a.emamifar@basu.ac.ir

۱-مقدمه

باسیلوس سرئوس (*Bacillus Ceruse*)، یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای، هوازی و اسپوزا و از مهم‌ترین میکروب‌های مسمومیت‌زا در مواد غذایی نظیر لبنیات، گوشت و غلات به ویژه برنج است [۱ و ۲]. گسترش فراوان این باکتری در محیط و راحتی ورود به چرخه مواد غذایی خام و از طرف دیگر مقاومت بالای اسپورهای این باکتری، زنده‌مانی آن را در برابر فرایندهای غذایی نظیر استریل، پاستوریزه و خشک‌کردن افزایش داده که سبب افزایش احتمال آلودگی مواد غذایی به این میکروب می‌گردد [۱]. *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*)، نیز یک باکتری گرم منفی، هوازی اختیاری، میله‌ای شکل و متحرک و از جمله عوامل فساد و آلوده کننده مواد غذایی نظیر لبنیات، گوشت، تخم مرغ و آب است. این باکتری‌ها توانایی رشد در دمای یخچال را داشته و با تولید آنزیم‌هایی نظیر لپاز و پروتئاز مقاوم به حرارت، مسبب ایجاد تلخی، ترشیدگی و تجزیه پروتئین‌های مواد غذایی هستند [۳ و ۴]. امروزه بروز مقاومت چندگانه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و یا مولد فساد مواد غذایی به انواع ترکیبات ضد میکروبی به یک موضوع مهم تهدید کننده سلامت غذایی و عمومی تبدیل شده است. لذا توسعه و معرفی ترکیبات ضد میکروبی جدید به عنوان پاسخ این چالش همواره مطرح است [۵]. نانوذرات به ویژه نانوذرات فلزی در مقایسه با بسیاری از ترکیبات ضد میکروب، مقاومت و پایداری خوبی در شرایط استریل و یا خشک کردن مواد غذایی دارند. همچنین تاکنون مقاومت میکروبی به نانوذرات فلزی ضد میکروب گزارش نشده است [۶]. در این میان نانوذرات اکسیدروی که در گروه ترکیبات ایمن برای مصرف کننده نیز قرار دارد، با دارا بودن مزایای فراوانی نظیر فرآیند آسان تولید، ارزان بودن، هدایت گرمایی بالا و فعالیت ضد میکروبی مناسب، مورد توجه بسیاری از صنایع از جمله صنایع غذایی قرار گرفته‌اند [۷ و ۸]. قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدروی علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از قبیل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *ساکارومایسز سرویزیه*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *کاندیدا آلبیکنس* و

آسپرژیلوس نایجر به اثبات رسیده است [۹]. استفاده از سامانه‌های نانولیپوزومی پاسخ مناسبی برای رفع بسیاری از مشکلات غنی سازی مواد غذایی و یا افزودن ترکیبات موثر در بهبود کیفیت مواد غذایی از جمله ترکیبات ضد میکروبی است. ورود ترکیبات خاص درون نانوحامل‌ها، تاثیرگذاری، توزیع پذیری و پایداری آن‌ها را در محیط غذا افزایش داده، رهایش آن‌ها در بافت مورد نظر کنترل نموده و دسترسی زیستی این مواد را بهبود می بخشد [۱۰]. لیپوزوم‌ها یا وزیکول‌های لیپیدی از خود تجمعی مولکول‌های فسفولیپید در محیط آبی تشکیل می‌شوند. این مولکول‌ها با انحلال در یک محیط آبی بطور خودبخود غشاهای دو لایه‌ای را تشکیل می‌دهند که توانایی در برگیری فاز آبی را درون حفره داخلی خود دارند [۱۱]. نانولیپوزوم‌ها در مقایسه با لیپوزوم‌ها سطح بیشتری دارند که در افزایش حلالیت و شفافیت، دسترسی زیستی مطلوبتر، بهبود شرایط آزادسازی کنترل شده و پایداری بیشتر آن‌ها موثر است [۱۲]. بنابر این درون پوشانی نانوذرات اکسیدروی در ساختارهای نانولیپوزومی با هدف توزیع مناسب و پایدار نانو اکسیدروی در فرمولاسیون‌های غذایی از جمله راه‌کارهای مرتفع سازی چالش‌های اشاره شده است [۱۳]. مطالعه منحنی زمان-کشندگی ترکیبات ضد میکروب علیه انواع میکروارگانیسم‌ها بیشتر به بررسی سنجش قدرت ضد میکروبی آن‌ها در ارتباط با غلظت‌های مختلف ماده ضد میکروبی و طول زمان قرارگیری در معرض ماده ضد میکروب با میکروارگانیسم می‌پردازد و لذا به عنوان روشی پویا که اطلاعات دقیق‌تری نسبت به آزمایش‌های حداقل بازدارندگی و حداقل کشندگی که فقط تاثیر محدود ترکیبات ضد میکروبی را طی مدت زمان مشخص ارائه می‌دهد عمل می‌کند [۱۴]. در این پژوهش به تولید نانولیپوزوم‌های حاوی نانو اکسید روی و بررسی قدرت ضد میکروبی آن‌ها در مقایسه با نانوذرات اکسیدروی بدون پوشش با استفاده از منحنی زمان-کشندگی علیه دو باکتری *باسیلوس سرئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان دو سویه عامل مسمومیت و بیماری‌زا در صنایع غذایی پرداخته شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

نانوذرات اکسیدروی با خلوص ۹۹/۹ درصد (شرکت مینا تجهیز، تهران)، لسیتین سویا (ال-آلفا- فسفاتیدیل کولین) (سیگما، آلمان)، اتانول ۹۹/۹ درصد، کلروفورم، توپین ۸۰، محیط کشت مولر هیتتون براث و مولر هیتتون آگار از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. سوش های میکروبی باسیلوس سرئوس (ATCC 11778) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 9027) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) تهیه شدند.

۲-۲- تولید نانولیپوزوم به روش حرارتی

نانولیپوزوم‌ها طبق روش راستی و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییر و بدون استفاده از حلال آلی تولید شدند [۱۲]. فاز آبی شامل محلول لسیتین ۳ درصد (وزنی - حجمی) در بافر فسفات (pH = ۷/۴ - ۷/۲) در حمام آبگرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تهیه گردید. مقادیر مشخص نانوذرات اکسیدروی با هدف دستیابی به سطوح مختلف لسیتین به نانوذرات اکسیدروی (در سه سطح ۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی - وزنی) به فاز آبی اضافه گردید و در حمام آبگرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه مخلوط شد. به منظور دستیابی به توزیع یکنواخت نانو لیپوزوم‌ها، امولسیون‌ها با هموژنایزر (Dragon-Lab, D-500, China) با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه به هم زده شدند.

۲-۳- تولید نانو لیپوزوم به روش آب پوشانی لایه نازک

نانولیپوزوم‌ها مطابق با روش چاو و همکاران (۲۰۲۰) با کمی تغییر تولید شدند [۱۵]. ابتدا محلول لسیتین ۳ درصد (وزنی - حجمی) در اتانول خالص و سپس مقادیر مشخص نانوذرات اکسیدروی با هدف دستیابی به نسبت های لسیتین به نانوذرات اکسیدروی (در سه سطح ۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱

وزنی - وزنی) به ترکیب فوق افزوده شد. این ترکیب به آرامی به محلول بافر فسفات (pH = ۷/۴ - ۷/۲) حاوی توپین ۸۰ افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به هم زده شد. محلول حاصل به اوپراتور چرخشی تحت خلا (LabTech EV311H, China) جهت تبخیر اتانول در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. لایه نازک تشکیل شده با ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه استریل شستشو با هموژنایزر (Dragon-Lab, D-500, China) با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه به هم زده شدند. در انتها مخلوط لیپوزومی در حمام یخ با استفاده از پروپ سونیکاتور (Ultrasonic Homogenizer UH-600) با قدرت ۵ سیکل یک دقیقه‌ای با یک دقیقه استراحت مخلوط گردید.

۲-۴- فعال‌سازی اولیه سویه‌های میکروبی

دو سویه میکروبی باسیلوس سرئوس (ATCC 11778) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 9027) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری گردید. سویه-های میکروبی بر محیط کشت مولر هیتتون آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد طی ۲۴ ساعت به صورت خطی کشت داده شدند. سویه‌ها تا زمان استفاده در محیط کشت مولر هیتتون براث حاوی ۱۵٪ گلیسرول و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۷].

۲-۵- تعیین مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum inhibitory concentration (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration (MBC))

به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) نانوذرات اکسید روی و نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی بر رشد باکتری های مورد مطالعه از روش رقت سازی با استفاده از میکروپلیت های ۹۶ خانه استفاده شد. در ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هیتتون براث به هر چاهک اضافه گردید. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های استوک نانو اکسیدروی با غلظت‌های ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت

زمانی مشخص (۳۰ دقیقه) طی ۸ ساعت نمونه برداری از محیط صورت گرفته، بر محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. تعداد کلنی ها به صورت (Log CFU/mL) گزارش و منحنی رشد باکتری ها بر حسب تغییرات تعداد باکتری ها (Log CFU/mL) در واحد زمان ترسیم گردید [۱۷].

۷-۲- آنالیز آماری

این ارزیابی بر اساس روش فاکتوریل و طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تحلیل داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس (Anova) با نرم افزار (SPSS) انجام شد. میانگین‌ها بر اساس حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) از رشد و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری

مقایسه میانگین‌های حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات اکسید روی به صورت آزاد و نانولیپوزوم‌های تهیه شده به روش حرارتی (Thin) و آب پوشانی لایه نازک (Therm) علیه باکتری‌های باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژینوزا در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان دهنده افزایش معنی دار ($p < 0/05$) قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدروی درون پوشانی شده در سامانه‌های نانولیپوزومی در مقایسه با نانوذرات اکسیدروی بدون پوشش بود. این افزایش را می توان به افزایش انعطاف پذیری و قدرت مانور نانوذرات اکسیدروی درون پوشانی شده در حامل های نانولیپوزومی در مقایسه با نمونه‌های آزاد مرتبط دانست [۱۸]. قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسید- روی به ایجاد تنش اکسیداتیو حاصل از تولید رادیکال‌های اکسیژن آزاد (ROS) در غشاء سلولی، آزاد سازی کاتیون روی در محیط رشد میکروارگانیسم‌ها و یا تماس مستقیم نانوذرات اکسیدروی با دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها

جداگانه اضافه شد و رقیق سازی سریالی از اولین چاهک در هر ردیف انجام گردید. در انتها از هر سویه میکروبی با غلظت نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ cfu/mL) به تمامی چاهک‌ها افزوده شد بطوریکه غلظت نهایی باکتری 10^6 گردد. غلظت ترکیبات نانو ساختار در محدود ۰/۷۸ تا ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر تنظیم شد. آخرین چاهک از هر ردیف حاوی محیط کشت و باکتری (محیط فاقد نانو ذرات) به عنوان کنترل مثبت و یک ردیف از میکروپلیت حاوی محیط کشت و غلظت‌های مختلف نانو ذرات (محیط فاقد باکتری) به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. کمترین غلظت از سوسپانسیون نانو مواد در چاهک که کدورت نشان نداد به عنوان MIC نانو ذرات تعیین شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از چاهک‌هایی که در آنها باکتری رشد نکرده و کدورتی مشاهده نشد به محیط مولر هیتون آگار منتقل و به صورت سطحی کشت شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، پلیت‌ها از نظر رشد باکتری‌ها بررسی شدند. کمترین غلظتی از نانو مواد که باکتری رشد نکرده بود، به عنوان حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) در نظر گرفته شد [۱۶].

۲-۶- ارزیابی منحنی زمان - کشندگی (Time-kill curve analysis)

به ۴۹ میلی لیتر محیط کشت مولر هیتون پراث ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیونی از هر سویه میکروبی که در مرحله انتهای فاز لگاریتمی قرار داشت با غلظت تقریبی (CFU/mL) $10^6 - 10^5$ اضافه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های MIC و MBC نانولیپوزوم‌های تهیه شده حاوی نانوذرات اکسید- روی و نانوذرات اکسیدروی بدون پوشش به صورت جداگانه به محیط مورد نظر افزوده شده و در گرمخانه با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. جهت ارزیابی منحنی رشد باکتری‌ها بدون حضور نانوذرات و در حضور هر یک از نانوذرات و در فواصل

اکسیدروی به تنهایی و یا در ترکیب با حلال‌های آلی کلره قدرت ضد میکروبی خوبی بر علیه باکتری سودوموناس آئروژینزا/ دارند که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت [۶]. ندافی و همکاران (۲۰۲۰) مقادیر حداقل غلظت کشندگی نانوذرات اکسید روی علیه سویه باسیلوس سرئوس جدا شده از مواد غذایی را معادل ۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند که با نتایج این تحقیق هماهنگی داشت [۲۰]. دیدار (۲۰۱۹) نیز اعلام کرد که نانوذرات اکسیدروی فعالیت ضد میکروبی خوبی علیه باسیلوس سرئوس داشت که با افزایش غلظت نانوذرات به شکل معنی داری افزایش یافت [۲۱]. کرزیلیکو و همکاران (۲۰۲۳) ضمن ارزیابی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسیدروی علیه باسیلوس سرئوس تولید رادیکال های اکسید کننده توسط نانوذرات را دلیل قدرت ضد میکروبی حتی در غلظت های کمتر از مقادیر MIC گزارش کردند [۲۲].

مرتبط است [۸]. روش‌های اتصال نانوذرات بر سطح باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی متفاوت است. تیکوئوتیک اسید در پیتیدوگلیکان دیواره سلولی و لیپوتیکوئیک اسید در غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها به عنوان منابع تولید بار منفی و جاذب بار مثبت در سطح سلول عمل می‌کنند. نیروی جاذبه الکترواستاتیک بین بار مثبت ناشی از نانوذرات اکسید روی و بار منفی سطح سلول عامل اصلی اتصال نانوذرات بر سطح سلول میکروبی است. شدت گرادیان الکتروشیمیایی که به دلیل نقل و انتقال یون های هیدروژن به داخل غشاء سلول ایجاد می‌شود سرعت انتقال یون‌های روی را به داخل سلول تسهیل می‌کند. شدت و ضعف این مکانیسم با اندازه ذرات رابطه مستقیمی دارد به نحوی که با کاهش اندازه ذرات شدت نیروهای الکترواستاتیکی افزایش یافته که در نهایت به افزایش قدرت ضد میکروبی ابعاد نانومتری ذرات اکسیدروی منتهی می‌گردد. البته قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی علاوه بر اندازه به غلظت و زمان در معرض قرار گیری میکروارگانیسم‌ها با نانوذرات نیز وابسته است [۱۹]. محمد یاری و همکاران (۲۰۲۲) نیز گزارش دادند که نانوذرات

Table 1. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) values of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration sonication (Thin) and heat method (Therm) with the different ratio of lecithin: nano-ZnO (5:1, 15:1 and 25:1 w/w), against *Bacillus cereus* (ATCC 11778) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Different letters indicate statistically significant differences at ($p < 0.05$).

Antimicrobial agents	Microorganisms type			
	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	
	MIC value	MBC value	MIC value	MBC value
Free nano-ZnO	10.08 ^a ± 0.08	15.10 ^a ± 0.07	8.78 ^a ± 0.11	17.55 ^a ± 0.16
Therm 5:1	6.65 ^b ± 0.02	13.33 ^b ± 0.16	6.65 ^b ± 0.06	13.35 ^b ± 0.11
Therm 15:1	5.33 ^c ± 0.06	10.66 ^c ± 0.09	5.33 ^c ± 0.10	10.66 ^c ± 0.08
Therm 25:1	2.65 ^d ± 0.12	5.33 ^d ± 0.08	2.65 ^d ± 0.02	5.33 ^d ± 0.06
Thin 5:1	6.65 ^b ± 0.17	13.33 ^b ± 0.08	6.65 ^b ± 0.03	13.35 ^b ± 0.06
Thin 15:1	5.33 ^c ± 0.07	10.66 ^c ± 0.04	5.33 ^c ± 0.07	10.66 ^c ± 0.01
Thin 25:1	1.65 ^d ± 0.03	3.33 ^d ± 0.11	2.65 ^d ± 0.09	5.33 ^d ± 0.05

حداقل کشندگی به ۴ ساعت کاهش یافت. طول فاز لگاریتمی باکتری باسیلوس سرئوس در حضور نانوذرات اکسیدروی درون پوشانی شده به روش حرارتی در سطوح مختلف لسیتین به نانوذرات (۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی - وزنی) به ترتیب در غلظت حداقل بازدارندگی به ۴، ۳ و ۲ ساعت و در غلظت حداقل کشندگی به ۲، ۲ و ۱ ساعت

۳-۲- بررسی منحنی زمان - کشندگی باسیلوس سرئوس

مطابق شکل ۱ طول فاز لگاریتمی منحنی رشد باکتری باسیلوس سرئوس در نمونه کنترل (بدون ماده ضد میکروب) ۸ ساعت بود که در حضور نانوذرات اکسیدروی بدون پوشش در غلظت حداقل بازدارندگی به ۵ و در غلظت

کاهش یافت. همچنین در حضور نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی تهیه شده به روش آب پوشانی لایه نازک در سطوح مختلف لسیتین به نانوذرات (۵:۱) و (۱۵:۱) و (۲۵:۱ وزنی-وزنی) به ترتیب در غلظت حداقل بازدارندگی ۴، ۳ و ۲ ساعت و در غلظت حداقل کشندگی به ۲، ۲ و ۱ ساعت کاهش یافت. افزایش نسبت لسیتین به نانوذرات اکسید روی سبب کاهش طول مدت زمان فاز لگاریتمی در منحنی رشد در حضور مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی علیه رشد باکتری‌های باسیلوس سرئوس شد. طول فاز لگاریتمی باکتری‌های باسیلوس سرئوس در مقادیر برابر MIC و MBC نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی تولید شده به روش حرارتی و آب پوشانی لایه نازک در نسبت‌های کم لسیتین به نانوذرات اکسیدروی (۵:۱) یکسان بود. افزایش نسبت لسیتین به نانوذرات اکسیدروی در مقادیر برابر MBC نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی تولید شده به روش حرارتی و آب پوشانی لایه نازک، طول فاز لگاریتمی باکتری باسیلوس سرئوس را کاهش داد. افزایش نسبت لسیتین به نانوذرات اکسیدروی در مقادیر برابر (MIC) نانولیپوزوم‌های تولید شده به روش حرارتی تغییری در طول فاز لگاریتمی باکتری باسیلوس سرئوس ایجاد نکرد. مطابق شکل ۱، تغییر تعداد باکتری‌های باسیلوس سرئوس نسبت به تعداد اولیه طی ۸ ساعت رشد در نمونه کنترل، معادل افزایش ۳/۲۲ لگاریتمی بود. میزان این تغییرات در طی ۸ ساعت رشد باکتری در مقادیر برابر MIC و MBC نانوذرات اکسیدروی بدون پوشش (۱/۳۳+ و ۱-) و نانولیپوزوم‌های حاوی نانواکسیدروی با نسبت لسیتین به نانوذرات اکسیدروی (وزنی-وزنی) در سطوح مختلف (۵:۱)، (۱۵:۱) و (۲۵:۱) در روش حرارتی به ترتیب (۰/۲۳+ و ۱/۴۷-)، (۰/۲۷- و ۱/۷۲-) و (۰/۵۷- و ۲/۴۷-) و در روش آب پوشانی به ترتیب (۰/۳۴- و ۱/۵۷-)، (۰/۰۴+ و ۱/۹۷-) و (۰/۳۱- و ۲/۴۷-) اندازه‌گیری شد. بررسی منحنی‌های شکل ۱ نشان داد که نانولیپوزوم‌های تولیدی با استفاده از روش آب پوشانی

لایه نازک در مقایسه با روش حرارتی، قدرت ضد میکروبی بیشتری علیه باسیلوس سرئوس در غلظت‌های یکسان لسیتین داشتند. لگاریتم تعداد باکتری‌های باسیلوس سرئوس در حضور مقادیر MBC نانولیپوزوم‌های حاوی نانواکسید-روی با نسبت (۲۵:۱) لسیتین به نانواکسیدروی (وزنی-وزنی)، در روش آب پوشانی لایه نازک پس از ۷ ساعت و در حضور همان نانولیپوزوم‌های تولید شده در روش حرارتی پس از ۸ ساعت به صفر رسید. دیدار (۲۰۱۹) با پوشش منگنز در ساختار نانواکسید روی قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدروی پوشش‌دار شده را علیه باسیلوس سرئوس افزایش داد. تشکیل اکسیژن فعال ناشی از واکنش ترکیب بر روی نانوذرات اکسیدروی و واکنش متقابل آنها با اکسیژن و مولکول‌های آب بر روی سطح نانو ذرات دلیل افزایش قدرت ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی پوشش‌دار شده گزارش شده است [۲۱]. میرحسینی و برزگر فیروزآبادی (۲۰۱۵) با بررسی اثر نانوذرات اکسیدروی بر باکتری باسیلوس سرئوس بیان داشتند که قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی وابسته به غلظت، اندازه ذرات و نحوه پراکندگی آن‌ها در محیط است و افزایش رسوب و عدم پراکندگی مناسب نانوذرات اکسید روی در مجاورت میکروارگانیسم‌های قدرت ضد میکروبی آن‌ها را کاهش داد که با نتایج این پژوهش، هماهنگی داشت [۲۳]. ریحانی پول و همکاران (۲۰۲۲) با نانوریزپوشانی نایسین در قالب نانولیپوزوم‌ها خواص فیزیکی آن‌ها را ارتقا و ویژگی ضد باکتریایی آنها را در مقادیر (MIC) و (MBC) علیه باسیلوس سرئوس تا ۵۰ درصد افزایش دادند [۲۴].

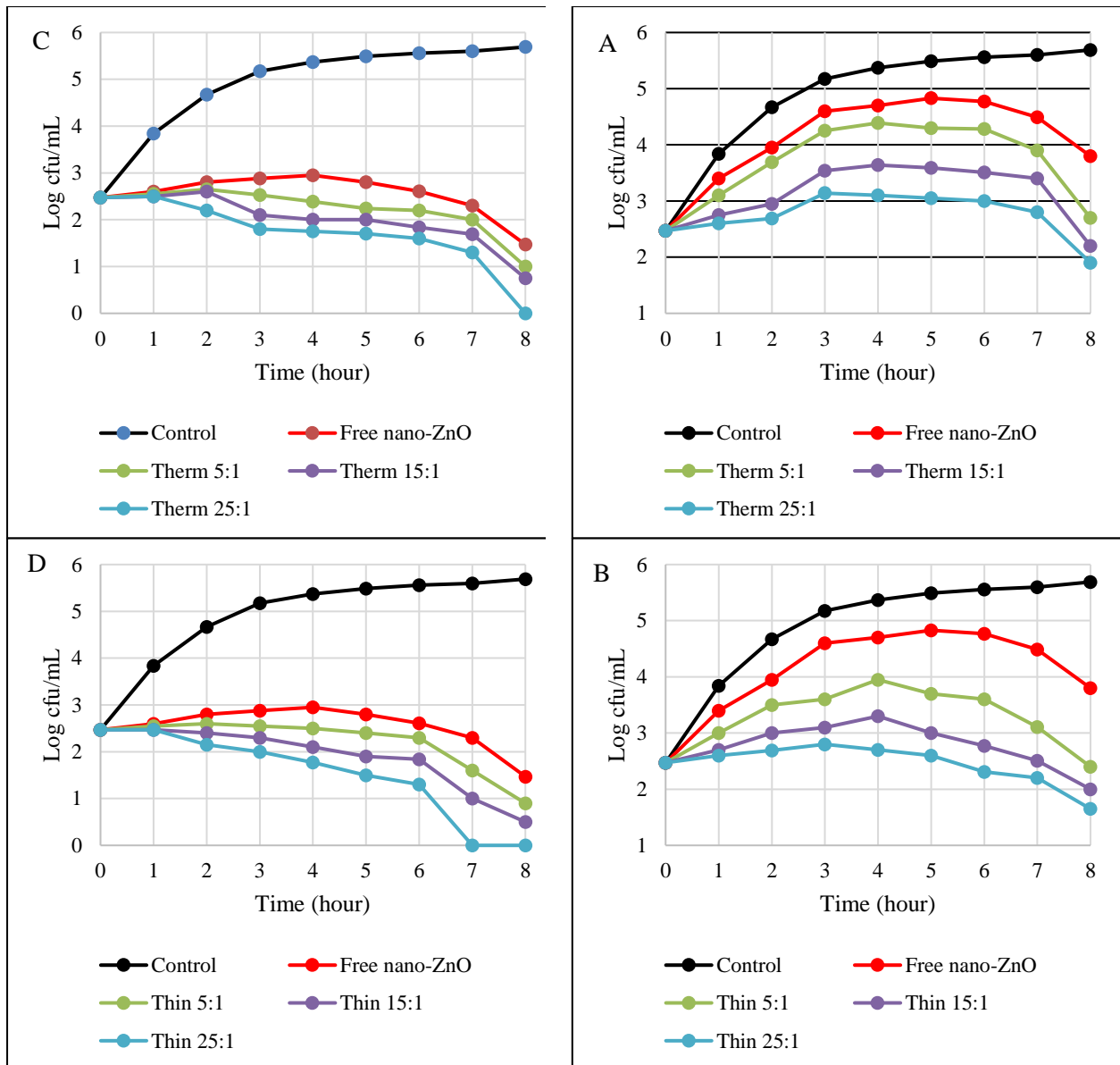


Fig. 1. Time-kill graph of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration sonication (Thin) and heat method (Therm) with the different ratio of lecithin: nano-ZnO (5:1, 15:1 and 25:1 w/w) against *Bacillus cereus* (ATCC 11778) at MIC value of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by Therm (A) and Thin (B) and MBC value of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by Therm (C) and Thin (D). In all figures “Control” means growth without any antimicrobial agent

باکتری‌ها در حضور نانوذرات اکسیدروی درون پوشانی شده به روش حرارتی در سطوح مختلف لسیترین به نانوذرات اکسید روی (۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی-وزنی) به ترتیب در غلظت حداقل بازدارندگی به ۴، ۴، ۳ ساعت و در غلظت حداقل کشندگی به ۲، ۲، ۱ ساعت کاهش یافت. از سوی دیگر طول فاز لگاریتمی باکتری سودوموناس آئروژینزا در حضور نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسید روی تهیه شده به روش آب پوشانی لایه نازک در سطوح مختلف

۳-۳- بررسی منحنی زمان - کشندگی سودوموناس آئروژینزا

مطابق شکل ۲، طول فاز لگاریتمی باکتری سودوموناس آئروژینزا در نمونه کنترل حدود ۶ ساعت بود که در حضور نانوذرات اکسیدروی بدون پوشش در غلظت حداقل بازدارندگی (MIC) به ۵ و در غلظت حداقل کشندگی (MBC) به ۴ ساعت کاهش یافت. طول فاز لگاریتمی این

بدون پوشش علیه سودوموناس آئروژینزا گزارش دادند که پوشش نشاسته بر روی نانوذرات اکسید آهن ضمن افزایش میزان پراکندگی نانوذرات در محیط قدرت نفوذ به درون سلول آن ها را افزایش داد و سبب کاهش مقادیر غلظت (MIC) و (MBC) نانوذرات حاصله گردید که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت [۲۵]. عبدالصدا و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که پوشش دهی نانوذرات فلزی با خاصیت ضد میکروبی نظیر اکسید آهن با استفاده از پلی اتیلن گلیکول قدرت ضد میکروبی آن ها را به دلیل افزایش پایداری در محیط و بهبود نفوذ و انتشار درون سلول افزایش می دهد [۲۶]. قریب و همکاران (۲۰۱۲) با ارزیابی اثر نانولیپوزوم های حاوی آنتی بیوتیک تتراسایکلین و تتراسایکلین بدون پوشش بر سودوموناس با استفاده از منحنی زمان - کشندگی، افزایش جاذبه الکترواستاتیک بین غشاء خارجی سلول و غشاء نانولیپوزوم ها را دلیل افزایش قدرت ضد میکروبی نانولیپوزوم های تولیدی گزارش کردند که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت [۲۷]. خاقانی بروجنی و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی اثر نانوذرات اکسیدروی علیه باکتری های سودوموناس آئروژینزا و باسیلوس سرئوس گزارش کردند که محصور کردن نانوذرات اکسید روی درون شبکه ماتریسی به دلیل جلوگیری از رهاسازی و تولید کلوخه های بزرگ ذرات اکسیدروی در حفظ و افزایش قدرات ضد میکروبی این نانوذرات تاثیر معنی داری داشت که با نتایج این پژوهش هماهنگ بود [۲۸].

لسیتین به نانوذرات اکسید روی (۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی - وزنی) به ترتیب در غلظت حداقل بازدارندگی ۴، ۳ و ۳ ساعت و در غلظت حداقل کشندگی به ۱، ۱ و کمتر از یک ساعت رسید. کاربرد نانولیپوزوم ها در تمامی نسبت های لسیتین به نانوذرات اکسیدروی در کاهش طول دوره لگاریتمی باکتری سودوموناس آئروژینزا در مقادیر برابر MIC و MBC در هر دو روش حرارتی و آب پوشانی لایه نازک موثر بود و افزایش نسبت لسیتین به نانوذرات اکسیدروی طول فاز لگاریتمی باکتری سودوموناس آئروژینزا را کاهش داد. مطابق شکل ۲ تغییر تعداد (Log CFU/ml) باکتری های سودوموناس آئروژینزا نسبت به تعداد اولیه طی ۸ ساعت رشد در نمونه کنترل، معادل افزایش ۱/۲۲ لگاریتمی بود. این تغییرات در مقادیر برابر MIC و MBC نانوذرات اکسید روی بدون پوشش (۰/۱۷+ و ۰/۴۸-) و نانولیپوزوم های حاوی نانواکسیدروی تهیه شده با نسبت لسیتین به نانوذرات اکسید- روی (وزنی-وزنی) در سطوح مختلف (۵:۱)، (۱۵:۱) و (۲۵:۱) در روش حرارتی به ترتیب (۰/۰۸- و ۰/۸۳-)، (۰/۳۳- و ۱/۳۸-) و (۰/۴۴- و ۲/۳۸-) و در روش آب پوشانی به ترتیب (۰/۲۰- و ۲/۰۴-)، (۰/۳۴- و ۳/۰۴-) و (۰/۴۸- و ۳/۰۴-) اندازه گیری شد. نتایج شکل ۲ نشان داد که افزایش نسبت لسیتین به نانوذرات اکسیدروی سبب کاهش مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی نانولیپوزوم های حاوی نانوذرات اکسیدروی علیه باکتری های سودوموناس آئروژینزا طی ۸ ساعت شد. نانولیپوزوم های تولیدی با استفاده از روش آب پوشانی لایه نازک در مقایسه با روش حرارتی، قدرت ضد میکروبی بیشتری علیه سودوموناس آئروژینزا در غلظت های یکسان لسیتین داشتند به طوری که در حضور نانولیپوزوم های تولیدی با نسبت وزنی- وزنی (۲۵:۱) لسیتین به نانوذرات اکسید روی در روش آب پوشانی لایه نازک پس از ۷ ساعت و در حضور همان نانولیپوزوم های تولید شده در روش حرارتی پس از ۸ ساعت به صفر رسید. زفری و همکاران (۲۰۱۳) با مقایسه قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسید آهن پوشش دار شده با نشاسته در مقایسه با نانوذرات اکسید آهن

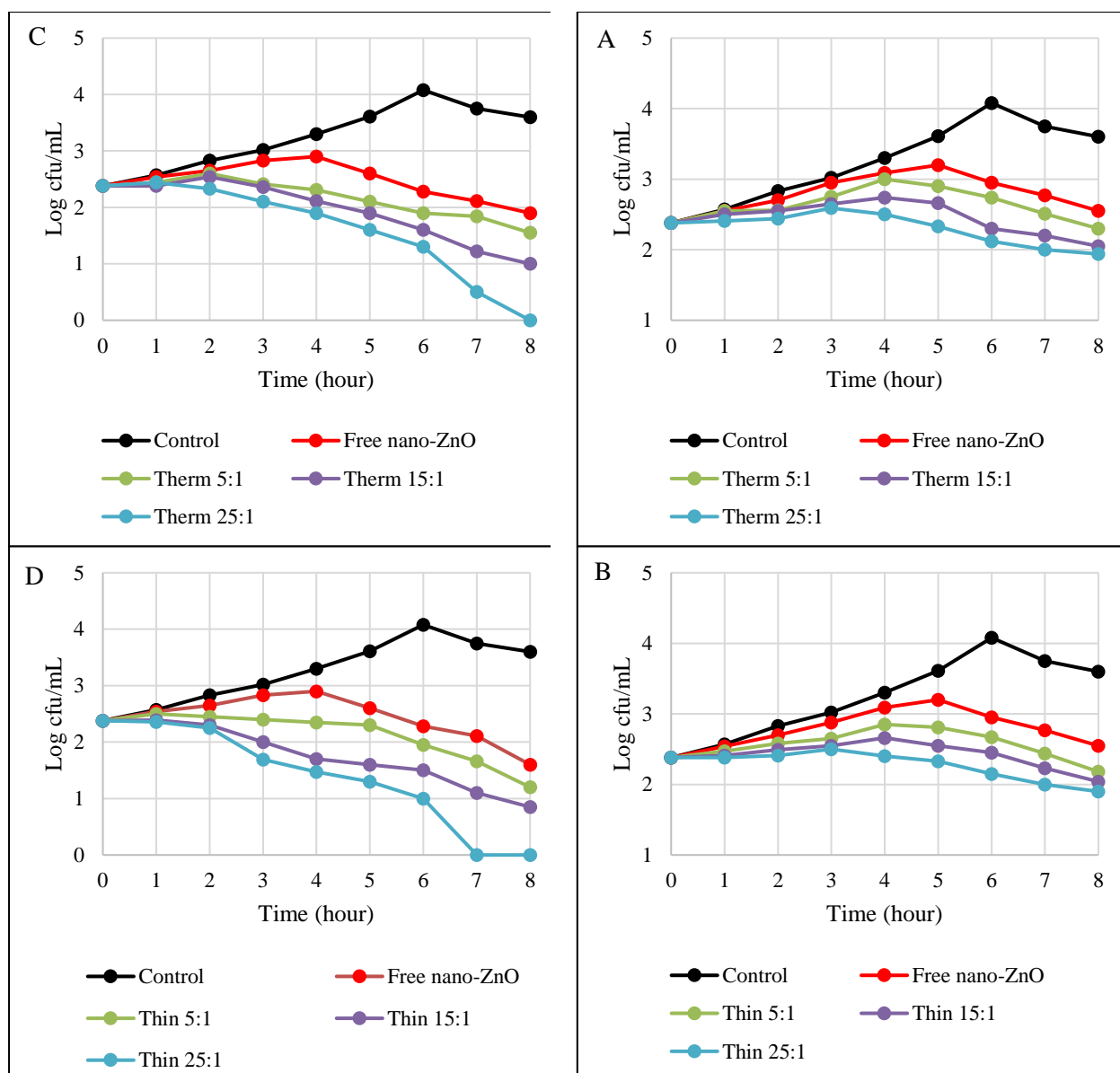


Fig. 2. Time-kill graph of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration (Thin) and heat method (Therm) with the different ratio of lecithin: nano-ZnO (5:1, 15:1 and 25:1 w/w) against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) at MIC value of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by Therm (A) and Thin (B) and MBC value of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by Therm (C) and Thin (D). In all figures “Control” means growth without any antimicrobial agent.

غذایی به منظور بهبود کیفیت و انتقال اجزای غذایی فراسودمند و یا ترکیبات ضد میکروب مورد توجه قرار گرفته است. نتایج این پژوهش نشان دهنده افزایش معنی دار قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی با درون پوشانی درون غشا های نانولیپوزومی بود ($p < 0.05$). نوع روش به کار گرفته شده در تولید این نوع نانوذرات نیز در افزایش فعالیت ضد میکروبی آن‌ها به شکل معنی داری موثر بود. در نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسید روی با افزایش نسبت

۴- نتیجه گیری

افزایش مقاومت میکروب‌ها به ترکیبات ضد میکروبی متداول یکی از معضلات مهم در حوزه بهداشت و سلامت غذا است. استفاده از ترکیبات ضد میکروب در مقیاس نانومتری تحول عظیمی در صنایع مختلف به ویژه صنعت غذا ایجاد کرده است. در سال‌های اخیر استفاده از نانولیپوزوم‌ها در صنایع

بیشتری داشت ($p < 0.05$). نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده نانولیپوزم حاوی نانوذرات اکسید روی برای مهار جدایه باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژینزا در مواد غذایی موثر بوده و پتانسیل مناسبی برای جایگزینی مواد نگهدارنده برای در کاهش فساد میکروبی مواد غذایی است.

لستین به نانوذرات مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.05$). استفاده از روش آب پوشانی لایه نازک در مقایسه با روش حرارتی نیز در بهبود و ارتقاء ویژگی ضد میکروبی نانولیپوزم‌های حاوی نانوذرات اکسید روی تاثیر

۵- منابع

- [1] Molayi Kohneshahri S., Taghinejad, J., & Hosainzadegan, H. (2015). A review on structure and virulence of *Bacillus cereus*. *Journal of Laboratory and Diagnosis*, 7(29), 51-67 [in Persian].
- [2] Yolmeh, M., Habibi-Najafi, M. B., & Najafzadeh, M. (2015). nanotechnologies in food science: applications, recent trends, and future perspectives. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 11 (7), 319-324 [in Persian].
- [3] Sharafati Chaleshtori, R., Mazroii Arani, N., Alizadeh, E., & Etemadi, A. (2019). Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from rose water and herbal distillates in Kashan, 2018. *Journal of Food Microbiology*, 7(2), 10-17 [in Persian].
- [4] Shahbazi, N., Jamshidi, A., & Azizzadeh, M. (2019). The effect of short-time microwave exposure, organic Acid and Salt on *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in veal parts during refrigerated shelf life. *Journal of food science and technology (Iran)*, 88(16), 357-364 [in Persian].
- [5] Sim, J. H., Jamaludin, N. S., Khoo, C. H., Cheah, Y. K., Nadiah Binti, S., Halim, A., Seng, H. L., & Tiekink, E. R. T. (2014). In vitro antibacterial and time-kill evaluation of phosphane-gold(I) dithiocarbamates, R3Pau [S2CN (iPr)CH2CH2OH] for R = Ph, Cy and Et, against a broad range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Gold Bulletin*, 47, 225-236.
- [6] Mohammadyari, M., Mozaffari, Z., & Rahimian Zarif, B. (2022). Investigation of the Inhibitory Effect of Zinc nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa*. *The Quarterly Journal of School of Medicine*, 46(3), 41-49.
- [7] Mirhosseini, M., Kiany Harchegani, M., Kakai Dehkordi, S., & Barzegary Firouzabadi, F. (2013). Comparison of antibacterial effect of ZnO nanoparticles in apple juice at 25 and 4. *Quarterly Journal of Experimental Animal Biology*, 2 (3), 9-15.
- [8] Emamifar, A., & Mohamadizadeh, M. (2020). Influence of sonication and antimicrobial packaging-based nano-ZnO on the quality of fresh strawberry juice during cold storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14 (6), 3280-3290.
- [9] Krzepiłko, A., Matyszczyk, K. M., & Świącilo, A. (2023). Effect of Sublethal Concentrations of Zinc Oxide Nanoparticles on *Bacillus cereus*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(3), 485.
- [10] Ghanbarzadeh, B., Pezeshky, A., Hamishehka, H., & Moghadam, M. (2016) Vitamin A palmitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 12(2), 261- 275 [in Persian].
- [11] Pormazen, J. (2014). Liposomes or naan lipids: Detection, characterization and preparation methods. *Nano World Quarterly*, 10 (34), 16-25[in Persian].
- [12] Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M. R., & Yazid, A. M. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chemistry*, 135, 2761-2770.
- [13] Dimapilis, E. A. S., Hsu, C. S., Mendoza, R. M. O., Lu, M. C. (2018). Zinc oxide nanoparticles for water disinfection. *Sustainable Environment Research*, 28 (2), 47-56.
- [14] Pelligand, L., Lees, P., Sidhu, P. K., & Toutain, P. L. (2019). Semi-mechanistic modeling of florfenicol time-kill curves and in silico dose fractionation for calf respiratory pathogens. *Frontiers in microbiology*, 10, 1237.
- [15] Cao, D., Shu, X., Zhu, D., Liang, S., Hasan, M., & Gong, S. (2020). Lipid-coated ZnO nanoparticles synthesis, characterization and cytotoxicity studies in cancer cell. *Nano Convergence*, 7, 14.
- [16] Momeni-Javid, Z., Hamishekar, H., Rahmati-Yamchi, M., Zarghami, N., Akbarzadeh, A. & Milani, M. (2017) Evaluation and study of antimicrobial activity of nanoliposomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45 (5), 975-980.
- [17] Avila, J. G., de Liverant, J. G., Martinez, A., Martinez, G., Munoz, J. L., Arciniegas, A., & de Vivar, A. R. (1999). Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *Journal of ethnopharmacology*, 66(1), 75-78.
- [18] Gortzi, O., Lala, S., Chinou, I., & Tsaknis, J. (2007). Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. *Molecules*. 12(5), 932-945.
- [19] Mendes, C. R., Dilarri, G., Forsan, C. F., & et al. (2022). Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. *Scientific Reports*, 12, 2658.

- [20] Naddafi, S., Soltan Dallal, M. M., Partoazar, A., & Dargahi, Z. (2020). Antibacterial activity of ZnO nanoparticles on standard and isolated strains of *Salmonella enteritidis* and *Bacillus cereus* associated with Iranian foods. *Journal of Grogan University Medical Science*, 22 (2), 82-88 [in Persian].
- [21] Didar, Z. (2019). Investigation of Antimicrobial and Synergistic effects of doped Zinc Oxide Nanoparticles against *Bacillus cereus*. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 15(2), 257-266 [in Persian].
- [22] Krzepińko, A., Matyszczuk, K. M., & Świącilo, A. (2023). Effect of Sublethal Concentrations of Zinc Oxide Nanoparticles on *Bacillus cereus*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(3), 485.
- [23] Mirhosseini M, Barzegari Firouzabadi F. Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in Milk by Zinc Oxide Nanoparticles. *Iranian Journal of Pathology*, 10(2), 97-104.
- [24] Reyhani Poul, S., Yeganeh, S., & Safari, R. (2022). Production of nanoliposomes carrying nisin with chitosan coating and evaluation of physical and antibacterial properties of the product against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 18(4), 561-573 [in Persian].
- [25] Zafari, M., Jafarpour, M., Biazar, E., & Heidari, K. S. (2013). Antimicrobial effects of iron oxide nanoparticles in the presence of dispersing agent. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7 (1), 143-149.
- [26] Abdulsada, F. M., Hussein, N. N., Sulaiman, G. M., Al Ali, A., & Alhujaily, M. (2022). Evaluation of the Antibacterial Properties of Iron Oxide, Polyethylene Glycol, and Gentamicin Conjugated Nanoparticles against Some Multidrug-Resistant Bacteria. *Journal of Functional Biomaterials*, 13, 138.
- [27] Gharib, A., Faezizadeh, Z., & Godarzee, M. (2012). In vitro and in vivo activities of ticarcillin-loaded nanoliposomes with different surface charges against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 29248). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20 (1), 41.
- [28] Khaghani Boroujeni, A., Madani, H., & Shakeri, S. (2018). Investigation of the antibacterial effect of cement matrix containing zinc oxide nanoparticles on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Water and Wastewater*, 29(4), 88-100 [in Persian].



Antimicrobial activity evaluation of nano ZnO-loaded nanoliposomes against *Bacillus cereus* (ATCC 11778) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)

Parvin Souril¹, Aryou Emamifar^{2*}, Nafiseh Davati³

- 1- Graduated Student of Food Sciences and technology, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
- 2- Associated professor, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
- 3- Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2023/7/12
Accepted: 2023/10/11

Keywords:

Antimicrobial activity,
Nanoliposome,
Nano-ZnO.

DOI: 10.22034/FSCT.21.146.106

*Corresponding Author E-Mail:
a.emamifar@basu.ac.ir

In this research, in-vitro time-kill curve effect of nano-ZnO loaded nanoliposomes against *Bacillus cereus* (ATCC 11778) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) were evaluated. Thin layer hydration sonication and heat methods were evaluated to preparation of nano-ZnO loaded nanoliposomes at different level of lecithin: nano-ZnO ratio (5:1, 15:1, and 25:1 w/w). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of nano-ZnO loaded nanoliposomes and free nano-ZnO against *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* were determined. Results showed that the encapsulation of nano-ZnO in nanoliposome systems significantly increased their antimicrobial activities. Nano-ZnO loaded nanoliposomes were prepared at the highest ratio of lecithin: nano-ZnO ratio (25:1 w/w) showed higher antimicrobial activity compared to those prepared by heat method. From the time-kill curves, the log phase growth of *Escherichia coli* (8 hours) and *Staphylococcus aureus* (7 hours) in the medium containing nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared through the thin layer hydration sonication at the highest level of lecithin: nano-ZnO ratio (25:1 w/w) at MIC and MBC values decreased to 3 and 3 hours and to 1 and less than 1 hours, respectively.