مقاله تحقیقی

بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی کپسوله شده در بیوپلیمر کیتوسان در مقایسه با اسانس آزاد

سارا کمال الدین، معصومه مهدوی اورتاکند*، راحله صفایی جوان

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

*مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: masumehmahdavi@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

تاریخ دریافت:۹۸/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۹

چکیده

اسانس های گیاهی دارای اثرات ضدمیکروبی و فارماکولوژیکی متعددی هستند، اما بسیار فرار می باشند. کپسوله شدن مواد دارویی در نانو ذرات پلیمری می تواند اثرات درمانی ترکیباتی که عموما فرار هستند را بهبود دهد. کیتوسان به عنوان بیوپلیمر زیست تخریب پذیر به دلیل کپسوله کردن بهتر، رهاسازی کنترل شده و سمیت پایین در انتقال دارو بسیار مورد توجه می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی کپسوله شده در نانوژل های کیتوسان- اسید کافئیک در مقایسه با اسانس آزاد می باشد. ابتدا نانوژل، به روش خود تجمعی از پلیمر کیتوزان و اسید کافییک سنتز شد و پس از بررسی شکل و اندازه آنها با روش های اسپکترومتری (FTIR)، میکروسکوپی الکترونی نگاره (SEM)، از آن به منظور کپسوله کردن اسانس آویشن شیرازی استفاده شده است. سپس اثر ضدباکتریایی اسانس کپسوله شده و اسانس آزاد با روش دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث بررسی شد. نتایج نشان داد که اسانس کپسوله شده در مقایسه با اسانس آزاد، اثر ضد باکتریایی بیشتری بر علیه باکتری‌های مطالعه شده دارد.

واژه های کلیدی: اسانس آویشن شیرازی، کیتوسان، کپسوله شده، اثر ضد میکروبی

مقدمه

در حال حاضر، درمان با آنتی بیوتیک برای درمان عفونت های باکتریایی با مشکلات مختلفی مواجه است که درمان آنتی بیوتیک را محدود می کند. بنابراین، منابع گیاهی به دلیل عوارض جانبی پایین تر و در بعضی موارد اثرات بهتر و سریعتر توجه بیشتری را جلب می کنند. مطالعات انجام شده در این رابطه نشان می دهد که فعالیت های ضد میکروبی اسانس های گیاهی با توجه به ویژگی هایی مانند فرار و ناپایداربودن، حلالیت کم در آب و قابلیت اکسیداسیون اسانس ها، لازم است تکنیک های جدید برای افزایش فعالیت ضد میکروبی قبل از استفاده از آنها برای درمان کشف شود. یکی از مهمترین روش ها، استفاده از علوم نانو برای فرموله کردن و دستکاری اسانس ها برای افزایش کیفیت اثر و طولانی شدن فعالیت های بیولوژیکی است (۱). کپسوله کردن فرایندی است که در آن اجزای جامد، مایع و گاز درون کپسول‌های کوچک گنجانده می-شوند و می‌توان محتویاتشان را با سرعت کنترل شده رها کنند. نانو ذرات حمل کننده دارو از موادی همچون؛ کیتوسان، آلبومین، پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید و پلی اتیلن گالیکول ساخته می‌شوند (۲). کیتوسان فرم استیل زدایی شده کیتین که پلی ساکارید موجود در پوسته سخت پوستان است، می باشد. خصلت آب دوستی کیتوسان

ویژگی مهمی برای تشکیل نانوذرات خود تجمع است و به طور ذاتی برای کاربردهای دارورسانی مناسب است. حفره های آبگریز می توانند به عنوان انبار یا میکرو محفظه برای مواد زیست فعال گوناگون عمل کنند. این نانوذرات به دلیل ابعاد کوچکشان می توانند از طریق تزریق های درون وریدی برای دارورسانی هدفمند بکار گرفته شوند. اتصال اجزاء هدفدار به سطح نانوذرات بارگیری شده با دارو، می تواند بازده درمانی دارو را بهبود بخشد. علاوه بر این خصوصیات، زیست سازگاری و سمیت کم کیتوسان باعث شده است تا از آن برای انتقال ترکیبات درشت ملکول بهره برداری شود (۳،۴). کپسوله شدن مواد دارویی در نانوذرات پلیمری می‌تواند اثرات درمانی چنین ترکیباتی را بهبود دهد و کیتوسان به عنوان نانوپلیمر زیست تخریب پذیر به دلیل کپسوله کردن بهتر، رهاسازی کنترل شده و سمیت پایین در انتقال دارو بسیار مورد توجه می باشد (۵). با توجه به فراریت اسانس و ناپایداری آن در برابر عوامل محیطی کپسوله کردن آن، می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای نیمه عمر اسانس را افزایش داده و بنابراین استفاده از خاصیت ضد باکتریایی اسانس را به مدت طولانی تر، امکان پذیر می نماید (۶). آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* گیاهی از خانواده نعناعیان است. بر اساس مطالعات قبلی مشخص شده است که اسانس آویشن شیرازی می‌تواند از رشد اشریشیاکلی انتروهموراژیک، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس و همچنین سودوموناس آئروژنوزا، اسینتوباکتر بومانی، آلکالیژنز و کریزئوباکتریوم مننگوسپتیکوم جلوگیری به عمل آورد (۷). هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس آویشن شیرازی کپسوله شده در نانوژل های کیتوسان در مقایسه با اسانس آزاد بر روی باکتری های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری های گرم منفی اشریشیاکلی و سالمونلا انتریکا می باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج اسانس آویشن شیرازی و آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده آن

به منظور تهیه اسانس اندام های هوایی، گیاه آویشن شیرازی خریداری و شناسایی شده، به وسیله آسیاب برقی خرد شده و سپس ۲۰۰ گرم از پودر گیاه خشک پس از توزین با دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت اسانس گیری شد. در ادامه، اسانس با سولفات سدیم بدون آب، آبگیری و در ظرف درب بسته تیره رنگ، دور از نور و در یخچال نگهداری شد. نمونه آماده شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی (GC-MS) تزریق گردید از آنجایی که ترکیبات موجود در اسانس ها به لحاظ وزن مولکولی و قطبیت بعنوان مواد فرار شناخته می شوند از این رو عمل جداسازی و شناسایی ترکیبات متشکله اسانس بدست آمده توسط روش کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی انجام گردید. مشخصات و شرایط دستگاه GC: 7890A شرکت Agilent Technologies، نوع ستون HP-5MS بـا قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی متر، ضخامت فیلم ۰/۳۲ میکرومتر و طول ستون ۳۰ متر، گاز حامل هلیوم با سرعت ۱ میلی‌متر در دقیقه بود. مشخصات و شرایط دستگاه MS: مدل 5975C شرکت Agilent Technologies، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای یونیزاسیون ۲۴۰ درجه سانتی گراد بود. طیف های جرمی بدست آمده از دستگاه GC-MS با طیف های جرمی استاندارد موجود در منابع مقایسه گردید (۸). برای تایید شناسایی های انجام شده توسط طیف های جرمی، از شاخص بازداری کواتس مطابق GC-MS استفاده شد.

سنتز نانوژل

در این تحقیق نانوژل‌ها به روش خودتجمعی از کیتوزان با وزن مولکولی بالا (سیگما آلدریچ) و اسید کافئیک سنتز می شوند. برای این کار ابتدا ۰/۵ گرم کیتوزان در ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک ۰/۱ درصد حل گردید، سپس در دمای اتاق با سرعت ۲۵۰ rpm به مدت یک ساعت روی شیکر قرار داده شد. سپس ۸۵ میلی لیتر متانول به محلول اضافه شد و در دمای اتاق با سرعت ۲۵۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه شیک گردید. سپس اسید کافئیک به میزان ۲۲۱ میلی گرم با ۶۶۸ میکرولیتر اتیلن دی کلراید داخل یک میکروتیوپ حل شد و به آرامی با سمپلر به محلول اولیه اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه سونیکیت گردید. سپس این محلول در دمای اتاق، با سرعت ۲۵۰ rpm به مدت ۵ ساعت شیک گردید و pH آن با سود ۱ مولار روی ۸/۵ تا ۹

تنظیم شد و در انتها روی سرعت ۹۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ گردیده و محلول رویی را خالی کرده و رسوب را یک بار با الکل شستشو داده و ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و مرتبه بعدی با آب مقطر شسته شد و ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیده، سپس رسوب در دمای منفی ۸۰ فریز گردیده و به وسیله دستگاه فریز درای خشک گردید. در نهایت شکل، اندازه و ساختار نانوژل سنتز شده توسط طیف سنجی FT- IR (Nicolet IR100) و میکروسکوپ الکترونی نگاره SEM KYKY (EM3200) مورد بررسی قرار گرفت.

کپسوله کردن اسانس آویشن شیرازی

در این مرحله اسانس آویشن شیرازی توسط نانوژل بدست آمده کپسوله شد، برای این کار ابتدا ۱۷۰ میلی‌گرم اسانس آویشن شیرازی وزن گردید و به آن ۱۷۰ میلی‌گرم اتانول اضافه شد، جذب این محلول توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر خوانده شد. ۱۷۰ میلی گرم از نانو ژل به آن اضافه شد سپس به حجم ۳۵ میلی‌لیتر با آب مقطر رساند شد. بعد از آن به مدت ۵ دقیقه سونیکیت با قدرت ۷۰ هرتز گردید. سپس یک ساعت روی شیکر قرار داده شد. در آخر ۱۵ دقیقه سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm برای جداسازی ذرات انجام شد و رسوب حاصل را جدا کرده و جذب مایع رویی رسوب را نیز خوانده شد و در رابطه ۱ قرار گرفت و ظرفیت بارگذاری اسانس محاسبه شد (۹).

رابطه ۱)

$$Loading\ Efficiency\ \% = \left[\frac{OD_R - OD_S}{OD_R}\right] \times 100$$

تهیه سویه های باکتری استاندارد مورد مطالعه

باکتری های مورد مطالعه، باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* (ATCC 25922) و *Salmonella enterica* (ATCC 1231) و باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) بود که به صورت لیوفلیزه از کلکسیون میکروبی ایران در انستیتو پاستور خریداری شد.

بررسی اثر ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن[1]

ابتدا باکتری‌ها از حالت لیوفلیزه خارج شد و برای به دست آوردن تک کلونی کشت داده شد. سپس سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و باکتری ها روی محیط کشت مولر هینتون آگار به وسیله سوآپ به صورت چمنی کشت داده شدند. دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و دیسک بلنک از شرکت پادتن طب تهیه شد. دیسک‌های بلنک با ۱۰ میکرولیتر از اسانس آزاد آویشن شیرازی یا اسانس کپسوله با رقت‌های تهیه شده در ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آغشته شد. دیسک آنتی بیوتیک جنتامایسین (به عنوان کنترل مثبت) و یک دیسک بلاک حاوی ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل (به عنوان کنترل منفی) هم قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرارداده شد. برای هر نمونه باکتری این آزمایش سه بار تکرار شد. پس از آن قطرهاله عدم رشد باکتری به وسیله خط کش میلیمتری، اندازه گرفته شد و عدد میانگین هر سه پلیت محاسبه شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC[2]) به روش میکرودایلوشن براث

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، ابتدا اسانس آویشن شیرازی ابتدا توسط محلول ۵ درصد DMSO رقیق شد. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱۲۸ تا ۰/۰۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از اسانس آویشن شیرازی براساس روش سریال دایلوشن به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی افزوده شد. سوسپانسیون میکروبی که با نیم مک فارلند برابر شده بود به وسیله محیط کشت مولر هینتون براث به میزان ۱/۱۰۰، جهت به دست آوردن تعداد $۰/۵ \times ۱۰^{۶}$ CFU/ml رقیق شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌ها افزوده شد. در این آزمون به منظور کنترل محیط کشت، از محیط کشت خالی (بدون اسانس آویشن شیرازی و سوسپانسیون میکروبی) استفاده گردید. به منظور کنترل زمینه از اسانس آویشن شیرازی و محیط کشت (بدون سوسپانسیون میکروبی) استفاده شد. سوسپانسیون میکروبی و محیط

[1] Disk diffusion

[2] minimum inhibitory concentration

کشت بدون اسانس آویشن شیرازی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. در نهایت میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، انکوبه شد. پایین‌ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد و فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بود به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. این آزمایش برای هر باکتری سه بار تکرار گردید. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس کپسوله شده، ابتدا استوک ذخیره نانواسانس را تهیه شد. به این منظور، از رسوب نانواسانس، به میزان ۱۰۰ میلی گرم برداشته و با آب مقطر استریل به حجم ۱ میلی لیتر رسانده و به مدت ۲۰ دقیقه سونیکیت گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های ۲۰۰۰ تا ۰/۹۷ میکروگرم بر میلی لیتر از اسانس کپسوله براساس روش سریال دایلوشن به یک ردیف از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی افزوده شد. بقیه مراحل مانند روش ذکر شده در بالا انجام گرفت و MIC نانواسانس بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری تعیین گردید.

بررسی حداقل غلظت کشنده آ(MBC)

از رقت MIC و چند رقت بالاتر از آن به میزان ۲۰ میکرولیتر در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباتورگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی گردیده و اولین رقت که در آن رشدی روی محیط کشت دیده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری ها گزارش گردید. این مرحله نیز برای هر باکتری سه بار تکرار شد.

نتایج

نتایج آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی

پس از تزریق حجم ۱ میکرولیتر از آن اسانس استخراج شده از گیاه آویشن شیرازی به دستگاه GC-MS، با توجه به الگوی خروج آلکان های نرمال، شاخص بازداری و اندیس کواتس و تطبیق آنها با الگوهای کتابخانه ای، طیف ها ی مربوط به هر ترکیب تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس شناسایی شدند. مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده عبارت بودند از تیمول با ۳۳/۳۳ درصد و کارواکرول با ۲۸/۶۹ درصد.

نتایج سنتز نانوژل

نانوژل سنتز شده از نظر شکل و اندازه با روش های طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) و میکروسکوپ الکترونی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج طیف بینی FTIR

ساختار شیمیایی و نوع گروه‌های عاملی کیتوزان، اسید کافئیک و نانوژل (کیتوان و اسید کافئیک) سنتز شده با استفاده از طیف تبدیل فوریه‌ی زیر قرمز (FTIR) شناسایی شد (شکل ۲). با توجه به این که هر پیک نشان دهنده میزان جذب در عدد موجی متناظر با آن می باشد و توسط یک پیوند شیمیایی مشخص ایجاد می شوند، در نتیجه عدد موجی هر پیک نشان دهنده حضور یک گروه عاملی خاص در نمونه خواهد بود. پیک مشاهده شده در عدد موج cm^{-1} ۳۴۲۹/۴۰ مربوط به گروه‌های عاملی الکل‌ها و فنل‌ها، آمین‌های نوع اول و دوم و همچنین آمیدها است. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۲۸۷۶/۳۱ مربوط به گروه‌های کربوکسیل و همچنین آلکانهایی مثل متان است. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۲۲۰۲/۱۴ مربوط به نیتریل‌ها می‌باشد. آلکین ها نیز در این محدوده پیک ایجاد می کنند. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۱۵۸۸/۴۰ و cm^{-1} ۱۶۶۰/۱۱ مربوط به گروه‌های عاملی آمین‌های نوع اول و آمیدها است. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۱۴۲۱/۶۱ مربوط به ترکیبات دارای گروه های نیترومتان و برخی کشیدگی های غیرمتقارن است. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۱۰۸۱/۴۷ مربوط به گروه‌های عاملی کربوکسیل، الکل‌ها، آمین های آلیفاتیک، استرها و اترهای با پیوند یگانه می‌باشد. پیک مشاهده شده در cm^{-1} ۶۵۶/۹۹ مربوط به ترکیبات آلکین است. بر این اساس، طیف FTIR نشان دهنده وجود پیوندهای کووالانسی بین کیتوزان و اسید کافئیک در ساختار نانوژل بود.

[3] minimum bactericidal concentration

نتایج میکروسکوپ الکترونی SEM

مورفولوژی نانوذره را از طریق میکروسکوپ الکترونی نیز بررسی گردید و مشاهده شد که ساختار نانوذرات کروی با سطحی صاف هستند (شکل ۳). همچنین نتایج نشان داد که میانگین قطر ذرات سنتز شده ۱۹/۴ نانومتر بود.

نتایج حاصل از کپسوله کردن اسانس آویشن شیرازی توسط نانوژل

پس از کپسوله کردن اسانس آویشن شیرازی توسط نانوژل، جذب محلول و جذب مایع رویی رسوب ایجاد شده پس از سانتریفوژ، توسط دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد و ظرفیت بارگذاری اسانس محاسبه شد که این مقدار ۶۰/۲۴ بود و نشان دهنده ذخیره شدن اسانس آویشن شیرازی در نانوژل بود.

نتایج بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس آزاد و کپسوله شده به روش دیسک دیفیوژن

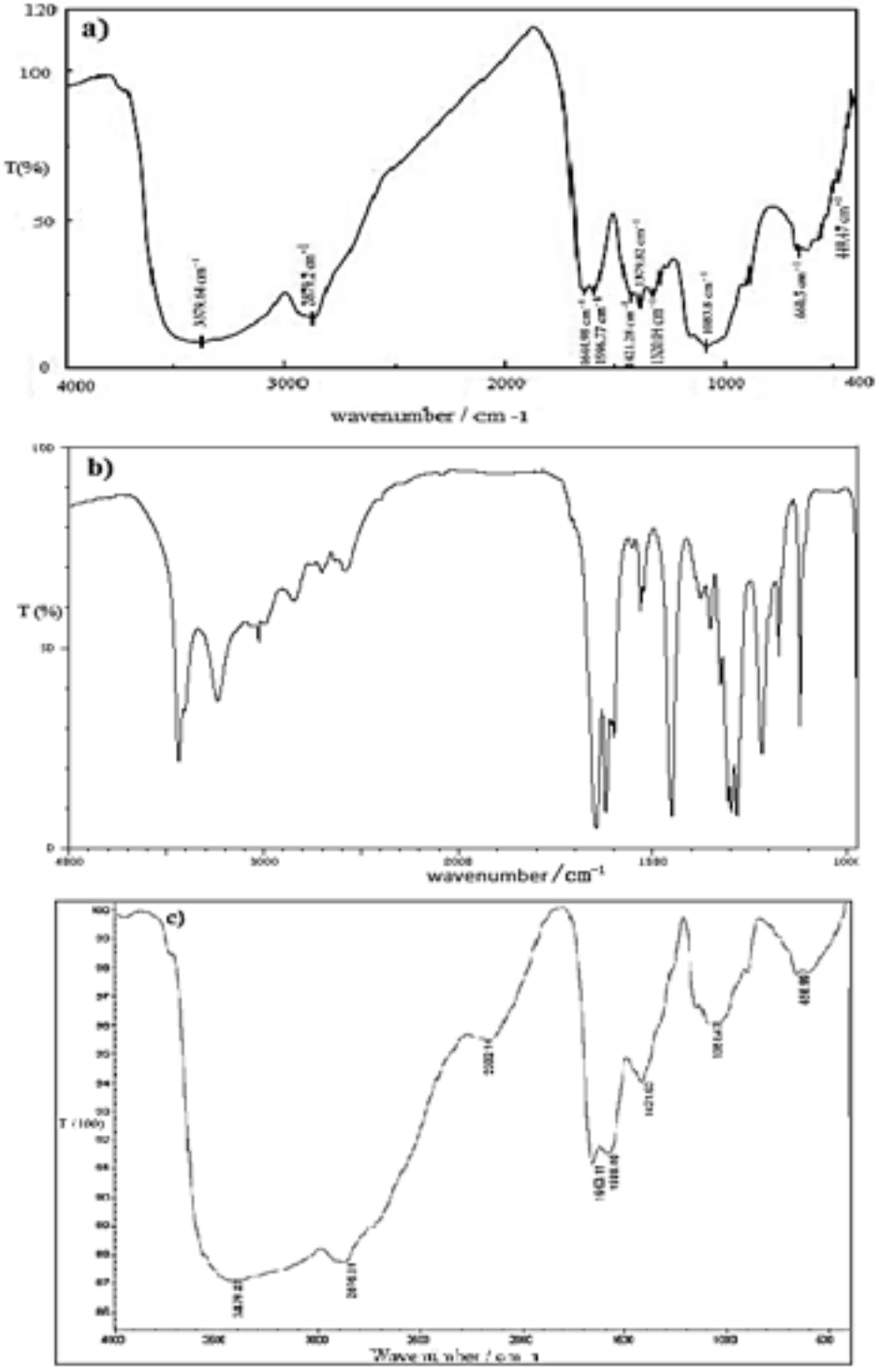
بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، قطرهاله‌ی عدم رشد باکتری اندازه گرفته شد و عدد میانگین هر سه پلیت (بر حسب میلی‌متر) محاسبه شد. در بررسی اثرات دیسک‌های حاوی محلول DMSO به عنوان کنترل منفی، بر روی هر چهار باکتری، هیچ هاله ای مشاهده نشد. تمام باکتری ها در برابر جنتامایسین حساس بود. نتایج بدست آمده از بررسی هاله ها نشان می دهد خواص ضد میکروبی اسانس کپسوله نسبت به اسانس آزاد بیشتر است (جدول ۱). بیشترین قطر هاله عدم رشد برای اسانس کپسوله در باکتری اشرشیاکلی مشاهده شد. همچنین با تاثیر اسانس کپسوله کمترین قطر هاله عدم رشد در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمد.

نتایج بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی به روش میکرودایلوشن

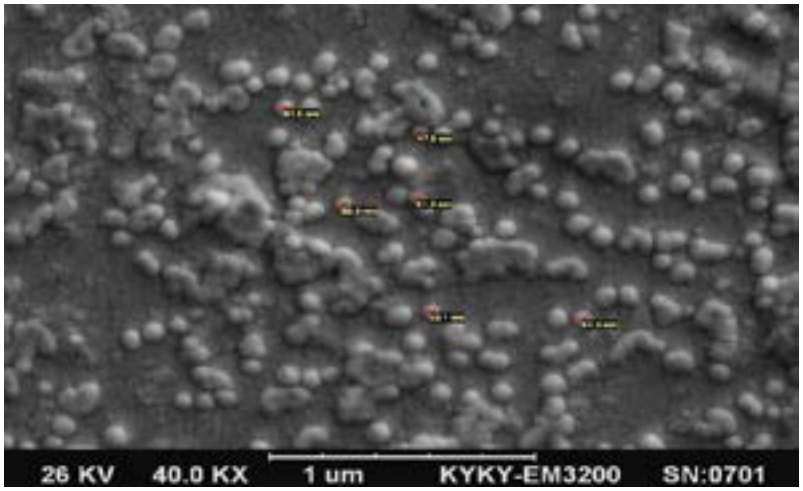
بر طبق این نتایج اسانس آزاد آویشن شیرازی بیشترین تاثیر ضدباکتریایی روی باکتری اشریشیاکلی حداقل غلظت بازدارندگی برای این باکتری ۸ میکروگرم برمیلی لیتر بدست آمد. کمترین تاثیر اسانس روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا انتریکا بود و MIC آن ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. نتایج بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس کپسوله شده روی باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد که باکتری اشریشیاکلی همچنان حساس ترین باکتری به اسانس کپسوله بود و MIC آن ۰/۷۸ میکروگرم برمیلی لیتر به دست آمد. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس هم مقاوم ترین باکتری و MIC آن ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. نتایج MIC و MBC اسانس آویشن شیرازی و اسانس کپسوله شده برای چهار باکتری مورد بررسی در جدول ۲ مشاهده می‌شود.

بحث

امروزه روش های نوین درمان و کاربرد های گیاهان دارویی در درمان عفونت های میکروبی به دلیل افزایش مقاومت‌های دارویی ضروری به نظر میرسد. اسانس های گیاهی از جمله مهمترین ترکیبات گیاهی هستن که دارای خواص ضدمیکروبی شناخته شده می باشند. ولی این ترکیبات بسیار فرار هستند که این مساله اثرات مثبت آنها را تحت تاثیر قرار می دهد. یکی از مهمترین روش های نانوبیوتکنولوژی، استفاده از علوم نانو برای فرموله کردن و دستکاری اسانس ها برای افزایش کیفیت و اثر و طولانی شدن فعالیت های بیولوژیکی است. کپسوله شدن مواد دارویی از جمله اسانس ها در نانوذرات پلیمری می‌تواند اثرات درمانی چنین ترکیباتی را بهبود دهد و کیتوسان به عنوان نانوپلیمر زیست تخریب پذیر به دلیل کپسوله کردن بهتر، رهاسازی کنترل شده و سمیت پایین در این زمینه بسیار مورد توجه است (۱۰،۱۱).



شکل ۲ - طیف FTIR: a) کیتوزان، b) اسیدکافئیک و c) نانوژل (کیتوزان و اسید کافئیک).



شکل ۳ - بررسی شکل نانوژل توسط میکروسکوپ الکترونی SEM.

جدول ۱- میانگین قطرهاله‌ی عدم رشد (بر حسب میلی متر) در حضور جنتامایسین، اسانس آویشن شیرازی و اسانس کپسوله.

سویه های مورد مطالعه	دیسک جنتامایسین (10 µg)	اسانس آزاد آویشن	اسانس کپسوله
E. coli ATCC25922	۱۹±۱/۰	۹±۱/۰	۱۴±۱/۰
S. enterica ATCC1231	۲۱±۰/۰	۸/۳۳±۰/۵۸	۱۱/۶۶±۰/۵۸
S. aureus ATCC6536	۲۰±۰/۰	۷/۳۳±۰/۶۶	۸±۰/۰
B. subtilis ATCC6633	۲۲±۱/۰	۸±۰/۰	۱۰±۰/۰

جدول ۲ - نتایج بررسی حداقل غلظت مهارکننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) اسانس آزاد آویشن شیرازی و اسانس کپسوله شده.

سویه های مطالعه شده	اسانس آزاد		اسانس کپسوله شده	
	MIC	MBC	MIC	MBC
E. coli ATCC25922	۸	۱۶	۰/۷۸	۱/۵۶
S. enterica ATCC1231	۳۲	۶۴	۱/۵۶	۱/۵۶
S. aureus ATCC6536	۳۲	۳۲	۳/۱۲	۶/۵۲
B. subtilis ATCC6633	۱۶	۱۶	۱/۵۶	۳/۱۲

در پژوهش حاضر نانوژل‌ها به روش خود تجمعی از کیتوسان و اسید کافئیک سنتز شدند. شکل و اندازه نانوژل-های سنتز شده با روش های اسپکترومتری (FTIR) و میکروسکوپی الکترونی (SEM) سنتز و تائید شد. تمامی ذرات نانوژل قطر ۱۹/۴ نانومتر داشتند و کروی با سطحی صاف بودند. پس از کپسوله کردن اسانس آویشن شیرازی توسط نانوژل، ظرفیت بارگذاری آن ۶۰/۲۴ بدست آمد و نشان دهنده ذخیره شدن اسانس آویشن شیرازی در نانوژل بود. اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از GC-MS آنالیز شد. ترکیب اصلی تشکیل دهنده

اسانس شامل تیمول با ۳۳/۳۳ درصد و کارواکرول با ۲۸/۶۹ درصد به دست آمد که بخش مهمی از اثر ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی به دلیل وجود این ترکیبات می باشد و مقالات مشابه همخوانی دارد (۱۲). مکانیسم اثر کارواکرول و تیمول به عنوان ترکیبات اصلی اسانس آویشن شیرازی بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. تیمول و کارواکرول بسیار به یکدیگر شبیه بوده و تفاوت آنها در داشتن گروه هیدروکسیل در جایگاه‌های مختلف در حلقه فنلی است و هر دو موجب افزایش نفوذپذیری غشاء سلول می‌گردند. این دو ترکیب قادرند غشاء خارجی باکتری‌ها را تخریب کنند و موجب خارج شدن لیپوپلی ساکارید (LPS) و افزایش نفوذپذیری سیتوپلاسمی به ATP شوند. مطالعات نشان داده است که غشاء در حضور کارواکرول فوراً دچار افزایش سیالیت می‌گردد. همچنین مشخص شده است که سطح ATP داخل سلول کاهش می‌یابد که یا به علت کاهش سنتز و یا به علت افزایش هیدرولیز ATP می‌باشد. گرادیان pHتضعیف شده و در حضور مقادیر بیشتر کارواکرول کاملا از بین می‌رود .علاوه بر این سطح داخل سلولی یون‌های پتاسیم کاهش یافته در حالیکه میزان این یون در خارج سلول به طور متناوب افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد که کارواکرول در سراسر غشاء ایجاد کانال‌هایی می‌کند که اجازه خروج یون پتاسیم از سیتوپلاسم را می‌دهد (۱۳،۱۴).

در ادامه تحقیق اثر ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی و اسانس کپسوله شده روی چهار باکتری *Escherichia coli*، *Salmonella enterica*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* بررسی شده و حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس آزاد با اسانس کپسوله شده مقایسه گردید. نتایج بررسی اثرات ضدمیکروبی در این مطالعه نشان داد که اسانس آزاد و کپسوله شده بیشترین تاثیر را روی باکتری اشرشیاکلی داشتند و روی سایر باکتری مورد مطالعه نیز موثر بودند. همچنین نتایج نشان داد که اسانس کپسوله شده در مقایسه با اسانس آزاد، اثر مهار کنندگی بیشتری علیه باکتری‌های مطالعه شده دارد.

از جمله تحقیقاتی که در مورد خواص اسانس نانوکپسول شده تاکنون انجام شده است می توان به مطالعه Khalili و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در پژوهشی کپسوله کردن اسانس آویشن (*Thymus vulgaris*) در نانوژل های سنتز شده از کیتوسان و بنزوئیک اسید به منظور افزایش نیمه عمر اسانس و افزایش فعالیت ضد قارچی آن انجام دادند، حداقل غلظت مهاری نانو ژل های حاوی اسانس بر ضد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در دو شرایط محیط باز و بسته محاسبه شد و با حداقل غلظت مهاری آویشن آزاد مقایسه شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که حداقل غلظت مهاری نانوژل‌های حاوی اسانس آویشن ppm ۵۰۰ است و خاصیت ضد قارچی قابل توجه ای بر ضد قارچ آسپرژیلوس فلاووس دارا می باشد (۱۵). Zhaveh و همکارانش در سال ۲۰۱۵ اسانس دارچین *Cuminum cyminum* را با کیتوسان و کافئیک اسید، برای بهبود عملکرد ضد میکروبی و پایداری این اسانس کپسوله کردند و برعلیه *Aspergillus flavus* مورد استفاده قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی اسانس های *C. cyminum* آزاد و کپسول شده در برابر *A. flavus* در به ترتیب ۶۵۰ و ۳۵۰ ppm می‌باشد (۱۶). Darabad در سال ۲۰۱۵ مطالعه ای بر روی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاهان *Artemisia sieberi*, *Lavandula angustifolia, Artemisia sieberi, Myrtus communis* و *Cinnamomum vera* که در نانوژل های کیتوسان کپسوله شده بودند را در برابر باکتری های موثر در سینوزیت که یکی از بیماری های عفونی شایع است انجام داد. در این بررسی که بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفت، مشاهده شد که حداقل غلظت مهاری اسانس کپسوله ۰/۰۹۷ میکروگرم بر میلی لیتر برای *S. pneumonia* با نانو اسانس اسطوخودوس، ۰/۰۹۷ میکروگرم برمیلی لیتر، برای استرپتوکوکوس پیوژنز با نانو اسانس درمنه و اسطوخودوس، ۱/۵۶۲ میکروگرم بر میلی لیتر برای استافیلوکوکوس اورئوس با نانو اسانس درمنه و ۳/۲۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای سودوموناس آئروژینوزا با نانو اسانس درمنه و اسطوخودوس است. نتایج نشان داد که تاثیر اسانس کپسوله شده روی چهار میکروارگانیسم اصلی سینوزیت قابل ملاحظه است و همچنین یافته ها نشان داد که نانواسانس ها را می توان به دلیل داشتن عوارض جانبی کمتر برای از بین بردن این میکروارگانیسم ها در تهیه دارو ضد سینوزیت مورد استفاده قرار داد (۱۷).

نتیجه گیری

توجه به فراریت اسانس ها به نظر می رسد می‌توان با کپسوله کردن این ترکیبات نیمه عمر آنها را افزایش داد. این یافته ها می‌تواند به درمان با گیاهان دارویی به منظور دستیابی به عملکرد بهتر اسانس ها، منجر شود. با نیاز صنایع داروسازی برای تولید محصولات آنتی بیوتیک جدید با روش های نوین و بر پایه مواد بیولوژیک برای مقابله با باکتری های دارای سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در بیمارستان ها، دستیابی به داروهای طبیعی و غیرشیمیایی سالم ضروری به نظر می رسد. در این رابطه استفاده از گیاهان بومی ایران با خواص ضد میکروبی و کپسوله کردن آن با نانوذرات کیتوسان، می‌تواند روش نوینی در درمان عفونت های ناشی از باکتری ها باشد. یافته‌های این پژوهش، خاصیت ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی و اسانس کپسوله را به خوبی آشکار ساخت و نشان داد که اسانس کپسوله شده در مقایسه با اسانس آزاد، اثر ضدباکتریایی بیشتری بر علیه باکتری های مطالعه شده دارد. همچنین نتایج نشان داد که اسانس کپسوله آویشن شیرازی در مهار باکتری اشریشیاکلی نسبت به سایر باکتری های مطالعه شده موثرتر عمل می نماید.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Vishwakarma, G. S., Gautam, N., Babu, J. N., Mittal, S., Jaitak, V., 2016. Polymeric encapsulates of essential oils and their constituents: A review of preparation techniques, characterization, and sustainable release mechanisms. Polymer Reviews 56(4): 668-701.
2. Woranuch, S., Yoksan, R., 2013. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. Carbohydrate Polymers 96(2): 578-585.
3. Keawchaoon, L., Yoksan, R., 2011. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. Colloids and surfaces B: Biointerfaces 84(1): 163-171.
4. Sotelo-Boyás, M. E., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., and Corona-Rangel, M. L., 2017. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. LWT-Food Science and Technology 77: 15-20.
5. Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., Farahmandghavi, F., 2013. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. Carbohydrate Polymers 95(1): 50-56.
6. Negahban M., Moharramipour S., Zand M., Hashemi S. A., 2013. Repellent activity of nanoencapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on *Plutella xylostella* L. larvae. Iran J Med Aromatic Plant 29(4): 909–24.
7. Mahboubi M., Ghazian Bidgoli F., 2010. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. Phytomedicine 17: 548-50
8. Dehkordi N., Sajjadi S. E., Ghannadi A., Amanzadeh Y, Azadbakht M., Asghari G. R., Amin G.R., Hajiakhoondi A., Taleb A. M., 2002. Iranian Herbal Pharmacopeia.
9. Wang, T., Zhu, X. K., Xue, X. T., Wu, D. Y., 2012. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. Carbohydrate polymers 88(1): 75-83.
10. Beyki, M., Zhaveh, S., Khalili, S.T., Rahmani-Cherati, T, Abollahi, A, Bayat, M, Tabatabaei, M., Mohsenifar, A., 2014. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. Industrial Crops and Products 54: 310-319.
11. Li, P., Zhao, J., Chen, Y., Cheng, B., Yu, Z., Zhao, Y., Yan, X., Tong, Z., and Jin, S., 2017. Preparation and characterization of chitosan physical hydrogels with enhanced mechanical and antibacterial properties. Carbohydrate Polymers 157: 1383-1392.
12. Saedi Dezaki, E., Mahmoudvand, H., Sharififar, F., Fallahi, S., Monzote, L. and Ezatkhah, F., 2016. Chemical composition along with anti-leishmanial and cytotoxic activity of *Zataria multiflora*. Pharmaceutical Biology 54(5): 752-758.
13. Ultee A., Bennik H.J., Moezelaar R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food- borne pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology 68: 1568-1561.

14. Burt S., 2004. Essential Listeria, *Staphylococcus aureus* oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. International Journal of Food Microbiology 94: 253-223.
15. Khalili, S. T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhaveh, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., Bayat, M., Tabatabaei, M., 2015. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. LWT-Food Science and Technology 60(1): 502-508.
16. Zhaveh, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S. T., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T., and Tabatabaei, M., 2015. Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. Industrial Crops and Products 69: 251-256.
17. Darabad, S. G., Mohsenifar, A., Yazdanparast, S. A., and Bayat, M., 2015. Antimicrobial Effects of *Lavandula angustifolia* Mill, *Artemisia sieberi* Besser, *Cinnamomum verum* J, Presl and Myrtus *communis* L, Encapsulated Essential Oils against Prevalent Microorganisms Causing Sinusitis. Thrita 4(2): e24773.