مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره چهارم (پیاپی ۳۳) زمستان ۱۳۹۶
صفحات ۳۲۱-۳۱۰

Original Article

تاثیر سونیکیشن بر نیوزوم حاوی اسانس آویشن به منظور ایجاد شوینده زیستی-نانویی

زهره کریمی[۱]، سمیرا نادری نژاد[۲]، فاطمه حقیر السادات*[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه پیام نور تفت، واحد یزد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، [۲] کارشناس ارشد، دانشگاه تهران، ، پردیس دانشکده های فنی، دانشکده مهندسی شیمی، گروه مهندسی بیوتکنولوژی و داروسازی، [۳] دکتری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم و فنون نوین پزشکی.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه به دلیل خواص ضد میکروبی گیاهان، توجه زیادی به افزودن مواد موثره طبیعی به سامانه‌های دارویی، غذایی و بهداشتی شده است. این مطالعه با هدف بررسی و ساخت نانو ذره حاوی اسانس آویشن به عنوان شوینده زیستی انجام شد.

مواد و روش ها: در این بررسی اسانس گیاه آویشن با دستگاه کلونجر استخراج و خالص‌سازی گردید. سپس به روش بنگهام نانونیوزوم حاوی اسانس آویشن با استفاده از سورفکتنت‌های توئین ۶۰، اسپن ۶۰ و لیپید کلسترول تهیه گردید. در ادامه فرآیند دو نوع روش کاهش سایز ذره (سونیکت حمامی و پروبی) مورد مطالعه قرار گرفت. نانو ذرات از نظر میزان رهایش اسانس از نانو ذره، اندازه، پتانسیل زتا، مورفولوژی، طیف مادون قرمز و میزان بارگذاری مشخصه‌یابی گردیدند. خواص ضد میکروبی شوینده بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از نظر حداقل غلظت کشندگی، حداقل غلظت بازدارندگی و قطر هاله عدم رشد بررسی شد.

یافته ها: نتایج حاکی از کوچکی اندازه ذرات حاصل از سونیکت پروبی در مقایسه با سونیکت حمامی می‌باشد. از نظر درصد بارگذاری اسانس، راندمان بارگذاری اسانس در سونیکت حمامی ۴/۶۵ درصد بیشتر از پروبی می‌باشد. همچنین هریک از انواع سونیکت بر روی پتانسیل زتا تغییری ایجاد نکرده و هردونانوذره مانند هم می‌باشند. اسانس به طور فیزیکی در نیوزوم بدون ایجاد تغییر در خواص آن محصور گردید. توزیع ذرات یکنواخت و ساختار کروی است و شوینده از نظر زیستی قابلیت ضدمیکروبی چشم‌گیری بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نشان داد.

نتیجه گیری: در تهیه نانوذره از نظر اقتصادی، استفاده از سونیکت حمامی در مقایسه با پروبی، پیشنهاد می‌شود. نتایج این پژوهش مقدماتی جهت توسعه یک شوینده گیاهی ضدمیکروبی را معرفی می‌کند.

واژگان کلیدی: نیوزوم، شوینده زیستی، آویشن شیرازی، ضدمیکروبی، *استافیلوکوکوس اورئوس*.

دریافت مقاله: خرداد ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: تیرماه ۹۶

مقدمه

نیوزوم‌ها ذرات کلوئیدی می‌باشند که از تجمع سورفاکتانت غیر یونی در محیط آبی تشکیل می شوند و ایجاد ساختاری لایه لایه با خاصیت آب‌دوستی و آب‌گریزی می‌کنند. بنابراین نیوزوم ها، ظرفیت به دام انداختن ترکیبات با حلالیت متفاوت را دارند. این ترکیبات حامل‌هایی برای رسانش عوامل ضد باکتریایی و خواص آزادسازی مطلوب با نیمه عمر بالا و سمیت پائین بوده که با محافظت از ترکیبات فعال حساس به نور سبب بهبود اثرگذاری آن‌ها می‌شوند (۱). اسانس، یک مایع آب گریز شامل ترکیبات معطر فرار است که از گیاهان به کمک روش‌های فیزیکی استحصال می‌شود (۲).

بارگذاری کردن راهی برای افزایش کارایی، پایداری اسانس‌ها، محافظت در برابر اکسیداسیون، محافظت در برابر تبخیر، پنهان کردن طعم و بو، کاهش اثرات جانبی و بهبود حلالیت در آب

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشکده علوم و فنون نوین، گروه مهندسی علوم زیستی.
تلفن: ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸ پست الکترونیک: fhaghirosadat@gmail.com

** در این مقاله سهم مشارکت نفر اول و دوم برابر است.

می‌باشد (۳). استفاده گسترده از شوینده‌ها در مصارف مختلف و نیز مضر بودن بسیاری از ترکیبات سازنده شوینده‌های مصنوعی بر سلامت افراد، امروزه باعث توجه بسیار به مواد پاک‌کننده‌ای شده که بتواند جایگزین شوینده‌های مصنوعی شود و در طرفی از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه باشد. در این میان استفاده از گیاهان و مواد موثره آنها در این امر دور از انتظار نیست. از زمان‌های گذشته تاکنون گیاهانی مانند حنا، سدر و کتیرا در مصارف بهداشتی مورد استفاده قرار می گرفته اند. امروزه نیز با توجه به مضرات دترجنت‌های مصنوعی اهمیت کاربرد گیاهان در صنعت بهداشت بسیار مورد توجه قرارگرفته است. از جمله گیاهانی که اثرات ضدمیکروبی و ضدقارچی آن به اثبات رسیده است، گیاه آویشن می‌باشد (٤).

گیاه آویشن با نام علمی *Thymus vulgaris* از خانواده نعناع (*Labiatae*) است. پراکنش این گیاه در دامنه‌های خشک و بین تخته سنگ‌های نواحی مختلف مدیترانه می‌باشد. چهارده گونه از آن در ایران گزارش‌شده است که بیشترین پراکندگی را در شمال و غرب کشور دارند (٤). قسمت اعظم اسانس آویشن را فنل‌ها، هیدروکربن های منوترپنی و الکل تشکیل می‌دهد که تیمول جز اصلی فنلی در آویشن و کارواکرول نیز یک بخش فرعی است. از آویشن در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی استفاده می‌شود (٥). آویشن به دلیل داشتن تیمول و کارواکرول دارای خاصیت ضدمیکروبی می‌باشد و در فراورده‌های مختلف طبی به عنوان ضدعفونی کننده مصرف می‌شود (٦).

در کشور ما نیز تحقیقات گسترده‌ای در زمینه بارگذاری اسانس گیاهان دارویی با توجه به خاصیت آنها صورت گرفته است. خلیلی (Khalili) و همکاران در سال ۲۰۱٤ پژوهشی را با هدف بارگذاری اسانس آویشن در نانو ژل های سنتز شده از کیتوزان و بنزوئیک اسید به منظور افزایش نیمه عمر اسانس و حفظ فعالیت ضد قارچی آن به انجام رساندند. نتایج به دست آمده ضمن تایید خاصیت ضد قارچی قابل توجه اسانس آویشن بر روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*)، نشان داد که با توجه به فراریت این اسانس و ناپایداری آن در برابر عوامل محیطی، بارگذاری آن نه تنها می‌تواند خاصیت ضد قارچی اسانس را ارتقا بخشد، بلکه می تواند به طور قابل ملاحظه ای نیمه عمر اسانس را نیز افزایش دهد (۷).

در سال ۱۳۹۲ میرزاخانلویی (Mirzakhanluei) و همکاران با ساخت نانوالیاف پلیمری آنتی‌باکتریال حاوی عصاره آویشن نشان دادند که از کامپوزیت نانوالیافی می‌توان به عنوان بسترهای متخلخل ضد باکتریایی استفاده نمود (۸).

هدف از مطالعه حاضر آماده‌سازی شوینده نانویی-گیاهی برای جایگزینی با شوینده‌های شیمیایی مرسوم است. سپس قابلیت ضد باکتریایی شوینده معرفی شده، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

الف) استخراج اسانس: گیاه آویشن مورد استفاده در پژوهش حاضر با نام علمی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) از باغ گیاه‌شناسی استان یزد تهیه شد و توسط دانشکده منابع طبیعی و کویر شناسی دانشگاه یزد تائید گردید. به منظور استخراج اسانس گیاه آویشن از روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر استفاده شد. قبل از استفاده از این دستگاه حدود ۲۵ گرم از بذر آویشن با استفاده از آسیاب برقی پودر شد. این پودر با ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید و در دستگاه کلونجر قرار داده شد. پس از پایان اسانس‌گیری به منظور خالص سازی اسانس، مخلوط حاصل سانتریفیوژ گردید (۹).

ب) روش تهیه نانونیوزوم: در این مطالعه به منظور سنتز نیوزوم از روش بنگهام که بر اساس آب پوشانی لایه نازک است، استفاده گردید. مواد مورد استفاده در سنتز نیوزوم شامل ۰/۱۸۳۲٦ گرم توئین ٦۰ ، ۰/۰٦۰۳ گرم اسپن ٦۰ (دائجانگ، کره جنوبی)، ۰/۰۲۷۱ گرم کلسترول (Mw=386.65 gr/mol) (سیگما، آمریکا) بود. این مواد با کلروفرم (مرک، آلمان) ترکیب شدند و در دستگاه روتاری به مدت ۱۵ دقیقه با دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و دور ۱۵۰ rpm قرار گرفتند. پس از همگن‌سازی، اسانس محلول در متانول (مرک، آلمان) به آن افزوده شد. پس از یک ساعت ایجاد خلا، فیلم مورد نظر تشکیل گردید (۱۰).

ج) هیدراته کردن فیلم لیپیدی: فیلم تشکیل شده برای ایجاد وزیکول‌های کروی با بافر PBS خنثی در دمای ۳۰ درجه

سلیسیوس و به مدت ۵۰ دقیقه هیدراته شد (۱۱).

د) کاهش سایز: به منظور کاهش سایز نیوزوم‌های بزرگ به نیوزوم‌های کوچک از روش سونیکاسیون حمامی و پروبی استفاده گردید و نتایج با یکدیگر مقایسه شد. سونیکت حمامی به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط بدون گرمادهی صورت گرفت. سونیکیت پروبی نیز به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط حمام یخ صورت گرفت (۱۲).

ه) حذف اسانس محصور نشده: به منظور جداسازی نیوزوم‌های حاوی اسانس از اسانس آزاد از کیسه دیالیز (molecular cut of: 12-14 kDa) استفاده شد. سوسپانسیون تهیه شده در کیسه دیالیز ریخته شد و در بافر PBS با میزان ۱۰۰ برابر محتوی داخل کیسه دیالیز در لرزش ملایم به مدت ۱ ساعت در دمای ٤ درجه سلیسیوس غوطه‌ور گردید (۱۳).

و) بررسی رهایش اسانس: به منظور دست یابی به هدف مورد مطالعه یعنی کاربرد اسانس به عنوان شوینده، همچنین استفاده شوینده‌ها در آب گرم و آب سرد، رهایش در آب‌گرم (٤۲ درجه سلیسیوس) و آب سرد (۲۵ درجه سلیسیوس) بررسی شد. نیم سی‌سی از سوسپانسیون نیوزومی حاوی اسانس درون کیسه دیالیز ریخته شد و اطراف آن با ۷ سی‌سی آب مقطر پوشانده شد و در لرزش قرار گرفت. سپس در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۹ ساعت و سپس ۱۲ و ۲٤ ساعت میزان رهایش اندازه گیری شد (۱٤). به منظور بررسی رهایش اسانس، در هر مرحله یک سی‌سی از آب مقطر اطراف کیسه دیالیز برداشت شد و با یک سی‌سی آب مقطر مجدداً جایگزین گردید. سپس نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PG Instruments Ltd) در طول موج ۲۲٦ نانومتر مورد ارزیابی قرارگرفت.

ز) بررسی طیف سنجی مادون قرمز (FTIR): به منظور درک چگونگی برهمکنش اسانس آویشن با ساختار دولایه ای نیوزوم، طیف سنجی مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفت (۱۵). به این منظور قطره‌ای از اسانس آویشن و نیوزوم حاوی اسانس آویشن بر روی لام شیشه‌ای قرار گرفت و پس از خشک شدن، طیف مادون قرمز (Model 8300, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) در محدوده ۱۰۰۰-٤۰۰۰ cm^{-1} به دست آمد.

ح) بررسی مورفولوژی نانوذرات ساخته شده: برای بررسی مورفولوژی سطحی نانوذره از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) (model EM3200, KYKY, China) استفاده گردید (۱٦).

ط) بررسی پتانسیل زتای نانوذرات نیوزومی حاوی اسانس: بررسی پتانسیل زتا یک پارامتر برای ثبات بالقوه سیستم کلوئیدی می‌باشد. مرز پایداری و ناپایداری سوسپانسیون را می‌توان برحسب پتانسیل زتا تعیین کرد. در این مطالعه با استفاده از دستگاه زتا سایزر (Brookhaven Instruments Corp) پتانسیل زتا مشخص گردید (۱٦).

ی) ارزیابی خاصیت ضد میکروبی نانوذره: باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC1431 از کلکسیون میکروبی جمهوری اسلامی ایران تهیه گردید. در ابتدا غلظت $۱/۵\times۱۰^{٦}$ CFU/ml باکتری بر روی محیط نوترینت آگار (مرک، آلمان) به صورت شبانه کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس در شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری گردید. سپس با استفاده از سوآپ استریل بر روی محیط مولرهینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. پس از جذب، در ته چاهک‌ها یک دیسک خالی قرار داده شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسانس و ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس نیوزومی به چاهک‌های مربوطه اضافه‌گردید. از دیسک آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (پادتن طب، ایران) به عنوان شاهد مثبت و آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. پلیت‌ها به مدت یک‌ساعت در یخچال قرار داده شد تا مواد ضدمیکروبی قبل از رشد و تکثیر باکتری‌ها فرصت انتشار در محیط را داشته باشند. در نهایت پلیت‌ها به مدت ۲۰ ساعت گرماگذاری شدند (۱۷). برای آزمون MIC (Minimal Inhibitory Concentration) (حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد) و MBC (Minimal Bactericidal Concentration) (حداقل غلظت کشندگی) به اولین چاهک مربوط به اسانس‌ها مقدار ۱۹۰

میکرولیتر محیط‌کشت مولرهینتون براث اضافه‌گردید. سپس غلظت‌های مختلف از اسانس آزاد و سوسپانسیون نیوزومی حاوی اسانس به چاهک‌ها افزوده شد. چاهک کنترل مثبت حاوی باکتری و محیط کشت بود و چاهک کنترل منفی حاوی اسانس و محیط کشت بود. سپس به هر چاهک به استثنای چاهک کنترل منفی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه گردید و سطح میکروتیتر پلیت با پارافیلم پوشانده شد و در آن بسته شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. اولین‌خانه که در آن عدم رشد دیده شد به عنوان MIC گزارش شد. سپس از چاهک‌هایی که فاقد کدورت بودند مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و بر روی محیط تریپتیک سوی آگار (TSA) (مرک، آلمان) کشت داده شد. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و از نظر تشکیل کلنی و یا عدم آن جهت تعیین MBC بررسی شدند. برای تعیین قطر هاله عدم رشد، ۲۰ میکرولیتر از وزیکول سورفکتانتی حاوی اسانس و نیز اسانس خالص بر روی پلیت حاوی TSA حاوی 10^{7} cell/ml باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* قرارگرفت. هر پلیت TSA آگار در ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ٢٤ ساعت در گرمخانه قرار داده شد. سپس از هاله عدم رشد در اطراف نمونه برای نشان دادن فعالیت‌های ضدباکتریایی برای هر غلظت ماده ضد میکروبی استفاده شد (۱۸).

یافته ها

الف) میزان بارگذاری نانونیوزوم حاوی اسانس آویشن: میزان بارگذاری اسانس، درصد بارگذاری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و مقایسه با معادلات استاندارد آویشن در ایزوپروپانل در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج ضریب همبستگی نشان می‌دهد که مقدار ضریب r پیرسون بین ۱+ تا ۱- تغییر می کند. هرچه به ۱+ نزدیک‌تر می‌شود نشان دهنده رابطه خطی کاملاً مثبت میان دو متغیر و بالعکس است. نتایج گزارش شده نشان دهنده تطابق خوب خط و داده‌های تجربی می‌باشد. میزان بارگذاری اسانس نشان می‌دهد که درصد بارگذاری نانوذرات در سونیکت حمامی بیشتر از سونیکت پروبی است. به طوری که در سونیکت پروبی ۸۲/۰۱ درصد و سونیکت حمامی ۸٦ درصد می باشد.

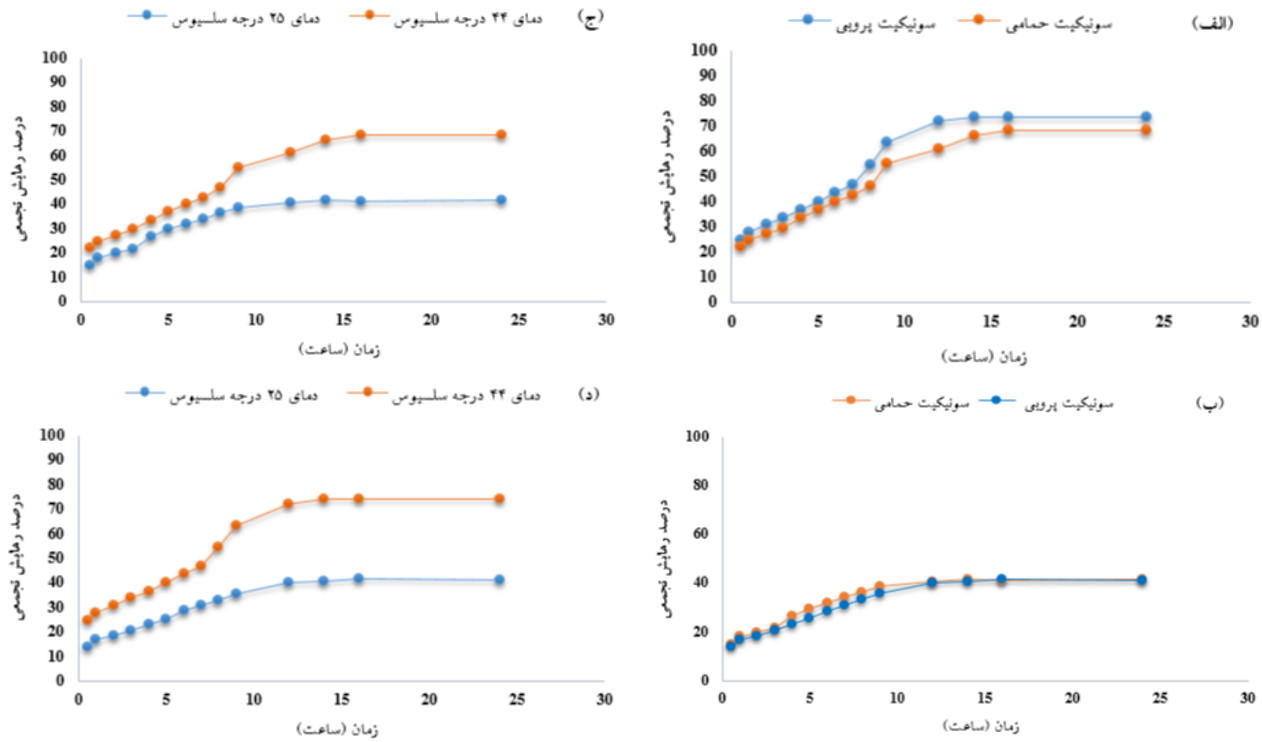
جدول ۱: معادلات استاندارد آویشن در ایزوپروپانول.

ضریب همبستگی	معادله استاندارد
R^2=0.9956	Y=0.0255+0.003
R^2=0.9826	Y=0.0226+0.0064
R^2=0.9994	Y=0.02+0.0013

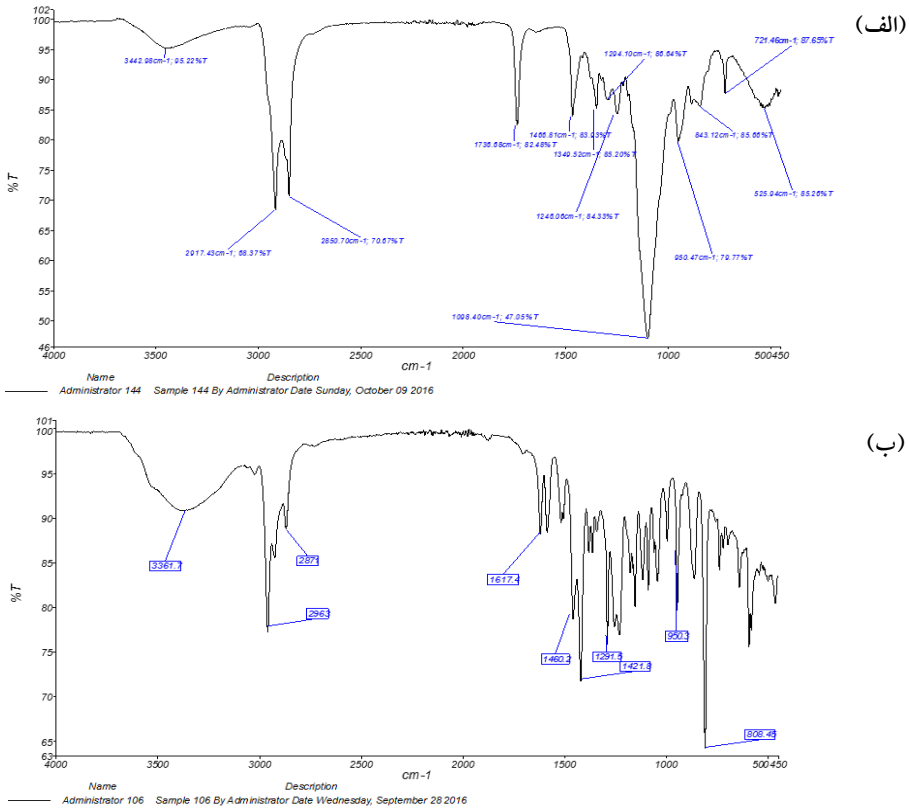
ب) نتایج میزان رهاسازی اسانس از نانونیوزوم: مقدار اسانس آزاد شده از فرمولاسیون تهیه شده با سونیکت حمامی و سونیکت پروبی طی بازه‌های زمانی نیم تا ٢٤ ساعت در دو دمای متفاوت که یکی مربوط به دمای محیط (۲۵ درجه سلیسیوس) و دیگری دمای ٤٤ درجه سلیسیوس در آب مقطر بررسی شد (نمودار ۱). به طور کلی در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس رهایش نانوذرات حاصل از سونیکت حمامی در ۱۰ ساعت ابتدایی اندکی بیش‌تر از سونیکت پروبی بود. اما با گذشت زمان نتیجه هر دو یکسان شد و به حدود ٤٠ درصد رسید. در دمای ٤٤ درجه سلیسیوس در ۱۰ ساعت ابتدایی رهایش سونیکت پروبی اندکی بیش‌تر از سونیکیت حمامی بود و این روال تا انتها ادامه داشت و به میزان تقریبی ۷۳٪ درصد رسید. به طور کلی رهایش در آب گرم بسیار سریع‌تر از آب سرد بود.

ج) طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) نیوزوم های حاوی اسانس آویشن: با کمک نتایج FTIR چگونگی برهم کنش اسانس آویشن با ساختار دولایه ای نیوزوم اسانس با نیوزوم مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۲). نتایج نشان داد که اسانس به طور فیزیکی در نیوزوم محصور شده و خواص آن تغییر نکرده است. در واقع تمامی پیک‌های اصلی مربوط به FTIR اسانس آویشن با کمی جابه‌جایی در FTIR نیوزوم اسانس آویشن مشاهده شد.

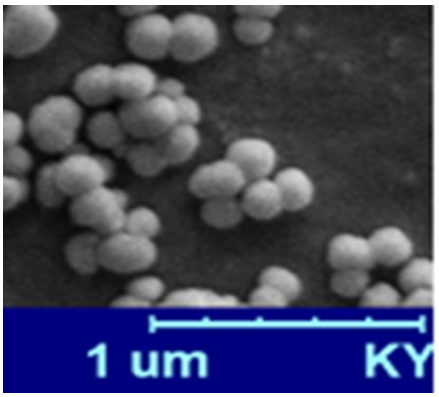
د) ارزیابی اندازه: به کمک دستگاه زتا سایزر می توان دو پارامتر مهم شامل آنالیز اندازه ذرات و پتانسیل زتا را در محلول های آبی و آلی تعیین نمود. میانگین اندازه و توزیع اندازه نیوزوم های ساخته شده حاوی اسانس در سونیکت پروبی



نمودار ۱: رهایش حاصل از سونیکت حمامی و پروبی در دمای ٤٤ درجه سلیسیوس (الف)، مقایسه رهایش حاصل از سونیکت حمامی و پروبی دمای ۲۵ درجه سلیسیوس (ب)، رهایش سونیکت حمامی در دما های ۲۵ و ٤٤ درجه سلیسیوس (ج) و رهایش سونیکت پروبی در دماهای ٤٤ و ۲۵ درجه سلیسیوس (د).



نمودار ۲: طیف مادون قرمز نیوزوم حاوی اسانس آویشن (الف) و اسانس آویشن خالص (ب).



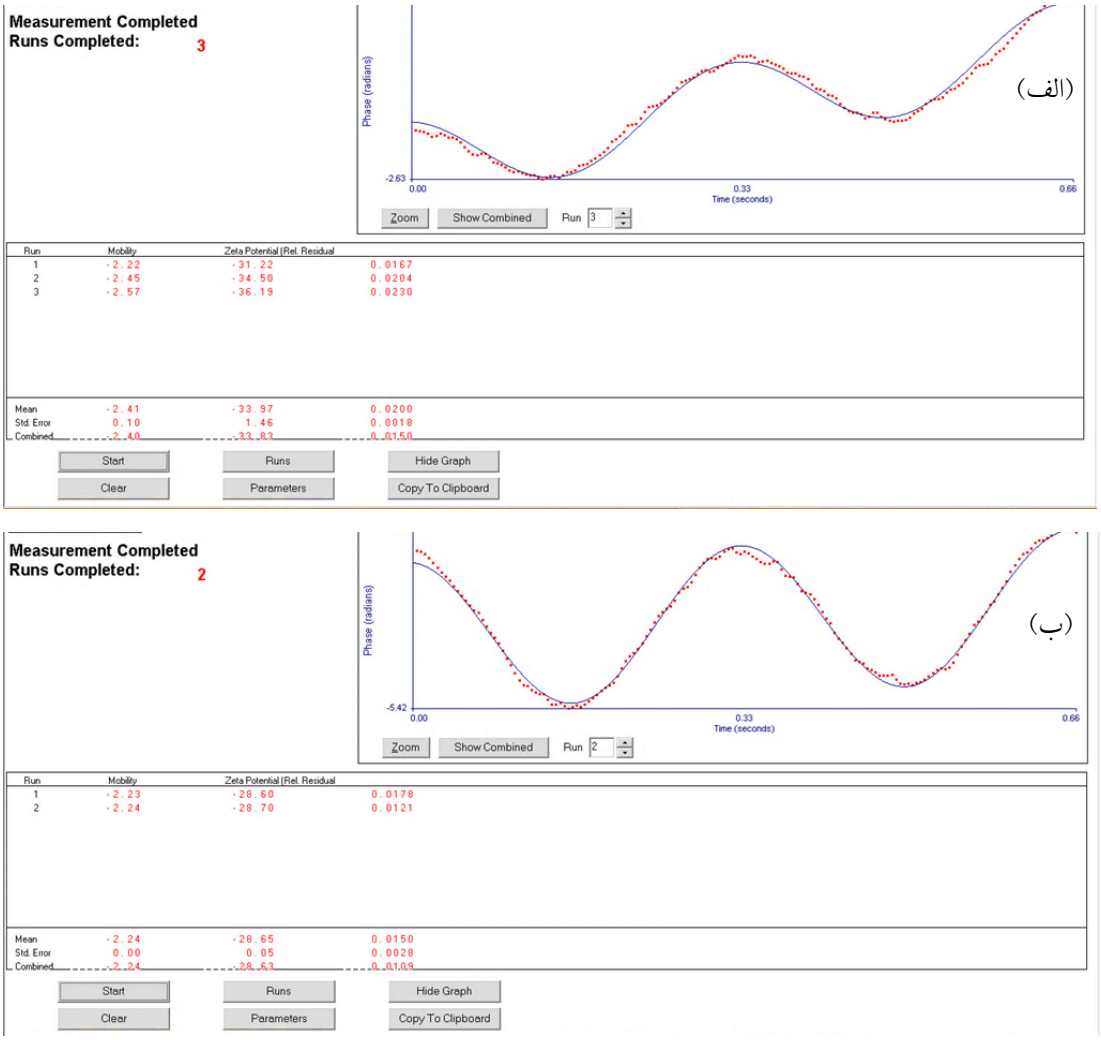
شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از نیوزوم اسانس آویشن.

۹/۱۰۶ نانومتر و سونیکت حمامی ۱۹۱/۷ نانومتر نشان داده بنابراین اندازه نانو نیوزوم‌های تولیدی حاصل از سونیکت شد.

پروبی به دلیل اینکه نمونه در تماس مستقیم با پروب دستگاه می‌باشد، شدت امواج فراصوت بیشتر بوده در نتیجه اندازه نانوذرات کوچکتر از سونیکت حمامی می‌باشد.

ه) *پتانسیل زتای نانوذرات نیوزومی حاوی اسانس:* با توجه به نمودار ۳ متوسط پتانسیل زتای حاصل از سونیکت پروبی ۳۳/۹۷- و متوسط پتانسیل زتای حاصل از سونیکت حمامی ۲۸/۶۵- بود. نتایج حاصل از پتانسیل زتا نشان داد که هریک از انواع سونیکت بر روی پتانسیل زتا تغییرچندانی ایجاد نکرده و هر دو نانوذره از نظر شارژ مانند هم می‌باشند.

و) *مورفولوژی نانوذرات :* شکل ۱ مورفولوژی نانوذرات ساخته شده با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی نگاره



نمودار ۳: پتانسیل زتا نانوذره نیوزومی حاصل از سونیکت پروبی (الف) و سونیکت حمامی (ب).

جدول ۲: میانگین هاله عدم رشد بر حسب سانتی متر.

قطر هاله عدم رشد (سانتی متر)	تیمار
۰	وزیکول
۲±۰/۵	اسانس آویشن (۵ میلی گرم در میلی لیتر)
۷±۱	وزیکول حاوی اسانس آویشن
۲/۵۵±۰/۱۵	آمپی سیلین

(SEM) را نمایش می‌دهد. همان‌گونه که مشخص است توزیع ذرات یکنواخت و ساختار کروی می‌باشد.

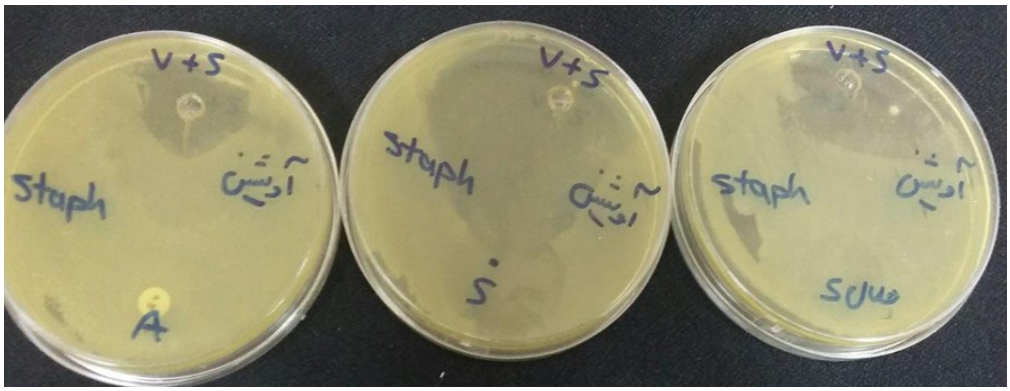
ز) آزمون حساسیت میکروبی: در جدول ۲ میانگین هاله عدم رشد بر حسب سانتی‌متر آمده است. اثر ضد میکروبی وزیکول حاوی اسانس آویشن از اسانس خالص و آمپی سیلین بیشتر است. وزیکول بدون اسانس نیز هیچ‌گونه اثر تخریبی و کشندگی بر روی باکتری‌ها نداشت. همچنین نتایج مربوط به MIC و MBC به ترتیب ۱۵/۶۲۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. همچنین نتایج نشان داد که خاصیت ضد باکتریایی وزیکول حاوی اسانس بیشتر از اسانس خالص و آمپی‌سیلین است (شکل ۲).

بحث

شوینده‌ها و دترجنت‌های مرسوم آسیب‌های زیست محیطی فراوانی را به اکوسیستم وارد می‌کنند. از این‌رو فعالان محیط زیست و دولتمردان از سیاست‌هایی که این آسیب‌ها را به حداقل برساند استقبال می‌کنند. گیاهان دارویی، به عنوان آنتی-باکتریال‌های طبیعی می‌توانند به منظوراستفاده در شوینده‌های زیستی- شیمیایی توسعه داده شوند. ایران یکی از متنوع‌ترین و وسیع‌ترین اقلیم گیاهان دارویی را دارا باشد. با استفاده از این پتانسیل داخلی و توسعه محصولات گیاهی می‌توان سهم صادرات غیرنفتی را افزایش داد (۱۹).

در مطالعه حاضر، اسانس گیاه آویشن از گیاهان بومی ایران توسط غشای سورفکتنتی مقرون به صرفه پوشش‌دهی شد. سپس خاصیت ضد میکروبی نانوذره حاوی اسانس گیاه آویشن به منظور به گارگیری در شوینده‌های زیستی بررسی گردید. اسانس آویشن به دلیل گران بودن، فراریت و حضور ترکیبات فعال حساس به نور اکسید شونده نمی‌تواند به صورت خالص و آزاد در مصارف صنعتی استفاده شود. از این رو تکنولوژی نانو کمک می‌کند تا ضمن کاهش غلظت مورد نیاز، از فراریت و اکسید شوندگی اسانس جلوگیری کرد تا خاصیت آن حفظ شود. همان‌طور که از نتایج بر می‌آید در اثر انکپسولاسیون، خاصیت ضد باکتریایی اسانس در دراز مدت حفظ شده است و به مشکل فراریت و اکسیدشوندگی آن غلبه شده است.

در سال ۲۰۱٤ هیل (Hill) و همکاران در پژوهشی فعالیت ضد میکروبی تیمول موجود در آویشن را به صورت انکپسوله و آزاد بررسی کردند. در میکروانکپسوله کردن، کمپلکس در بردارنده تیمول و روغن آویشن با بتا سیکلودکسترین (β-cyclodextrin) از روش خشک کن انجمادی و سرشتن (kneading) استفاده می‌شود. کمپلکس بتا سیکلو دکسترین و روش خشک کن انجمادی، توانست فعالیت باکتری *اشریشیا کلی* سویه K12 را بهتر از روغن‌های آزاد مهار کند (۲۰).



شکل ۲: مقایسه تصویری خاصیت ضد باکتریایی اسانس خالص (S)، وزیکول حاوی اسانس (A+S) و آمپی سیلین (A).

در سال ۲۰۱۵ نتایج مطالعه‌ای بر روی اسانس آویشن انکپسوله شده در نانوژل کیتوزان بنزوییک اسید، افزایش فعالیت ضدمیکروبی را نسبت به روغن‌های آزاد نشان داد. همچنین مشخص شد اسانس‌های انکپسوله با غلظت m/g ۷۰۰ قادر به حفظ کیفیت میوه در طی بازه زمانی یک‌ماهه انبارداری می باشد (۲۱). ارزیابی فعالیت ضد میکروبی که نشان داد خاصیت آنتی باکتریال سامانه نانویی حاصل به طرز معناداری بیش از آنتی بیوتیک است. هرچند که پیش از این، نتایج گورتزی (Gortzi) و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مقایسه آویشن کپسوله شده در لیپوزوم با آنتی‌بیوتیک نتیل میسین نشان داد که آویشن کپسوله شده خاصیت ضد باکتریایی به مراتب کمتر از آنتی بیوتیک را دارد (۲۲).

پکارسکی (Pecarski) و همکاران در سال ۲۰۱٤، قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده با اسانس آویشن محصور در میکرو کپسول‌های کیتوزان را بررسی کردند که در تمامی غلظت‌های مورد بررسی کمتر از نتایج پژوهش حاضر بوده است (۲۳). همچنین انگل (Engel) و همکاران در سال ۲۰۱۷ تاثیر قابل توجهی در میزان MIC *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده با تیمول و کاراکاول آزاد و لیپوزومه مشاهده نکردند. مقدار MIC گزارش شده ۰/٦٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که بسیار بیش‌تر از نتیجه به دست آمده در پژوهش حاضر است (۲٤).

در این مطالعه در مقایسه دو روش کاهش سایز، اندازه ذرات در سونیکت حمامی بزرگتر از سونیکت پروبی است. هرچند که انکپسولاسیون اسانس در سونیکیت حمامی بهتر رخ می‌دهد که به دلیل دمای حمام سونیکت است. به طوری که امکان سونیکت همراه با هیدراتاسیون ذرات را سبب می‌سازد. همچنین رهاسازی اسانس به عنوان شوینده ضدمیکروبی در آب گرم بیش از آب سرد است که خاصیت کنترل رهشی سامانه حاصل به عنوان شوینده زیستی را نشان می‌دهد. این خاصیت به دلیل دمای انتقال فاز توئین ٦۰ است که نزدیک به ٤۲ درجه سلیسیوس می‌باشد. این امر موجب سست شدن و نفوذ پذیری غشا در این دما می‌شود و به دلیل گرادیان غلظت بین درون سامانه و محیط آبی، سبب رهایش سریع اسانس در این دما در مقایسه با آب سرد می‌شود. در مطالعه حاضر ظرفیت بالای بارگذاری اسانس به چهار دلیل است: ۱) سامانه‌های نیوزومی به دلیل زنجیره بلند آب‌گریز سورفکتنت (اسپن ٦۰) بستری خوبی برای بارگذاری اسانس ایجاد می‌کند. ۲) دمای هیدراتاسیون بسیار نزدیک به دمای انتقال فاز سورفکتنت توئین ٦۰ است که سبب شده غشا برای مدتی نفوذپذیر شود و باعث نفوذ اسانس به درون ذره شود و بارگذاری اسانس به حداکثر مقدار شود. ۳) حضور سورفکتنت توئین ٦۰ به دلیل زنجیره بلند آب‌دوست امکان هیدراتاسیون و تشکیل موفقیت آمیز وزیکول را فراهم می‌کند. ٤) حضور کلسترل موجب استحکام بخش غشا می شود و از نشت اسانس و کاهش بارگذاری اسانس جلوگیری می‌کند. نتایج مشابهی در پژوهش‌های پیشین نیز گزارش شده است (۲۵).

ذرات تهیه شده در این پژوهش در مقایسه نانو هستند و سایز کمتر از ۱۵۰ نانومتر دارند. تحقیقات بسیاری بر روی میکروانکپسولاسیون اسانس‌های گیاهی تمرکز دارند. به عنوان مثال استاجونویک (Stojanovic) و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی میکروانکپسولاسیون اسانس آویشن درون دانه‌های کلسیم آلژینات تحقیق کردند و ذراتی با اندازه ٤۵۰-۷۷۵۰ میکرومتر تهیه کردند (۲٦). گرچه در میکروانکپسولاسیون از فراریت اسانس و تخریب آن جلوگیری می‌کنند و اثرات جانبی ترکیبات فعال را می‌کاهند، اما خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی را بهبود نمی‌بخشند. در مقیاس نانو انرژی سطحی ذرات افزایش می‌یابد و به دلیل تقویت مکانیسم‌های غیرفعال جذب سلولی، ذرات خواص بهبود یافته خواهند داشت. افزایش خواص ضد میکروبی اسانس محصور در مقابل اسانس آزاد موید این مطلب است. در مقایسه با تحقیقات مشابه در مقیاس نانو، اندازه ذرات و بازده بارگذاری اسانس آویشن بهبود یافته است (۲۷ و ۲۸).

پتانسیل زتا فرمولاسیون تهیه شده منفی می‌باشد که علاوه بر این که به دلیل نیروی دافعه از اگلرومره شدن ذرات جلوگیری می‌کند سمیت سلولی را می‌کاهد و در استفاده این فرمولاسیون به عنوان شوینده کاملاً ایمن است و جذب سلولی برای بدن

انسان ندارد. با توجه به اینکه هدف پژوهش حاضر توسعه نانو فرمول گیاهی برای کاربرد در شوینده زیستی است، بنابراین اقتصادی بودن فرمولاسیون و روش ارائه شده اهمیت ویژه‌ای دارد. از این رو فرمولاسیونی زیست سازگار با استفاده از مواد ارزان قیمت و ساده و ارزان ارائه شده است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه بررسی بارگذاری اسانس آویشن درون حامل نیوزومی انجام گرفت. با بررسی سونیکت حمامی و پروبی مشخص گردید که با هر دو روش امکان بارگذاری اسانس آویشن در حامل‌های نیوزومی وجود دارد. بارگذاری اسانس منجر به کاهش فراریت، پایداری و بهبود خواص زیستی می‌شود. آزمون خاصیت ضد باکتریایی بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*نشان داد که این شوینده پتانسیل بالقوه‌ای برای کاربرد به عنوان شوینده را دارد. با توجه به بررسی‌های اقتصادی، به نظر می‌رسد استفاده از سونیکت حمامی در تولید انبوه، مقرون به صرفه‌تر باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، از مرکز بیوتکنولوژی دارویی دانشگاه علوم پزشکی یزد، پردیس بین الملل و پژوهشکده نانوساختار پیام نور استان یزد، به دلیل فراهم سازی امکانات آزمایشگاهی و پژوهشی کمال امتنان را دارند.

References

1. Lucy JA. Functional and structural aspects of biological membranes: a suggested structural role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability. Ann NY Acad Sci. 1972; 203: 4-11.
2. Benavides S, Cortés P, Parada J, Franco W. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. Food Chem. 2016; 204: 77-83.
3. El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EA, Casabianca H, El Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud FN, Elaissari A. Essential oils: from extraction to encapsulation. Int J Pharm. 2015; 483(1): 220-243.
4. Morton JF. Mbajor medicinal plants, botany, culture and uses. Charles C. Thomas Publisher, Bannerstone House. 1977; p: 431.
5. Senner B, Bingol F. Screening of natural source for anti –inflammatory activity. Int J Crude Drug Res. 1988; 26(4): 197-207.
6. Kavosi GH, Eskandari M, Shad E, Kajyee E. 2013. Nanocapsulate the essential oil of thyme to help organic biopolymers (gelatin, chitosan, and Polyvinyl alcohol) and the anti-oxidant and anti-microbial and mold them. National Congress of Food Science and Technology. 29-31 Oct, Shiraz, Iran. 7. [In Persian]
7. Khalili ST, Mohsenifar A, Bygi M, Jave S. 2013. Thyme oil encapsulated in Nanogel of Kaytvsany extracts inhibit the growth of *Aspergillus flavus*. Flavus Eighth Conference of Biotechnology Islamic Republic of Iran and the Fourth National Conference on Biosecurity Tehran, 15-17 Jul, Tehran, Iran. 5. [In Persian]
8. Mirzakhanloui S, Abdolmalki A, Bashirinazar Z, Bashiri F. 2013. Construction of antibacterial

polymer nanofibers containing thyme extract. National Conference of Passive Defense in the Agricultural Secto. 21 Nov, Qeshm Island, Iran. 2. [In Persian]

9. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends Food Sci Technol. 2006; 17(6): 300-312.

10. Al-Kaysi RO, Müller AM, Ahn TS, Lee S, Bardeen CJ. Effects of sonication on the size and crystallinity of stable zwitterionic organic nanoparticles formed by reprecipitation in water. Langmuir. 2005; 21(17): 7990-7994.

11. Kumar GP, Rajeshwarrao P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. Acta Pharm Sin B. 2011;1(4): 208-219.

12. Mandzy N, Grulke E, Druffel T. Breakage of TiO 2 agglomerates in electrostatically stabilized aqueous dispersions. Powder Technol. 2005; 160(2): 121-126.

13. Krishnamurthy R, Lumpkin JA, Sridhar R. Inactivation of lysozyme by sonication under conditions relevant to microencapsulation. Int J Pharm. 2000; 205(1–2): 23-34.

14. Briuglia ML, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. Drug Deliv Transl Res. 2015; 5(3): 231-242.

15. Chandu VP, Arunachalam a, Jeganath S, Yamini K, Tharangini K, Chaitanya G. Niosomes : A novel drug delivery system. Int J Nov Trends Pharm Sci. 2012; 2(1): 25-31.

16. Jones MN. The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterization. Adv Colloid Interface Sci. 1995; 54(C): 93-128.

17. Jordán MJ, Lax V, Rota MC, Lorán S, Sotomayor JA. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Food Control. 2013; 30(2): 463-468.

18. Pesavento G, Calonico C, Bilia AR, Barnabei M, Calesini F, Addona R, Mencarelli L, Carmagnini L, Di Martino MC, Nostro AL. Antibacterial activity of Oregano, *Rosmarinus* and *Thymus* essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. Food Control. 2015; 54: 188-199.

19. Haghiralsadat F, Azhdari M, Kalantar SM, Naderinezhad S, Teymourizadeh K, Yazdani M, Hashemi M, Daneshmand F. Strategy of Improvements in the rapeutic index of medicinal herbs of Iranianin digenous: Synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles in corporated Trachyspermum copticum. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci. 2016; 24(6): 468-478. [In Persian]

20. Tao F, Hill LE, Peng Y, Gomes CL. Synthesis and characterization of β-cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. LWT-Food Sci Technol. 2014; 59(1): 247-255.

21. Khalili ST, Mohsenifar A, Beyki M, Zhaveh S, Rahmani-Cherati T, Abdollahi A, Bayat M, Tabatabaei M. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. LWT-Food Sci Technol. 2015; 60(1): 502-508.

22. Gortzi O, Lalas S, Chinou I, Tsaknis J. Reevaluation of antimicrobial and antioxidant activity of Thymus spp. extracts before and after encapsulation in liposomes. J Food Prot. 2006; 69(12): 2998-3005.

23. Pecarski D, Knežević-Jugović Z, Dimitrijević-Branković S, Mihajilovski K, Janković S. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan microparticles with thyme essential oil. Hem Ind. 2014; 68(6): 721-729.

24. Engel JB, Heckler C, Tondo EC, Daroit DJ, da Silva Malheiros P. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. Int J Food Microbiol. 2017; 252:18-23.

25. Naderinezhad S, Amoabediny G, Haghiralsadat F. Co-delivery of hydrophilic and hydrophobic anticancer drugs using biocompatible pH-sensitive lipid-based nano-carriers for multidrug-resistant cancers. RSC Adv. 2017; 7(48): 30008-30019.

26. Stojanovic R, Belscak-Cvitanovic A, Manojlovic V, Komes D, Nedovic V, Bugarski B. Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. J Sci Food Agr. 2012; 92(3): 685-696.

27. Asprea M, Leto I, Bergonzi MC, Bilia AR. Thyme essential oil loaded in nanocochleates: Encapsulation efficiency, in vitro release study and antioxidant activity. LWT-Food Sci Technol. 2017; 77: 497-502.

28. Sebaaly C, Jraij A, Fessi H, Charcosset C, Greige-Gerges H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. Food Chem. 2015; 178: 52-62.

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 4, January 2018

Original Article

The effect of sonication on thyme essential oil- containing nano-niosome as nano bio-detergents

Zohreh Karimi[1] , Samira Naderinezhad[2], Fateme Haghiralsadat[3]

[1]M.Sc., Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University, Taft, Yazd, Iran. [2]M.Sc., Department of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, School of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran.
[3]Ph.D., Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Due to antimicrobial properties of plants, lots of attention has been recently paid to the addition of natural ingredients to pharmaceutical, food and healthcare systems. The aim of this study was investigation and synthesis of thyme essential oil - containing nanoparticles as bio-detergents.

Material & Methods: Thyme essential oil was extracted and purified using Clevenger apparatus. Then nano -niosomes containing thyme essential oil was prepared by Bangham method using Tween 60, Span 60 and lipid cholesterol. Then, two methods were investigated in order to reduce the particles size (bath and probe sonication). The nanoparticles were characterized in term of release rate, size, zeta potential, morphology, infrared spectra and loading efficiency. The antibacterial properties of the detergent against *Staphylococcus aureus* were studied in term of the minimum bactericidal concentration (MBC), Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and inhibition zone.

Results: The results showed a smaller particle size resulted from probe sonication compared to bath sonication. The essential oil loading efficiency of particles prepared by bath sonication was 4.65% higher than the probe sonication method. Type of sonication did not change the zeta potential of nanoparticles. The essential oil was physically encapsulated in the nano-niosome, without changing its properties during encapsulation. The nanoparticle was uniformly disturbed with spherical structure. The results showed a significant anti-bacterial property of the detergents against *Staphylococcus aureus* (MBC of 15.625 µg/ml).

Conclusion: Bath sonication is economically recommended compared to probe sonication in preparation of nanoparticles. The results of this preliminary study introduce an anti-bacterial herbal detergent which can be more developed in further studies.

Keywords: Noisome, Herbal detergent, *Zataria multiflora*, Anti-bacterial, *Staphylococcus aureus*.

Correspondence to: Fateme Haghiralsadat

Tel: +98 9132507158

E-mail: fhaghirosadat@gmail.com

Journal of Microbial World 2018, 10(4): 310-321.

ǂ These authors contributed equally to this study.