Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Antimicrobial activity of poly lactic acid films incorporated with *Trachyspermum ammi* essential oil and ethanolic extract of propolis on the growth of some bacterial foodborne pathogens

Ali Khanjari[1], Amir Jahanbakhsh[2], Peyman Rajaie[2], Samira Fayazfar[1], Afshin Akhondzadeh Basti[1], Hossein Esmaeili[3], Fatemeh Gholami[4], Zahra Sharifikhah[5]

1. Department of Food hygiene, Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Varamin Branch, Varamin, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
4. Department of Poultry disease, Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
5. Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Savadkooh Branch, Savadkooh, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/04/10
Accepted: 2016/06/21
Available online: 2016/10/17

Article Subject:
Food Microbiology

IJMM 2017; 10(5): 44-51

Corresponding author at:

Dr. Ali Khanjari

Department of Food hygiene, Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Tel: 0982161117023

Email:
khanjari@ut.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Using active antimicrobial packaging reduce the risks of growth of pathogenic or spoilage microorganisms in foods. In this study, antimicrobial activity of poly lactic acid (PLA) films containing different concentrations (0, 0.5, 1 and 1.5%) of *Trachyspermum ammi* essential oil and ethanolic extract of propolis (0, 1 and 2%) was evaluated against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli O157:H7* and *vibrio parahaemolyticus* by using disk diffusion assay.

Materials and Methods: Circular discs of poly lactic acid films incorporated by essential oil and ethanolic extract of propolis, prepared by casting method on glass petri dishes, were placed on Muller-Hinton agar plates that previously inoculated by tested bacteria. Diameters of inhibition zones were measured after 24 h incubation of plates at 35° C, by using Digital Caliper and Digimizer software.

Results: Result of this study showed that the inhibition zone was increased with increasing concentration of essential oil for all tested bacteria. Also, gram positive bacteria were more sensitive to the poly lactic acid films containing essential oil than gram negative bacteria. The results revealed that *L. monocytogenes* was the most sensitive bacteria against films containing *Trachyspermum ammi* essential oil alone or in combination by ethanolic extract of propolis. Also, poly lactic acid films containing ethanolic extract of propolis showed no inhibitory effects against all tested bacteria.

Conclusions: Poly lactic acid films containing *Trachyspermum ammi* essential oil have a high potential for antimicrobial food packaging applications to enhance the safety of food products.

KeyWords: Disk Diffusion, Antimicrobial, Poly lactic acid, Essential oil, Propolis

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Khanjari A, Jahanbakhsh A, Rajaie P, Fayazfar S, Akhondzadeh Basti A, Esmaeili H, et al. Antimicrobial activity of poly lactic acid films incorporated with *Trachyspermum ammi* essential oil and ethanolic extract of propolis on the growth of some bacterial foodborne pathogens. Iran J Med Microbiol. 2017; 10 (6): 44-51

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۶ – بهمن و اسفند ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی غلظت‌های مختلف اسانس زنیان و عصاره اتانولی برموم بر رشد برخی از باکتری‌های بیماری زای غذا زاد

علی خنجری[۱]، امیر جهانبخش[۲]، پیمان رجایی[۲]، سمیرا فیاض فر[۱]، افشین آخوندزاده بستی[۱]، حسین اسمعیلی[۳]، فاطمه غلامی[۴]، زهرا شریفی خواه[۵]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ورامین، ایران
۳. گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴. گروه بهداشت و بیماری های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۵. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سوادکوه، سوادکوه، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۲۲

پذیرش:۱۳۹۵/۰۴/۰۱

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۷/۲۶

موضوع:

میکروبیولوژی مواد غذایی

IJMM 1395; 10(5): 44-51

نویسنده مسئول:

دکتر علی خنجری

گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۶۱۱۱۷۰۲۳

پست الکترونیک:

khanjari@ut.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: بسته‌بندی‌های ضد میکروبی فعال خطرات رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و مسبب فساد را در مواد غذایی کاهش می دهند. در این مطالعه تاثیر فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی غلظت‌های مختلف اسانس زنیان (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) و عصاره اتانولی بر موم (۰، ۱ و ۲ درصد) بر *لیستریا منوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و *اشریشیاکلی* به روش انتشار دیسک موردمطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار: دیسک‌های مدوری (۱۰ میلی‌متری) که از فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی اسانس زنیان و عصاره اتانولی برموم، که با تکنیک قالب گیری بر روی پلیت های شیشه‌ای تهیه‌شده بود، بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح شده با باکتری‌های مختلف قرار داده شد. قطر هاله عدم رشد بعد از ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری پلیت ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با استفاده از کولیس دیجیتال و نرم‌افزار Digimizer اندازه گیری شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت اسانس برای تمام باکتری ها افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). همچنین باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی به فیلم پلی لاکتیک اسید حاوی اسانس حساسیت بالاتری داشتند. از بین باکتری‌های موردمطالعه *لیستریا منوسیتوژنز* بالاترین حساسیت را نسبت به فیلم‌های حاوی اسانس زنیان و عصاره اتانولی برموم داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی عصاره اتانولی برموم هیچ‌گونه اثر مهاری بر میکروارگانیسم‌های موردمطالعه نداشتند ($p>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: فیلم‌های پلی لاکتیک اسیدحاوی اسانس زنیان پتانسیل بالایی برای استفاده در بسته‌بندی‌های ضد میکروبی فعال به‌منظور افزایش ایمنی مواد غذایی را دارا هستند.

کلمات کلیدی: انتشار دیسک، ضد میکروبی، پلی لاکتیک اسید، اسانس، برموم

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

مقدمه

مصرف مواد غذایی آلوده به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌تواند موجب ایجاد بیماری در مصرف‌کنندگان گردد (۱). به‌منظور بالا بردن حاشیه امنیت و اطمینان از سلامت و کیفیت مواد غذایی به‌طورمعمول از نگهدارنده های مختلف (شیمیایی یا طبیعی) استفاده می‌شود. از آنجایی که استفاده از نگهدارنده های شیمیایی ممکن است موجب ایجاد اثرات مضر در مصرف‌کنندگان شود، لذا علاقه بسیاری جهت جایگزینی آن‌ها با انواع نگهدارنده‌های طبیعی وجود دارد (۲).

با توجه به امکان غیرفعال شدن نگهدارنده ها به دلیل فعل و انفعالات شیمیایی با ترکیبات مواد غذایی، استفاده از فیلم‌های بسته‌بندی که شامل عوامل ضد میکروبی هستند بهتر از افزودن مستقیم این مواد به غذاها می‌باشد. همچنین با توجه به

وجود سطوح بالای آلودگی در سطح مواد غذایی استفاده از فیلم‌های ضد میکروبی می‌تواند مفید باشد (۳).

بسته‌بندی فعال نوعی بسته‌بندی می‌باشد که با ایجاد تغییرات شیمیایی یا بیولوژیک در محتویات یا فضای داخل بسته‌بندی مدت‌زمان نگهداری ماده غذایی را افزایش می‌دهد (۴). از نگهدارنده های طبیعی که قابلیت استفاده در فیلم‌های ضد میکروبی رادارند می‌توان به اسانس‌ها اشاره نمود (۵،۴). اسانس‌ها درواقع مایعات روغنی بوداری هستند که از اجزای مختلف گیاهان (گل، شاخه، غنچه، برگ، جوانه، پوست، ریشه، میوه، دانه و...) با روش‌های مختلف به دست می‌آیند (۶). گیاه زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi*، گیاهی است یک‌ساله، علفی، جزو خانواده جعفریان و از گیاهان دارویی با اهمیت می‌باشد. این گیاه دارای اثرات ضد باکتریایی، ضدویروسی، ضدالتهابی، ضد قارچی، تسکین‌دهنده درد و آرام‌بخش می‌باشد (۱۰-۷).

برموم ماده رزینی چسبنده‌ای است که توسط زنبورها از جوانه برگ‌ها و پوست درختان مختلف جمع‌آوری می‌شود. برموم حاوی مقادیر بسیار بالایی از فلاونوییدها و اسیدهای فنلیک، واکس‌ها، اسانس‌های روغنی، پولن و سایر ترکیبات ارگانیک می‌باشد. همچنین اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و التیام زخم آن به اثبات رسیده است (۱۱، ۸).

به‌منظور تولید بسته‌بندی‌های فعال بر پایه فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر می‌توان از پلی لاکتیک اسید استفاده کرد. پلی لاکتیک اسید ماده‌ای است که عموماً ایمن شناخته‌شده (Generally recognized as safe, GRAS) و از مونومرهای لاکتیک اسید ایجاد می‌شود. تاکنون از آن به‌منظور بسته‌بندی ماست و آب‌پرتقال استفاده‌شده است (۱۲،۴). هدف از این مطالعه ارزیابی اثر فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی غلظت‌های مختلف اسانس زنیان و عصاره اتانولی بر موم بر رشد *لیستریا منوسیتوژنز*، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بود.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه و اسانس گیری

زنیان از شرکت پاکان بذر اصفهان در سال ۱۳۹۴ تهیه گردید. اسانس گیری به روش تقطیر با آب به‌وسیله دستگاه کلونجر آپاراتوس صورت گرفت. آنالیز ترکیبات اسانس نیز توسط دستگاه گازکروماتوگراف مجهز به طیف‌سنجی جرمی (Thermoquest 2000, Finnigan Mass Lab Group, Manchester, U.K) انجام شد (۱۳،۱).

تهیه عصاره اتانولی برموم

میزان ۳۰ گرم برموم که از یکی از زنبوداری های متعلق به دانشگاه تهران تهییه شده بود در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول حل گردید و بر روی‌هم زن مغناطیسی در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. در ادامه در دمای ۱۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ عصاره صاف گردید (۱۴).

تهیه فیلم پلی لاکتیک اسید (PLA)

در رابطه با هر حالت، برای تهیه فیلم پلی لاکتیک اسید میزان ۱ گرم گرانول پلی‌لاکتیک اسید به ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه گردید مخلوط حاصل به مدت ۸ ساعت بر روی همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس غلظت‌های موردنظر اسانس زنیان (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) و عصاره اتانولی برموم (۰، ۱ و ۲ درصد) اضافه گردید. مخلوط حاصل ۲۰ دقیقه دیگر بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. در پایان با دستگاه هموژنایز (Wise 15D, Korea) به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه یکنواخت گردید. سپس محلول در قالب‌های (پلیت) شیشه‌ای ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق زیر هود شیمیایی نگهداری گردید بعد از تبخیر حلال، فیلم‌های تهیه‌شده از قالب‌ها جدا و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد تا باقی‌مانده حلال که ممکن بود نقش پلاستیسایزری داشته باشد به‌طور کامل حذف شود. بعد از تهیه فیلم‌های پلی لاکتیک اسید با غلظت‌های مختلف اسانس زنیان و عصاره اتانولی برموم دیسک‌هایی به قطر ۱۰ میلی‌متر پانچ شد (۱۵،۱۱،۴).

میکروارگانیسم‌های موردمطالعه

میکروارگانیسم‌های موردمطالعه شامل *لیستریا منوسیتوژنز* (ATCC 19118)، *اشریشیاکلی* (ATCC35218)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) و *ویبریوپاراهمولیتیکوس* (ATCC 43996) بود. کشت لیوفیلیزه این میکروارگانیسم‌ها از گروه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری

برای تهیه میزان تلقیح باکتری‌های مورد مطالعه کشت لیوفیلیزه میکروارگانیسم‌ها به لوله در پیچ‌دار استریل حاوی محیط آبگوشت قلب و مغز (BHI broth) منتقل شد (در رابطه با *ویبریو پاراهمولیتیکوس* به محیط ۱ درصد کلرید سدیم نیز اضافه گردید) و دو بار متوالی در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شد (زمان گرمخانه گذاری *ویبریوپاراهمولیتیکوس* ۶ ساعت بود). سپس از کشت دوم مقادیر مختلفی به لوله‌های کووت حاوی ۴ میلی‌لیتر آبگوشت قلب و مغز استریل اضافه شد تا جایی که لوله کووت جذب نوری ۰/۱ را در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Milton Ray Company, USA) نشان داد. شمارش تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر محیط موجود در لوله کووت با جذب نوری ۰/۱ نیز با روش رقت سازی سریالی و کشت بر روی محیط BHI Agar صورت گرفت و میزان باکتری در هر میلی‌لیتر کووت به دست آمد (۱۶، ۱).

تعیین فعالیت ضد میکروبی

۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی که حاوی ۱×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر بود، بر روی محیط مولرهینتون آگار تلقیح و کشت داده شد. بعد از انجام کشت‌های میکروبی دیسک‌های مدوری (۱۰ میلی‌متری) که از فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی غلظت‌های مختلف اسانس زنیان و عصاره اتانولی بر موم در مرکز پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار قرار داده و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند سپس ناحیه ممانعت از رشد به‌صورت هاله شفاف اطراف فیلم‌ها با کولیس دیجیتال برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (۱۷، ۱۵، ۱۲)، همچنین از پلیت ها پس از گرمخانه گذاری با دوربین دیجیتال عکس‌برداری صورت گرفت و سپس با برنامه (MedCalc Software, Ostend, Belgium) V Digimizer 4.1.1.0 قطر هاله عدم رشد بر اساس میلی‌متر اندازه‌گیری گردید.

آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc, USA) با آزمون واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی صورت گرفت.

یافته‌ها

آنالیز اسانس زنیان

با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی ۱۴ ترکیب مختلف در اسانس زنیان شناسایی شد که ۹۹/۰۹ درصد آن را شامل می‌شدند. بر این اساس بیشترین مقادیر تشکیل‌دهنده اسانس شامل تیمول (۷۰/۹۵ درصد)، سیمن (۱۸/۰۹ درصد)، گاما ترپینن (۸ درصد) بود. آنالیز کامل ترکیبات اسانس در جدول ۱ نشان داده‌شده است.

جدول ۱: اجزای تشکیل‌دهنده اسانس زنیان به‌دست‌آمده به روش تقطیر با آب

ردیف	نام ماده	میزان (برحسب٪)	
۱	تیمول	۷۰/۹۵	۲۲/۹۵
۲	سیمن	۱۸/۰۹	۹/۸۵۵
۳	گاما ترپینن	۸/۰۰	۱۱/۲۷۸
۴	۲-بتا ترپینن	۰/۵۹	۷/۸۴۲
۵	کاروول	۰/۲۴	۲۳/۱۰۴
۶	۵ دی متیل-۲-اتیل فنل, ۴	۰/۲۲	۴۶/۵۱۱
۷	بتا فلاندرن	۰/۱۸	۹/۹۵۳
۸	بتا میرسن	۰/۱۷	۸/۴۲۸
۹	آلفا فلاندرن	۰/۱۴	۶/۱۲۷
۱۰	کارواکرول	۰/۱۲	۴۵/۲۰۷
۱۱	آلفاترپینول	۰/۱۲	۱۷/۳۷۹
۱۲	۴-ترپینول	۰/۱۱	۱۶/۵۳۶
۱۳	آلفاپینن	۰/۰۹	۶/۳۴۸
۱۴	آلفاترپینن	۰/۰۷	۹/۴۲۴
	جمع	۹۹/۰۹	

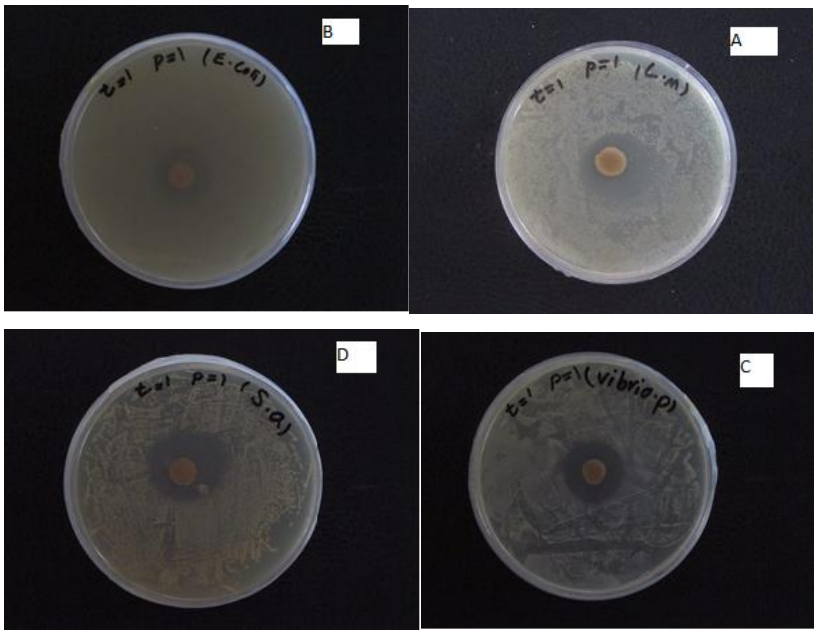
نتایج تعیین فعالیت ضد میکروبی

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت اسانس زنیان به‌صورت معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) اثر ضد میکروبی فیلم‌ها افزایش پیدا کرد، اما با افزودن عصاره اتانولی برموم به‌تنهایی هیچ‌گونه اثر ضد میکروبی مشاهده نگردید ($p > ۰/۰۵$)، همچنین فیلم پلی لاکتیک اسید فاقد عصاره اتانولی بره موم و اسانس زنیان هیچ‌گونه اثر ضد میکروبی برعلیه میکروارگانیسم‌های موردمطالعه نداشت ($p>۰/۰۵$). استفاده هم‌زمان عصاره اتانولی برموم با اسانس زنیان در رابطه با میکروارگانیسم‌های موردمطالعه اثر سینرژیستی نشان داد (تصویر ۱). همچنین در رابطه با فیلم PLA حاوی ۰/۵ درصد اسانس زنیان تنها هاله عدم رشد در رابطه با *لیستریا منوسیتوژنز* ایجاد گردید (جدول ۲).

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) اطراف فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی غلظت‌های مختلف اسانس زنیان و عصاره اتانولی برموم در رابطه با باکتری‌های موردمطالعه

غلظت اسانس (٪)	غلظت بر موم (٪)	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیاکلی	ویبریو پاراهمولیتیکوس	لیستریا منوسیتوژنز
۰	۰	۰^{a}	۰^{a}	۰^{a}	۰^{a}
۰/۵	۰	۰^{aB}	۰^{aB}	۰^{aB}	۱۱/۲۳±۰/۲۵^{bA}
۱	۰	۱۷/۰۰ ±۱/۰۵^{cA}	۱۱/۸۷±۰/۶۷^{bB}	۱۴/۴۰±۱/۵۰ ^{cC}	۱۹/۵۷±۰/۰۶^{cD}
۱/۵	۰	۳۳/۹۰± ۰/۷۸^{eA}	۳۰/۱۷±۰/۲۵^{fB}	۲۷/۸۷±۰/۳۲^{eC}	۳۷/۶۳±۰/۴۵^{Ed}
۰	۱	۰^{a}	۰^{a}	۰^{a}	۰^{a}
۰/۵	۱	۱۰/۸۳±۱/۰۴^{bA}	۰^{aB}	۰^{aB}	۱۱/۳۷±۰/۵۵^{bA}
۱	۱	۲۴/۴۷±۰/۴۶^{dA}	۱۸/۶۷±۰/۷۱^{cB}	۱۹/۷۰±۰/۶۰^{dB}	۲۴/۹۷±۰/۸۰^{dA}
۱/۵	۱	۳۴/۴۰±۰/۳۰^{efA}	۳۱/۲۳±۰/۸۶^{fB}	۲۷/۸۰±۰/۷۵^{eC}	۳۹/۰۳±۰/۶۰^{efD}
۰	۲	۰^{a}	۰^{a}	۰^{a}	۰^{a}
۰/۵	۲	۱۲/۱۳±۰/۱۱^{bA}	۱۱/۷۰± ۰/۵۰^{bB}	۱۱/۱۷±۰/۲۵^{bB}	۱۲/۳۰±۰/۹۰^{bA}
۱	۲	۲۵/۴۰±۱/۰۸^{dA}	۲۳/۶۷±۰/۵۵^{eB}	۲۱/۳۷±۰/۴۲^{dC}	۲۸/۱۷±۰/۳۲^{fD}
۱/۵	۲	۳۶/۵۸±۰/۵۷^{fA}	۳۲/۹۰±۰/۸۷^{gB}	۳۳/۰۷±۰/۶۵^{fB}	۴۰/۹۹±۱/۶۶^{gC}

- حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت در ستون‌ها می‌باشد.
- حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده تفاوت در ردیف‌ها می‌باشد.



تصویر ۱- هاله عدم رشد اطراف باکتری‌های موردمطالعه در غلظت ۱ درصد اسانس زنیان و ۱ درصد عصاره اتانولی برموم اضافه‌شده به فیلم پلی لاکتیک اسید (A. *لیستریا منوسیتوژنز* B. *اشریشیاکلی* C. *ویبریوپاراهمولیتیکوس* D. *استافیلوکوکوس اورئوس*)

نتایج این مطالعه نشان داد که فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی غلظت یک درصد و بالاتر اسانس زنیان به‌صورت معنی‌داری توانایی ایجاد هاله عدم رشد در رابطه با تمامی میکروارگانیسم‌های موردمطالعه را داشت ($p < ۰/۰۵$). بیشترین هاله عدم رشد برای تمامی میکروارگانیسم‌های موردمطالعه در رابطه با فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی ۱/۵ درصد اسانس زنیان و ۲ درصد عصاره اتانولی بره موم مشاهده گردید. همچنین بیشترین هاله عدم رشد در رابطه با *لیستریا منوسیتوژنز* به قطر ۴۰/۹۹ میلی‌متر مشاهده گردید و مشخص گردید *لیستریا منوسیتوژنز* حساس‌ترین باکتری به فیلم ضد میکروبی حاوی اسانس زنیان بود.

بحث

اساس برخی از بسته‌بندی‌های فعال، استفاده از فیلم‌ها به همراه مواد ضد میکروبی است که باعث محدود کردن یا کاهش رشد میکروارگانیسم‌ها در سطح مواد غذایی می‌شود. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از عوامل ضد میکروبی به همراه فیلم‌های بسته‌بندی مختلف بر روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مؤثر است (۱۸، ۱۲، ۴).

در مطالعه Ashrafi و همکاران (۲۰۱۳) بیشترین ترکیبات اسانس زنیان به ترتیب شامل تیمول (۴۵ درصد)، پاراسیمن (۲۵ درصد) و گاما ترپینین (۱۸ درصد) بود (۷). همچنین آنالیز اسانس زنیان مورداستفاده در مطالعه Mahboubi و همکاران نشان داد بیشترین ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس شامل تیمول (۴۵/۹ درصد)، گاما ترپینین (۲۰/۶ درصد) و او-سیمن (۱۹ درصد) بود (۱۰). درحالی‌که بیشترین ترکیبات موجود در اسانس مورداستفاده در این مطالعه شامل تیمول (۷۰/۹۵ درصد)، سیمن (۱۸/۰۹ درصد) و گاما ترپینن (۸ درصد) است. از دلایل تفاوت در ترکیب شیمیایی اسانس‌ها می‌توان به تفاوت در عواملی مانند گونه گیاه، سن گیاه، بخش مورداستفاده گیاه جهت اسانس گیری، منطقه جغرافیایی رشد گیاه، نوع خاک، شرایط آب و هوایی، زمان برداشت، نحوه اسانس گیری و ... اشاره نمود (۱۹، ۶). غنی بودن اسانس از تیمول به‌عنوان یک ترکیب فنلی می‌تواند دلیل اصلی اثر ضد میکروبی قوی اسانس باشد.

Erdohan و همکاران (۲۰۱۳) اثر فیلم PLA حاوی غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ زیتون را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* موردمطالعه قراردادند نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که مشابه مطالعه ما فیلم پلی لاکتیک اسید به‌تنهایی هیچ‌گونه اثر ضد میکروبی ندارد، ولی با افزودن میزان ۰/۹ mg/film disk و ۵/۴ mg/film disk هاله عدم رشدی به میزان ۹/۱۰ و ۱۶/۲۰ میلی‌متر به ترتیب ایجاد گردید (۱۲).

مطالعه Jahani و همکاران (۲۰۱۴) نیز بر روی اثرات ضد میکروبی فیلم ژلاتین حاوی اسانس زنیان با روش انتشار دیسک نشان داد که فیلم مذکور هم بر روی باکتری‌های گرم مثبت موردمطالعه (*باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اروئوس*) و هم باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا*) مؤثر است، ولی اثر آن بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر است که با نتایج مطالعه حاضر نیز تطابق دارد (۲۰).

González و همکاران (۲۰۱۳) ویژگی‌های ضد میکروبی فیلم ترکیبی پلی‌لاکتیک اسید و پروتئین سویا حاوی تیمول را علیه گونه‌های *آسپرژیلوس*، *ساکارومایسس سرویزیه*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش انتشار دیسک بررسی کردند و مشخص نمودند فیلم حاوی تیمول دارای اثر ضد میکروبی بر روی دو باکتری موردمطالعه دارد، درحالی‌که نتوانست هیچ‌گونه هاله عدم رشدی اطراف کپک و مخمر موردمطالعه ایجاد کنند (۱۵). از دلایل مشابه بودن نتیجه مطالعه González بامطالعه حاضر می‌توان به بالا بودن میزان تیمول در اسانس مورداستفاده در مطالعه حاضر اشاره نمود.

Salmieri و همکاران (۲۰۱۴) اثر فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی نانو سلولز و اسانس پونه کوهی را بر روی رشد *لیستریا منوسیتوژنز* در سبزیجات مطالعه نمودند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که شمارش *لیستریا* در سبزی‌های بسته‌بندی‌شده با فیلم‌های PLA حاوی نانو سلولز و اسانس پونه کوهی به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) نسبت به شمارش آن در سبزی‌های گروه کنترل و سبزی‌های بسته‌بندی‌شده با فیلم‌های PLA حاوی نانو سلولز فاقد اسانس پونه کوهی کمتر بود (۴).

در این مطالعه نیز مشابه مطالعات قبلی بیشترین هاله عدم رشد اطراف باکتری‌های *لیستریا منوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید و کمترین هاله عدم رشد در اطراف باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* مشاهده شد بر طبق این نتایج اثر ضد میکروبی فیلم پلی لاکتیک اسید حاوی اسانس زنیان بر روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر بود. همان‌طور که بیان شد در اکثر مطالعات اثر ضد میکروبی اسانس‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری گرم منفی

بیشتر بود که علت آن می‌تواند وجود غشای خارجی موجود در باکتری‌های گرم منفی باشد که محتوی لیپوساکاریدهای آب‌دوست است، می‌باشد (۲۱).

تاکنون مطالعات مختلفی نیز در رابطه با اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی برموم صورت گرفته ازجمله Silici و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که عصاره اتانولی برموم اثرات ضد میکروبی معنی‌داری بر کوکسی های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) داشته است هرچند که اثرات آن بر باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا*) ناچیز بوده است (۲۲). مطالعه Uzel و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که میزان حداقل بازدارندگی عصاره اتانولی برموم برای باکتری‌های گرم منفی موردمطالعه (*اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم* و *سودوموناس آئروژینوزا*) به‌مراتب بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت مانند (*میکروکوکوس لوتئوس، استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس سوبرینوس*) بود (۲۳). Abdulkhani و همکاران (۲۰۱۷) نیز اثر فیلم‌های پلی لاکتیک اسید پوشش داده‌شده با مقادیر ۲۰-۵ میلی‌لیتر عصاره اتانولی برموم را بر *باسیلوس آنتراسیس، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا انتریکا* و *اشریشیاکلی* را ارزیابی نمودند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که فیلم‌های مذکور توانایی ایجاد هاله عدم رشد اطراف باکتری‌های گرم مثبت موردمطالعه را داشتند، ولی فیلم‌های مذکور نتوانست در رابطه با باکتری‌های گرم منفی هاله عدم رشدی ایجاد نمایند (۱۱). از دلایل تفاوت در نتایج مطالعه حاضر با مطالعاتی که بیان گردید می‌توان به کمتر بودن غلظت‌های عصاره اتانولی برموم و همچنین استفاده از عصاره اتانولی برموم در داخل فیلم در مطالعه حاضر اشاره نمود. همچنین علت اختلاف در نتایج مطالعات می‌توان به تفاوت در ترکیب شیمیایی برموم که به ترکیب گیاهان مورداستفاده و زمان جمع‌آوری آن توسط زنبورعسل بستگی دارد که سبب ایجاد تفاوت درنتیجه مطالعات مختلف شود. لیکن زمانی که عصاره اتانولی برموم همراه با اسانس زنیان استفاده شد توانست اثر ضد میکروبی فیلم را افزایش دهد.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه آزمایش فیلم پلی لاکتیک اسید حاوی اسانس زنیان به‌تنهایی و یا توأم با عصاره اتانولی برموم به‌صورت معنی‌داری دارای اثر ضد باکتریایی در غلظت‌های ۱ درصد و بالاتر اسانس برای تمام میکروارگانیسم‌های موردمطالعه را داشت. با توجه به مشکلات زیست‌محیطی حاصل از بسته‌بندی‌های حاصل از مواد نفتی و همچنین به‌منظور کاهش خطرات احتمالی حاصل از باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد می‌توان از فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی اسانس زنیان به‌تنهایی یا همراه با عصاره اتانولی برموم جهت بسته‌بندی مواد غذایی بهره برد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از آقای مهندس جابر حسین زاده دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشکده صنایع چوب و کاغذ دانشگاه تهران بابت تهیه برموم کمال تشکر و قدردانی رادارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Khanjari A, Misaghi A, Basti AA, Esmaeili H, Cherghi N, Partovi R, Mohammadian MR, Choobkar N. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil, Nisin, pH and Temperature on *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 43996 and Its Thermostable Direct Hemolysin Production. J Food Safety 2013;33(3):340-7.
2. Tavakoli HR, Mashak Z, Moradi B, Sodagari HR. Antimicrobial activities of the combined use of *Cuminum cyminum* L. essential oil, nisin and storage temperature against *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in vitro. Jundishapur J Microbiol 2015;8(4).e24838. [in persion]
3. Emiroğlu ZK, Yemiş GP, Coşkun BK, Candoğan K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. Meat Sci. 2010;86(2):283-8.
4. Salmieri S, Islam F, Khan RA, Hossain FM, Ibrahim HM, Miao C, Hamad WY, Lacroix M. Antimicrobial nanocomposite films made of poly (lactic acid)–cellulose nanocrystals (PLA–CNC) in food applications—part B: effect of oregano essential oil release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in mixed vegetables. Cellulose 2014; 21(6):4271-85.

5. Du WX, Olsen CW, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH, Levin CE, Mandrell R, Friedman M. Antibacterial Effects of Allspice, Garlic, and Oregano Essential Oils in Tomato Films Determined by Overlay and Vapor-Phase Methods. J Food Sci 2009;74(7):390-7.

6. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J food Microbiol 2004; 94(3):223-53.

7. Ashrafi Tamai I, Zahraei Salehi T, Khosravi AR, Sharifzadeh A, Balal A. Chemical composition and anti-candida activity of *Trachyspermum ammi* essential oil on azoles resistant *Candida albicans* isolates from oral cavity of HIV+ patients. J Med Plants 2013; 2(46):137-49.

8. Khosravi AR, Shokri H, Sohrabi N. Potential effects of *Trachyspermum copticum* essential oil and propolis alcoholic extract on Mep3 gene expression of *Microsporum canis* isolates. J Mycol Med 2014; 24(3):101-7.

9. Zargari A. Medicinal plants. Tehran University Publications. ISBN; 1995 in [in Persian].

10. Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. Iranian J Microbiol 2011; 3(4):194-200 [in Persian].

11. Abdulkhani A, Hosseinzadeh J, Ashori A, Esmaeeli H. Evaluation of the antibacterial activity of cellulose nanofibers/polylactic acid composites coated with ethanolic extract of propolis. Polym Composite 2017;38 (1): 13-19

12. Erdohan ZÖ, Çam B, Turhan KN. Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. J Food Eng 2013; 119(2):308-15.

13. Soleymani N, Sattari M, Sepehriseresht S, Daneshmandi S. Evaluation of reciprocal pharmaceutical effects and antibacterial activity of *Bunium persicum* essential oil against some Gram positive and Gram negative bacteria. Iranian J Med Microbiol 2010; 4(1):26-34. [in Persian]

14. Nori MP, Favaro-Trindade CS, de Alencar SM, Thomazini M, de Camargo Balieiro JC, Castillo CJ. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. LWT-Food Sci Technol 2011; 44(2):429-35.

15. González A, Igarzabal CI. Soy protein–Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. Food Hydrocolloids 2013; 33(2):289-96.

16. Ekhtiarzadeh H, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Sari A, Khanjari A, Rokni N, Abbaszadeh S, Partovi R. Growth response of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in salted fish fillets as affected by *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, nisin, and their combination. J Food Safety 2012; 32(3):263-9.

17. Shakeri MS, Shahidi F, Beiraghi-Toosi S, Bahrami A. Antimicrobial activity of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil incorporated with whey protein based films on pathogenic and probiotic bacteria. Int J Food Sci Tech 2011; 46(3):549-54.

18. Mehdizadeh T, Tajik H, Rohani SM, Oromiehie AR. Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing *Thymus kotschyanus* essential oil. VRF. 2012; 3 (3), 167-173.

19. Akhila A, editor. Essential oil-bearing grasses: the genus Cymbopogon. CRC Press; 2009.

20. Jahani S, Kavoosi G, Shakiba A. Chemical and Biological Properties of *Trachyspermum ammi* Encapsulated in Gelatin Nanofilms. Int J Infect 2014; 1(1).e 14820

21. Nikaido, H., 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. Sci; 264, 382–388.

22. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. J Ethnopharmacol 2005;99(1):69-73.

23. Uzel A, Önçağ Ö, Çoğulu D, Gençay Ö. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. Microbiol Res 2005;160(2):189-95.