



Combined effects of zinc oxide nanoparticle and malic acid to inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Fatemeh Barzegari Firouzabadi^{1,2}, Zahra Marzban¹, Sara Khaleghizadeh¹, Fatemeh Daneshmand¹, Mahboubeh Mirhosseini^{1,2}

1. Departeman of Biology, College of Science, Payame Noor University, Yazd, Iran
2. Department of Biotechnology, Nano Structured Coatings Institute, Yazd Payame Noor University, Yazd, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2015/08/19
Accepted: 2015/12/12
Available online: 2016/10/16

Article Subject:

Food Microbiology

IJMM 2016; 10(5): 52-59

Corresponding author at:

Fatemeh Barzegari firouzabadi

Biology Department, Payame
Noor University, Yazd, Iran

Tel: 0989131599674

Email:

f.barzegary@gmail.com

Abstract

Background and Aim: The prevalence of food-borne pathogens has been to draw public attention to food safety. Therefore, it needs to design and production of new antimicrobial agents to ensure food safety and increase food storage. Aim to this study was combined effects of zinc oxide nanoparticle and malic acid to inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Materials and Methods: The study was experimental. Antibacterial activities were tested for different concentrations of zinc oxide suspensions containing %0.2 malic acid against the *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* inoculated onto culture media and carrot juice.

Results: Results showed that Zinc oxide Nanoparticle (NP) suspensions (0, 1, 3, 5 and 8) containing malic acid had a significant inhibitory effect on the growth of *E. coli* and *S. aureus* during 24 h of incubation. Also results indicated that the 5 and 8 mM suspensions of ZnO Nanoparticle containing malic acid were the most effective on *E. coli* and *S. aureus* (P values <0.05). In addition, the obtained results exhibited that addition ZnO Nanoparticle to malic acid increased inhibitory effects on the growth of all strains in during 24h. The zinc oxide NP in suspension malic acid had preferred the ability to suppress the growth of *E. coli* and *S. aureus* in carrot juice (P values <0.05).

Conclusions: It seems, formulations containing zinc oxide Nanoparticle may be used for food storage.

KeyWords: Zinc oxide nanoparticle, Antibacterial agent, Food, Nutrition pathogen

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Barzegari Firouzabadi F, Marzban Z, Khaleghizadeh S, Daneshmand F, Mirhosseini M. Combined effects of zinc oxide nanoparticle and malic acid to inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (5): 52-59

ارزیابی اثرات ترکیبی نانوذره اکسید روی (ZnO) و اسید مالیک بر مهار رشد باکتری اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس

فاطمه برزگری فیروزآبادی^۱، زهرا مرزبان^۱، سارا خالقی زاده^۱، فاطمه دانشمند^۱، محبوبه میرحسینی^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، یزد، ایران

۲. گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده پوشش های نانو ساختار، دانشگاه پیام نور یزد، یزد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: شیوع پاتوژن های ناشی از مواد غذایی منجر به جلب توجه عموم به سلامت مواد غذایی شده است. بنابراین نیاز به طراحی و تولید مواد ضد میکروبی جدید برای اطمینان از سلامت مواد غذایی و افزایش زمان نگهداری مواد غذایی وجود دارد.

مواد و روش کار: روش مطالعه در این بررسی از نوع تجربی بود. در این مطالعه اثر تیمار سوسپانسیون غلظت های مختلف اسید مالیک، و نانو ذرات اکسید روی به همراه اسید مالیک بر مهار رشد اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت و آب هویج بررسی شد.

یافته ها: تیمار سوسپانسیون (۰، ۱، ۳، ۵ و ۸) میلی مولار از نانوذره اکسید روی در اسید مالیک اثر مهاری قابل توجهی در رشد اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در طول ۲۴ ساعت انکوباسیون نشان می دهد. نتایج نشان داد غلظت ۵ و ۸ میلی مولار نانوذره اکسید روی همراه با اسید مالیک بیشترین اثر مهاری را در هر دوسویه مورد آزمایش دارد (P values < 0.05). همچنین اضافه کردن نانوذره اکسید روی به اسید مالیک باعث افزایش اثر مهاری آن روی رشد باکتری ها در طول ۲۴ ساعت می شود. همچنین سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی و اسید مالیک دارای توانایی های ترجیحی سرکوب رشد اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در آب هویج است (P values < 0.05).

نتیجه گیری: به نظر می رسد فرمولاسیون نانو ذرات اکسید روی ممکن است برای نگهداری مواد غذایی استفاده شود.

کلمات کلیدی: نانوذره اکسید روی، عوامل ضد میکروبی، غذا، پاتوژن مواد غذایی

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۲۸
پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۲۱
انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۲۵
موضوع:
میکروبیولوژی مواد غذایی

IJMM 1395; 10(5): 52-59

نویسنده مسئول:

فاطمه برزگری فیروزآبادی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم،
دانشگاه پیام نور، یزد، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۳۱۵۹۹۶۷۴

پست الکترونیک:

f.barzegary@gmail.com

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

عمر مواد فاسدشدنی دارند (۳). فعالیت های ضدباکتریایی نسبتا مستقیمی به اسیدهای آلی نسبت داده شده اند که شامل آسید به غشای سیتوپلاسمی و از بین رفتن توانایی غشای بیرونی است که در نتیجه نفوذ و انتقال مواد غذایی از غشا دچار مشکل می شود؛ همچنین اسیدهای آلی بر روی سنتز ماکرومولکول ها تأثیر می گذارند و آن را دچار اختلال می کنند (۴،۳). علاوه بر این، اسیدهای آلی خاصی همانند اسید مالیک وجود دارند که برای کنترل آلودگی میکروبی و جلوگیری از انتشار پاتوژن ها در مواد غذایی در مرحله قبل و پس از فراوری محصولات مورد استفاده

شیوع پاتوژن های ناشی از مواد غذایی مانند اشریشیاکلی، سالمونلا و لیستریا منوسیتوژنز منجر به جلب توجه عموم به سلامت مواد غذایی شده است (۱). بنابراین نیاز به طراحی و تولید مواد ضد میکروبی جدید برای اطمینان از سلامت مواد غذایی و افزایش زمان نگهداری و انبار داری مواد غذایی وجود دارد. عوامل ضد میکروبی یا به طور مستقیم به غذا اضافه شده و یا این مواد ضد میکروبی به بسته بندی مواد غذایی اضافه می شود. (۲،۱). اسیدهای آلی به عنوان افزودنی و نگهدارنده مواد غذایی سابقه طولانی در جلوگیری از فساد مواد غذایی و افزایش طول

پراکنده شدن و تعلیق کلونیدی یکسان، نانو ذرات اکسید روی در آب دو بار تقطیر استریل حل و ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (الما سونیک، آلمان) سونیکیت شدند تمام آزمایش‌های با استفاده از یک سیستم تعلیق تازه آماده کلونیدی انجام گرفت.

تعیین اثرات ضد باکتری اسید مالیک در پلیت به روش قطره پلیت

ابتدا هر یک از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شریشیالکی* به صورت چمنی بروی پلیت های حاوی آگار TSYEA (Tryptic soy broth 0.5% yeast extract agar) نرم (۰/۰۶) به صورت جداگانه کشت داده شدند. سپس غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد) اسید مالیک تهیه گردید. بعد محل قرار گرفتن اسید مالیک به صورت قطره‌ای در هر پلیت به صورت نقاط مجزا مشخص گردید. سپس ۲۰ میکرو لیتر از اسید مالیک با غلظت‌های متفاوت بر روی این نقاط مشخص شده بر روی این پلیت ها قرار گرفتند و اجازه داده شد تا قطره‌ها خشک گردد سپس هر پلیت در 37°C به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس از هاله عدم رشد در اطراف نمونه (قطره‌های خشک‌شده) برای نشان دادن فعالیت‌های ضد باکتری برای هر غلظت اسید مالیک استفاده شد. به‌عنوان استاندارد در یکی از نقاط مشخص شده در روی پلیت از دیسک آنتی‌بیوتیکی تتراسیکلین استفاده گردید (۱۰).

بررسی فعالیت ضد باکتری سوسپانسیون نانو اکسید روی همراه با اسید مالیک در پلیت

برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی سوسپانسیون غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید روی که حاوی ۱٪ و ۲٪ از اسید مالیک است روش قطره پلیت بکار برده شد. نانو ذرات اکسید روی با غلظت‌های مختلف (۱، ۳، ۵ و ۸ mM) در اسید مالیک استریل (۰/۱ و ۰/۲) برای ایجاد یک محیط سوسپانسیونی یکنواخت حل شدند. ابتدا هر یک از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* یا *شریشیالکی* به صورت چمنی بروی پلیت های حاوی TSYEA آگار نرم (۰/۰۶) به صورت جداگانه کشت داده شدند. برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سوسپانسیون اسید مالیک و نانو ذره اکسید روی، ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون ترکیبی نانو ذرات غلظت‌های مختلف اکسید روی (۱، ۳، ۵ و ۸ mM) که حاوی اسید ۱٪ و یا ۲٪ مالیک بود به صورت نقطه‌ای بر روی پلیت TSYEA آگار نرم (۰/۰۶) حاوی 10^7 cell/mL باکتری

قرار می‌گیرند. مکانیسم‌های ضد باکتریایی این اسیدها هنوز کاملاً مشخص نیست و فعالیت آن‌ها با توجه به وضعیت فیزیولوژی ارگانیسم‌ها و ویژگی فیزیکی و شیمیایی محیط خارجی متفاوت است (۵، ۳).

در سال‌های اخیر، استفاده از عوامل ضد میکروبی معدنی در کاربردهای غیر خوراکی، توجه زیادی را برای کنترل میکروب‌ها به خود معطوف داشته است (۶). مطالعات اخیر اثبات می‌کند که نانو مواد سولفیدی و اکسید فلزات دارای خواص آنتی باکتریایی بسیار خوبی هستند و عوامل ضد باکتریایی که شامل این نانو مواد باشند می‌توانند دارای خاصیت ضد میکروبی بسیار مؤثری باشند (۷، ۶). بعضی از نانو ذره‌های ساخته شده از اکسیدهای فلزی در شرایط فراوری بسیار پایدار هستند و علاوه بر اینکه علیه باکتری‌ها مسمومیت انتخابی دارند؛ اثر سمی بسیار کمی بر روی سلول‌های انسان‌ها و حیوان‌ها دارند (۷). به‌عنوان مثال، نانو ذره اکسید روی، یک نانو ذره غیر سمی و زیست سازگار است. نانو ذره اکسید روی به‌عنوان حامل مواد دارویی، مواد آرایشی و مواد پرکننده در دندان پزشکی استفاده شده است. به‌تازگی یافت شده است که، نانو ذره اکسید روی دارای فعالیت‌های ضد باکتری در برابر پاتوژن های منتقل‌شونده از راه مواد غذایی از جمله *شریشیالکی* / *انترتوکسیژنیک* است (۶). این مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از نانو ذره اکسید روی برای حفظ محصولات کشاورزی و مواد غذایی ممکن است مؤثر باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد باکتریایی نانو ذره اکسید روی و اسید مالیک و در مهار رشد باکتری *شریشیالکی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی است.

مواد و روش‌ها

مواد، محیط کشت و باکتری‌های مورد استفاده

سویه‌های باکتری مورد استفاده در این آزمایش شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1431) و *شریشیالکی* (PTCC1394) بود. باکتری‌های نامبرده از کلکسیون میکروبی ایران تهیه شد. محلول‌های استوک تا زمان مورد استفاده در دمای 80°C - درجه سلسیوس نگهداری شدند. باکتری‌ها در تریپتیکاز سوی آگار (TSA: Merck, Germany) در 37°C رشد داده شدند و تا زمان استفاده در دمای یخچال نگهداری شدند. نانو ذرات اکسید روی (قطر ذرات ۲۰ - ۲۵ نانومتر، خلوص بیش از ۹۹/۹۸٪) (شرکت TECONAN، اسپانیا) خریداری شد. برای

افزودن اسید مالیک و نانو ذرات اکسید روی به

آبمیوه‌ها

به ترتیب ارلن های حاوی ۵۰ میلی لیتر آبمیوه که ۵ میلی مولار و ۸ میلی مولار از نانوذره اکسید روی که حاوی ۰/۲٪ از اسید مالیک است، تهیه شد. سپس به هریک از این ارلن ها به طور جداگانه 10^7 cell/mL باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یا *شریشیالکی* تلقیح گردیدند. سپس ارلن ها در ۵۰ دور در دقیقه در 25°C به مدت ۲۴ ساعت شیک شدند. پس از تلقیح هر ۴ ساعت تا ۲۴ ساعت یک میلی لیتر از ارلن ها نمونه گیری شد و از این نمونه ها سری رقت تهیه گردید و تعداد باکتری ها به روش پلیت کانت آگار تعیین گردید (۱۳). به عنوان شاهد از ارلن های حاوی 10^7 cell/mL باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، و یا *شریشیالکی* بدون نانوذره اکسید روی و اسید مالیک همچنین ارلن های حاوی ۰/۲ درصد اسید مالیک حاوی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و یا *شریشیالکی* مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیزهای آماری

آزمایش های مختلف در سه تکرار انجام شد و اثرات غلظت های متفاوت اکسید روی بر میزان رشد باکتری ها به وسیله ANOVA یک طرفه بررسی شد. درصدهای به دست آمده در تست ANOVA برای تعیین اختلافات معنی دار بین میانگین های گروه ها مقایسه شدند. Hoc tests Post برای مقایسه های چندگانه با درجه اطمینان ۰/۰۵٪ استفاده گردید. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 21, Chicago, IL, USA) انجام گرفت. P values < 0.05 به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

فعالیت ضد باکتری اسید مالیک در محیط جامد

خواص ضد باکتریایی اسید مالیک (۰، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد) با توجه به روش نقطه ای علیه *شریشیالکی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور مجزا اندازه گیری شد. جدول ۱ نتایج هاله عدم رشد غلظت های مختلف از اسید مالیک را نشان می دهد. نتایج نشان داد که غلظت (۰، ۰/۲ و ۰/۵) درصد اسید مالیک در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شریشیالکی* هاله عدم رشد نداشت، ولی غلظت (۱ و ۲) درصد اسید مالیک به ترتیب هاله عدم رشد ($5 \pm 0/1$ و $9 \pm 0/1$) و ($11/5 \pm 0/1$ و $9 \pm 0/1$)

استافیلوکوکوس اورئوس یا *شریشیالکی* قرار گرفتند و اجازه داده شد تا این قطرات خشک شوند. سپس هر پلیت TSYEA آگار در 37°C به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس از هاله عدم رشد در اطراف نمونه برای نشان دادن فعالیت های ضد باکتری برای هر غلظت اسید روی استفاده شد. به عنوان استاندارد در یکی از نقاط مشخص شده در روی پلیت از دیسک آنتی بیوتیکی تتراسیکلین استفاده گردید (۱۰).

تعیین فعالیت مهارى در محیط مایع

ارلن های حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط TSB حاوی (۰، ۱، ۳، ۵ و ۸ mM) از نانو ذرات اکسید روی به همراه ۰/۲٪ از اسید مالیک تهیه گردید. سپس به هریک از ارلن ها به طور جداگانه 10^7 cell/mL باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یا *شریشیالکی* تلقیح گردیدند. سپس ارلن ها در ۵۰ دور در دقیقه در 37°C به مدت ۲۴ ساعت شیک شدند. پس از تلقیح، هر ۲ ساعت ۱ میلی لیتر از ارلن های مورد آزمایش نمونه گیری شد و جذب نوری نمونه ها در ۶۰۰ نانومتر تا دوازده ساعت به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد و یک قرائت در ساعت ۲۴ انجام شد (۱۱). از محیط کشت TSB حاوی اسید مالیک (۰/۲ درصد) به تنهایی و محیط کشت حاوی (۱، ۳، ۵ و ۸ mM) از نانو ذرات اکسید روی همراه با ۰/۲٪ از اسید مالیک به عنوان کنترل استفاده گردید.

تهیه آب هویج

آب هویج با استفاده از دستگاه آبمیوه گیری (Model BP 4512, Vitoria, Spain) گرفته شد. آبمیوه های به دست آمده در دستگاه سانتریفوژ [Avanti™ J-25 Centrifuge (Iso lab germany)] با دور ۱۲۵۰۰ در دمای 4°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس آبمیوه ها صاف شده و داخل بطری ریخته شد و برای استریل کردن در دستگاه اتوکلاو [Presoclave 75 (J.P. Selecta, S.A., Barcelona, Spain)] در دمای 121°C به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند (۱۲).

تعیین pH

pH نمونه های آبمیوه با استفاده از دستگاه pH سنج [Hanna Instruments pH210 (Vernon Hills USA)] اندازه گیری شد که حدود $6/5 \pm 0/3$ بود.

تعیین فعالیت مهارتی در محیط مایع

فعالیت ضد باکتری سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک علیه *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط مایع نیز بررسی شده است.

شکل ۱ اثر تیمار سوسپانسیون اکسید روی همراه با اسید مالیک بر رشد *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در TSB برای در 37°C را نشان می‌دهد. تیمار سوسپانسیون (۰، ۱، ۳، ۵ و ۸) میلی مولار از اکسید روی در ۰/۲٪ اسید مالیک اثر مهارتی قابل توجهی در رشد *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در طول ۱۲ ساعت انکوباسیون در مقایسه با شاهد منفی نشان می‌دهد. نتایج نشان داد اسید مالیک ۰/۲٪ دارای اثر مهارتی است و باعث ۳۷/۴۳ درصد کاهش رشد در باکتری *اشریشیاکلی* شده است و اضافه شدن نانوذره اکسید روی به اسید مالیک باعث افزایش فعالیت اثر مهارتی اسید مالیک شده است. در میان چهار غلظت نانوذره اکسید روی، تیمار ۸ میلی مولار از نانوذره اکسید روی در مهار رشد *اشریشیاکلی* مؤثرتر بود و تقریباً به طور کامل در طول ۱۲ ساعت رشد *اشریشیاکلی* را مهار کرد. نتایج نشان داد که غلظت (۰، ۱، ۳ و ۵ mM) نانوذره اکسید روی اثر مهارتی در مقابل *اشریشیاکلی* در طول ۱۲ ساعت در TSB برای داشت و به ترتیب باعث (۳۷/۴۳، ۴۱/۶۴، ۴۵/۴۱ و ۹۶/۵۲) درصد کاهش رشد در باکتری *اشریشیاکلی* شدند. همچنین نتایج نشان داد تیمار سوسپانسیون (۰، ۱، ۳، ۵ و ۸ mM) از نانوذره اکسید روی در ۰/۲٪ اسید مالیک اثر مهارتی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در طول ۱۲ ساعت در TSB برای داشت و به ترتیب باعث (۴۸/۶۲، ۴۸/۸۹، ۵۶/۸۹ و ۵۷/۵۸) درصد کاهش رشد در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شدند.

با توجه به نتایج، سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک فعالیت ضد باکتری قوی تری علیه *اشریشیاکلی* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* در مدت ۱۲ ساعت نشان می‌دهد. این داده‌ها همچنین نشان می‌دهد که فعالیت ضد باکتری سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک، وابسته به غلظت نانوذره اکسید روی است که مؤید این است که نانوذره اکسید روی باعث افزایش فعالیت ضد میکروبی اسید مالیک شده است که پیش‌تر با استفاده از تست انتشار در آگار مورد تأیید قرار گرفته است.

میلی‌متر در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* ایجاد کرده بود. نتایج نشان داد با افزایش غلظت اسید مالیک قطر هاله عدم رشد افزایش می‌یابد همچنین اسید مالیک اثر مهارتی بیشتری بر روی باکتری *اشریشیاکلی* نسبت به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت.

فعالیت ضد باکتری سوسپانسیون نانوذره اکسید روی

همراه با اسید مالیک

جدول ۱ نتایج هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف از سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که غلظت سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* هاله عدم رشد داشت و با افزایش غلظت نانوذره اکسید روی هاله عدم رشد افزایش یافت که این نتایج مؤید این است که نانوذره اکسید روی باعث افزایش فعالیت ضد میکروبی اسید مالیک شده است. سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک اثر مهارتی بیشتری بر روی باکتری *اشریشیاکلی* نسبت به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت.

جدول ۱: قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف اسید مالیک و سوسپانسیون اسید مالیک و غلظت‌های مختلف از نانوذره اکسید روی

اشریشیاکلی	استافیلوکوکوس اورئوس	غلظت‌های اسید مالیک
میلی‌متر	میلی‌متر	و نانوپار تیکل ZnO
-	-	Acid%0.2
کاهش رشد	کاهش رشد	Acid%0.5
۰/۱±۹	۰/۱±۵	Acid%1
۰/۱±۹	۰/۲±۵	Acid + 1mM %1 ZnO
۰/۳±۹	۰/۲±۵	Acid + 3mM %1 ZnO
۰/۲±۱۰	۰/۲±۹	Acid + 5mM %1 ZnO
۰/۱±۱۰	۰/۲±۱۱	Acid + 8mM %1 ZnO
۰/۲±۹	۰/۱±۹	Acid + 1mM %2 ZnO
۰/۱±۹	۰/۱±۱۰/۵	Acid%2
۰/۲±۱۰	۰/۲±۱۱	Acid + 1mM %2 ZnO
۰/۱±۱۱/۵	۰/۳±۱۱	Acid + 3mM %2 ZnO
۱۱±۰/۱	۳۴/۵±۰/۰۵	Acid + 5mM %2 ZnO
		Acid + 8mM %2 ZnO
		تتراسیکلین

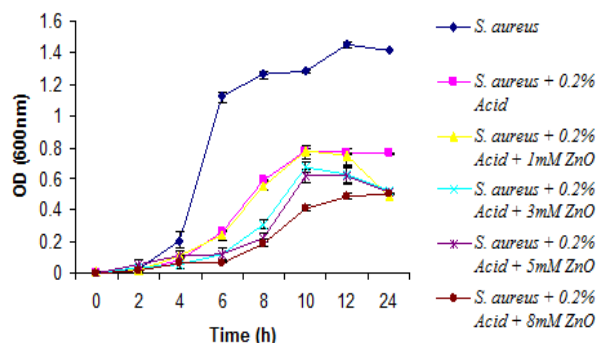
بدون منطقه مهار: -

Gr: کاهش رشد

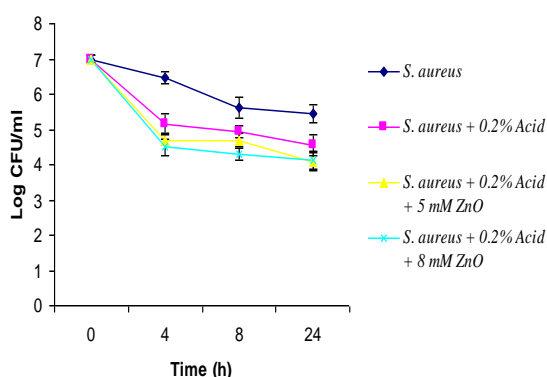
روی با اسید مالیک به طور قابل توجهی می تواند باعث مهار یا کاهش *اشریشیاکلی* در آب هویج شود.

شکل ۲ نشان می دهد که اثر ضد باکتری سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک بر روی *اشریشیاکلی* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* در آب هویج قوی تر است. این یافته ها بیان می کنند اثر مهار سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک در آب هویج مشابه با اثر مهار سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک به دست آمده در آزمایش ۱ (شکل ۱) است.

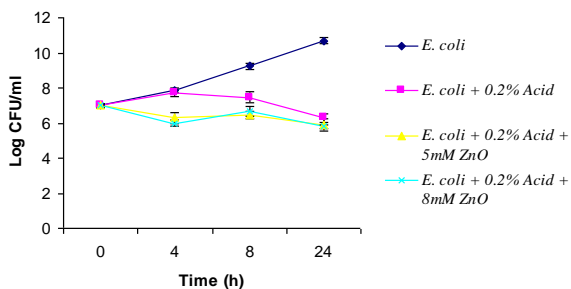
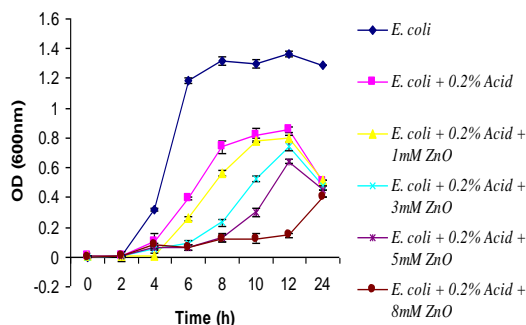
الف



ب



ب



شکل ۲: اثر سوسپانسیون حاوی ۰.۲٪ اسید مالیک و غلظت های مختلف (۵، ۸ میلی مولار) نانوذره اکسید روی در رشد (الف) *استافیلوکوکوس اورئوس* و (ب) *اشریشیاکلی* در آب هویج در ۲۵°C

بحث:

در فن آوری مواد غذایی، در هنگام تعیین استراتژی های فرآوری مواد غذایی مناسب، ثابت ماندن کیفیت محصولات، همانند رنگ، عطر و طعم و بافت مواد غذایی علاوه بر عدم رشد میکروبی باید در نظر گرفته شود (۱۴). در این مطالعه، تیمار سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی باعث افزایش اثر مهار اسید مالیک شد و در کاهش رشد باکتری *اشریشیاکلی* و

شکل ۱: اثر سوسپانسیون حاوی ۰.۲٪ اسید مالیک و غلظت های مختلف نانوذره اکسید روی (۰، ۱، ۳، ۵، ۸ میلی مولار) بر رشد (الف) *استافیلوکوکوس اورئوس* و (ب) *اشریشیاکلی* در TSB برای در ۳۷°C

استفاده از سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک در نگهداری مواد غذایی

دو غلظت (۵، ۸ mM) سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک به عنوان تیمار ضد میکروبی در نمونه های آب هویج مورد استفاده قرار گرفت.

شکل ۲ اثر سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک در برابر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* در آب هویج در طی ذخیره سازی ۲۴ ساعت در ۲۵°C را نشان می دهد. نتایج نشان داد تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از افت اولیه از ۷ CFU/mL، پس از ۲۴ ساعت، در کنترل به ۵/۴۵ CFU/mL کاهش یافت، در حالی که تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه آب هویج تحت تیمار با (۵، ۸ mM) سوسپانسیون نانوذره اکسید روی با اسید مالیک به ترتیب به ۴/۱ و ۴/۱۱ CFU/mL کاهش یافت. همچنین نتایج نشان داد که نانو ذرات سوسپانسیون اکسید

در حال حاضر، استفاده از نانو ذرات در سلامت مواد غذایی رو به افزایش است، برای مثال، اکسید روی کوانتومی به عنوان تیمار ضد میکروبی در نمونه سفیده تخم مرغ مایع استفاده شده است. نتایج نشان داده است با افزایش غلظت اکسید روی کوانتومی به طور قابل توجهی رشد لیستریا منوسیترنوز و سالمونلا انتریتیدیس در سفیده تخم مرغ مایع کاهش یافته است (۱۹). اثرات مهاری مشابه برای نانو ذرات اکسید روی بر کاهش استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی در نمونه های شیر مشاهده شده است (۲۰). مکانیسم های دقیقی که به وسیله آن نانو مواد رشد میکروبی را مهار می کنند، کاملاً درک نشده است. تحقیق و پژوهش های متعدد مکانیسم های احتمالی واکنش و فعل و انفعال های نانو مواد با ماکرو مولکول های بیولوژیکی را این طور پیشنهاد می کنند. به طور کلی اعتقاد بر این است که نانو مواد یون هایی را آزاد می کنند که با گروه تیول (-SH) پروتئین های موجود بر سطح سلول باکتری ها واکنش می دهند. این قبیل پروتئین ها از غشاء سلولی باکتری به سمت بیرون برآمدگی داشته و موجب انتقال مواد غذایی از دیواره سلول می شوند. نانو مواد این پروتئین ها را غیرفعال کرده، نفوذپذیری غشاء را کاهش داده و سرانجام باعث مرگ سلولی می شود (۲۱، ۲۲). نانو مواد ممکن است بتوانند چسبندگی میکروبی و تشکیل بیوفیلم را کاهش دهند. نانو ذرات اکسید روی باعث تخریب چربی و پروتئین غشای سلولی باکتری می شوند، و در نتیجه باعث نشت محتویات داخل سلولی و در نهایت مرگ سلول های باکتریایی می شوند (۲۳، ۲۴). علاوه بر این، تولید پراکسید هیدروژن و یون Zn^{2+} به عنوان مکانیسم کلیدی اثرات ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی پیشنهاد شده است (۲۴).

تقدیر و تشکر

این پروژه توسط دانشگاه پیام نور حمایت شده است.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

استافیلوکوکوس اورئوس مؤثر بودند. نتایج نشان داد که سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی همراه اسید مالیک اثر مهاری بیشتری در محیط مایع نسبت به محیط جامد در برابر همه سویه ها داشت. چون در محیط جامد ماده آلی (آگار) بیشتری وجود دارد بنابراین اثر مهاری مواد ضد میکروبی نسبت به محیط مایع کمتر است. این داده ها نشان می دهد که فعالیت ضد میکروبی سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی حاوی اسید مالیک وابسته به غلظت نانوذره اکسید روی است که بیشتر توسط آزمون انتشار در آگار تأیید شده است، همچنین نتایج داده ها در کشت مایع نشان داد که غلظت ۵ و ۸ میلی مولار نانوذره اکسید روی بیشترین اثر مهاری در تمام سویه های مورد آزمایش دارد در نتیجه غلظت ۵ میلی مولار و ۸ میلی مولار نانوذره اکسید روی برای مطالعات بیشتر در آب هویج انتخاب شدند (شکل ۱). شکل ۲ کاهش رشد تمام سویه های مورد آزمایش تیمار شده با غلظت های مختلف (۰، ۵، ۸ mM) سوسپانسیون نانوذره اکسید روی حاوی اسید مالیک را نشان می دهد. نانوذرات اکسید روی در کاهش تعداد اولیه همه سویه ها در آب هویج مؤثر بودند. همچنین نتایج نشان داد که اضافه کردن نانوذرات اکسید روی به اسید مالیک باعث افزایش فعالیت ضد میکروبی شده است و باعث کاهش رشد همه سویه های مورد آزمایش در آب هویج شدند، که این نتایج در توافق با نتایج به دست آمده در کشت مایع است.

Eblen و Juneja در سال ۱۹۹۹ اثرات سینرژیک مشابه از ترکیب حرارت ملایم با اسید در کاهش باکتری های پاتوژن در نمونه های مواد غذایی گزارش کردند (۱۵). Anellis و همکاران (۱۹۵۴) نشان دادند که pH پایین اثر حرارت بر غیرفعال سازی سالمونلا در تخم مرغ را افزایش داده است (۱۶). همچنین Raybaudi Massilia و همکاران در سال ۲۰۰۹ فعالیت ضد میکروبی اسید مالیک را علیه باکتری لیستریا منوسیترنوز، سالمونلا انتریتیدیس و اشریشیاکلی در آب میوه سیب، گلابی و خربزه را نشان دادند (۱۷).

اثر باکتروسیدال اسیدهای آلی مثل اسید استیک و اسید مالیک به علت کاهش pH است. این کاهش pH از طریق نفوذ مولکول اسید آلی کامل از غشا سیتوپلاسمی درون سلول ایجاد می شود که این امر باعث کاهش رشد و کاهش فعالیت متابولیک میکروارگانیسم ها می شود (۱۸).

References

- Okouchi S, Murata R, Sugita H, Moriyoshi Y and Maeda N. Calorimetric evaluation of the antimicrobial activities of calcined dolomite. *J Antibact Antifungal Agents* 1995; 26: 109–114.
- Wilczynski M. Anti-microbial porcelain enamels. *Ceram Eng Sci Proc* 2000; 21: 81–83.
- Cherrington C A, Hinton M, Mead G C and Chopra I. Organic acids: Chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Adv Microb Physiol* 1991; 32:87–108.
- Alakomi H L, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K and Helander I M. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2001–2005.
- Bell M F, Marshall RT and Anderson M E. Microbiological and sensory tests of beef treated with acetic and formic acids. *J Food Prot* 1986; 49: 207–210.
- Stoimenov P K, Klinger R. L, Marchin G L, and Klabunde K J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* 2002; 18: 6679–6686.
- Lerich V, Chassaing D and Carpentier B. Behavior of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *Intrnational J Food Microbiol* 1999; 51: 169–182.
- Bergej S. *Manual of systematic Bacteriology* 2, William and Wilkins. 1989 London.
- Okouchi S, Murata R, Sugita H, Moriyoshi Y and Maeda N. Calorimetric evaluation of the antimicrobial activities of calcined dolomite. *J Antibact Antifungal Agents* 1995; 26: 109–114.
- Mirhosseini M and Emtiazi G. Optimisation of Enterocin A Production on a Whey-Based Substrate. *World Appl Sci J* 2011; 14: 1493–1499. [in persian]
- Nicole J, Binata R, Koodali T and Ranjit C. Antibacterial activity of ZnO nano particle suspensions on abroad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 279: 71–76.
- Raybaudi-Massilia R M, Mosqueda-Melgar J, Martin-Belloso O. Antimicrobial activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple, pear and melon juices. *Food Control* 2009; 20: 105–112.
- Jin T, Sun D, Su JY, Zhang H and Sue HJ. Antimicrobial efficacy of Zinc Oxide Quantum Dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Sci* 2009; 74: 46–52.
- Leistner L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol* 2000; 55: 181–186.
- Juneja VK and Eblen BS. Predictive thermal inactivation model for *Listeria monocytogenes* with temperature, pH, NaCl, and sodium pyrophosphate as controlling factors. *J Food Prot* 1999; 62: 986–993.
- Anellis A, Lubas J and Rayman MM. Heat resistance in liquid eggs of some strains of the genus *Salmonella*. *Food Res* 1954; 19: 377–395.
- Raybaudi-Massilia R, Mosqueda-Melgar J, and Martin-Belloso O. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in fruit juices. *Journal of Food Protection* 2006; 69: 1579–1586.
- Booth I R. Regulation of cytoplasmic pH of bacteria. *Microbiol Review* 1985; 49: 359–378.
- Jin T, Sun D, Su J Y and Zhang H. Antimicrobial efficacy of Zinc Oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *E. coli* O157:H7. *J Food Sci* 2009; 74: 46 – 52.
- Mirhosseini M and Firouzabadi F. Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens. *Inter J Dairy Technol* 2013; 66: 291–295. [in persian]
- Feng Q L, Wu J. "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*." *J Biomed Mater Res* 2000; 52(4):662–668.
- Stoimenov P K, Klinger R L, Marchin G L and Klabunde K J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* 2002; 18: 6679–6686.
- Huang Z, Zheng X, Yan D and Yin G. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir* 2008; 24: 4140–4144.
- Liu Y, He L, Mustapha A and Li H. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* 2009; 107 1193–1201.