

Enhancing Antibacterial Properties: *Thymus daenensis* Oil in Nanostructured Delivery Systems Versus Traditional Form

Atrin Ashabani ¹,
Mehdi Raissy ²,
Reza Sharafati Chaleshtori ³

¹ DVM, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

² Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

³ Associate Professor, Biochemistry and Nutrition Research Center in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

(Received November 5, 2023; Accepted January 28, 2024)

Abstract

Background and purpose: Today, the use of medicinal plants such as *T. daenensis* as a complementary and effective treatment method to control and inhibit the growth of pathogenic microorganisms is increasing all over the world. This study aimed to investigate the antimicrobial effects of *T. daenensis* essential oil (EO) and its nanocapsulated against some pathogenic bacteria isolated from aquatic and food samples.

Materials and methods: In this experimental research, *T. daenensis* was collected in June 2023 in Shahrekord City. The EO of the dried aerial part of the plant was obtained by using a Clevenger device (steam distillation). The components in the EO were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-Mass). *T. daenensis* EO nanocapsules were prepared using Tween 20, Tween 80 as emulsifier, polyethylene glycol as a co-solvent, acidic chitosan solution (1%), and modified starch (5%) as a coating. Transmission electron microscope (TEM) and dynamic light scattering (DLS) were used to confirm their structure. Antimicrobial properties against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from aquatic samples (fish and lobster) and various foods (raw milk, traditional ice cream and mutton, beef, chicken) were investigated by disc diffusion method, determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal (MBC) by microdilution method. Also, the prevention of biofilm formation was investigated.

Results: The main components of the *T. daenensis* EO were thymol (75.31 percent), 8 p-Cymene (4.62 percent), carvacrol (4.2 percent), trans-caryophyllene (3.01 percent), terpenine (2.01 percent) and beta-myrcin (1.21 percent), respectively. TEM and DLS methods confirmed the structure of the *T. daenensis* EO nanocapsules. The size of nanocapsules was between 50 and 90 nm. The MIC amounts for the mentioned bacteria were between 62.5 and 250 µg/ml. The lowest MIC value for *P. mirabilis*, *S. aureus*, and *K. pneumoniae* was reported with a concentration of 62.5 µg/ml of *T. daenensis* EO nanocapsule. Also, the amounts of MBC for the mentioned bacteria were between 125 and 1000 µg/ml. According to the obtained results, the MIC and MBC levels for all mentioned bacteria against *T. daenensis* EO nanocapsule were lower than the EO alone ($P < 0.05$). According to the results, with the increase in the concentration of EO, the diameter of the non-growth halo increased, while these results were not the same for *T. daenensis* EO nanocapsule. In all bacteria except *S. aureus*, the diameter of the non-growth halo for different concentrations of EO was greater than that of *T. daenensis* EO nanocapsule. The inhibition percentage of biofilm production was also reported 100% at 125 and 250 µg/ml of *T. daenensis* EO nanocapsule, except for *K. pneumoniae*. In all concentrations of *T. daenensis* EO nanocapsule, the percentage of bacteria biofilm reduction was significantly higher than the EO alone ($P < 0.05$).

Conclusion: Based on the findings of the study, the *T. daenensis* EO nanocapsule had more antibacterial properties than EO alone. It is suggested that future studies for the toxicology of *T. daenensis* EO nanocapsule on normal and cancerous cells be done iv-vitro. In addition, to apply it in the food industry, experimental studies on food models should also be conducted.

Keywords: nanocapsule, *Thymus daenensis*, pathogenic bacteria, antimicrobial, gas chromatography

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 33 (229): 14-26 (Persian).

Corresponding Author: Mehdi Raissy - Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran (E-mail: mreissy@yahoo.com) and Reza Sharafati Chaleshtori - Biochemistry and Nutrition Research Center in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran. (E-mail: sharafati.reza@gmail.com)

افزایش ویژگی‌های ضد باکتریایی اسانس آویشن دنیایی در سیستم‌های رهایش نانوساختار در مقایسه با شکل سنتی

آترین اشعبانی^۱

مهدی رئیس^۲

رضا شرافتی چالشتری^۳

چکیده

سابقه و هدف: امروزه، استفاده از گیاهان دارویی نظیر آویشن دنیایی به عنوان یک روش درمانی مکمل و مؤثر جهت کنترل و مهار رشد انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در سراسر جهان در حال افزایش است. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس و نانو کپسول اسانس آویشن دنیایی علیه تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای جدا شده از نمونه‌های آبزیان و مواد غذایی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، آویشن دنیایی در خرداد ماه ۱۴۰۲، در شهرستان شهر کرد جمع آوری شد. اسانس اندام هوایی خشک شده گیاه با استفاده از دستگاه کلونجر (به روش تقطیر با بخار آب) به دست آمد. اجزای موجود در اسانس به روش گاز کروماتوگرافی طیف سنج جرمی (GC-Mass) شناسایی شدند. نانو کپسول اسانس آویشن دنیایی با استفاده از 20 Tween 80، به عنوان امولسیفایر، پلی اتیلن گلیکول به عنوان حلال کمکی، محلول کیتوزان اسیدی (۱ درصد) و نشاسته اصلاح شده (۵ درصد) به عنوان پوشش، تهیه شد. جهت تأیید ساختار نانو کپسول اسانس از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و پراکندگی نور دینامیکی (DLS) استفاده شد. خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های لیستریا مونوسیژنوز، شرشیا کلای، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تایفی موریوم، پروتئوس میرابیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های آبزیان (ماهی و لایستر) و انواع مواد غذایی (شیر خام، بستنی سنتی و گوشت گوسفند، گاو، مرغ) به روش‌های انتشار دیسک، تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) و کشندگی (MBC) به روش میکرودايلوشن و ممانعت از تشکیل بیوفیلم بررسی شد.

یافته‌ها: براساس آنالیز اجزای اسانس عمده ترکیبات اسانس آویشن دنیایی به ترتیب مربوط به تیمول (۷۵/۳۱ درصد)، p-Cymene 8 (۴/۶۲ درصد)، کارواکرول (۴/۲ درصد)، trans-Caryophyllene (۳/۰۱ درصد)، ترپنین (۲/۰۱ درصد) و بتا میرسین (۱/۲۱ درصد) بود. با توجه به نتایج به دست آمده بر اساس روش TEM و DLS ساختار نانو کپسول اسانس آویشن دنیایی مورد تایید قرار گرفت. اندازه نانو کپسول ها بین ۵۰ تا ۹۰ نانومتر بود. میزان MIC برای باکتری‌های مذکور بین ۶۲/۵ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. کمترین میزان MIC برای پروتئوس میرابیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه با غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانو کپسول اسانس آویشن دنیایی گزارش شد. هم چنین میزان MBC برای باکتری‌های مذکور بین ۱۲۵ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. طبق نتایج به دست آمده میزان MIC و MBC برای همه باکتری‌های مذکور نسبت به نانو کپسول اسانس آویشن دنیایی کم تر از اسانس تنها بود ($P < 0.05$). براساس نتایج با افزایش غلظت اسانس، قطر هاله عدم رشد، افزایش نشان داد در حالی که این نتایج برای نانو کپسول اسانس این طور نبود. در تمام باکتری‌ها به جز استافیلوکوکوس اورئوس، قطر هاله عدم رشد برای غلظت‌های مختلف اسانس بیش تر از نانو کپسول اسانس بود. درصد مهار تولید بیوفیلم نیز در غلظت‌های ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانو کپسول آویشن به جز کلبسیلا پنومونیه ۱۰۰ درصد گزارش شد. در تمامی غلظت‌های نانو کپسول آویشن دنیایی، درصد کاهش بیوفیلم باکتری‌ها به طور معنی داری نسبت به اسانس تنها بیش تر بود ($P < 0.05$).

استنتاج: طبق نتایج به دست آمده ساختار نانو کپسول اسانس آویشن دنیایی نسبت به اسانس آن، دارای خواص ضد باکتریایی بیش تری بود. پیشنهاد می شود که مطالعه‌های آینده جهت سم شناسی نانو کپسول تهیه شده در سطح سلول‌های سالم و سرطانی در شرایط آزمایشگاهی صورت گیرد. به علاوه جهت کاربردی نمودن آن در صنعت غذا، مطالعه‌های تجربی در مدل‌های غذایی نیز انجام گیرد.

واژه های کلیدی: نانو کپسول، آویشن دنیایی، باکتری بیماری زا، ضد میکروبی، گاز کروماتوگرافی

E-mail: mreissy@yahoo.com

E-mail: sharafati.reza@gmail.com

مؤلف مسئول: مهدی رئیس - شهر کرد: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر کرد

و رضا شرافتی چالشتری - کاشان: دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک

۱. دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد، ایران

۲. استاد، دانشکده دامپزشکی، واحد شهر کرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر کرد، ایران

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۸/۲۸ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۱/۸

مقدمه

تهیه برخی از مواد موثره فعال که در صنایع دارویی اهمیت بسیاری دارند، به‌طور مصنوعی امکان‌پذیر نیست و تنها به‌صورت طبیعی از گیاهان موردنظر قابل استخراج‌اند. مواد دارویی مصنوعی (شیمیایی) البته به‌طور سریع اثر می‌بخشند و دارای یک تأثیر مشخص نیز می‌باشد ولی اکثر آن‌ها عوارض جانبی نامطلوبی روی بدن انسان برجا می‌گذارند. در حالی که مواد دارویی حاصل از گیاهان با آن‌که به تدریج تأثیر می‌بخشند ولی اثرات مفید جانبی داشته و فواید زیادی از نظر دوام سلامت بدن دارند. امروزه استفاده از مواد موثره گیاهان در صنایع غذایی، داروسازی و پژوهش‌های علمی مختلف، رشد روزافزون دارد (۱-۳). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بخش مهمی از ساختار دفاعی سلول جهت مقابله با آثار زیان‌بار رادیکال‌های آزاد بر روی ماکرومولکول‌های سلولی نظیر پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و DNA را تشکیل می‌دهند. چون رادیکال‌های آزاد و سایر فرم‌های فعال اکسیژن تحت تأثیر مواد محرک شیمیایی خارجی و یا فرآیندهای متابولیکی درونی بدن انسان تولید می‌شوند، لذا استفاده از مواد غذایی حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدان و نیز مکمل‌های آنتی‌اکسیداتیو در کاهش صدمات اکسیداتیو بر روی بدن انسان مؤثر خواهد بود (۳).

خانواده نعناعیان (Lamiaceae) یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی، تیره مهمی از گیاهان گروه نهان‌دانگان (بزرگ‌ترین گروه گیاهان آوندی) از رده دو لپه‌ای‌ها و از زیر رده پیوسته گلبرگ‌ها، که دارای پراکنش جهانی می‌باشد. جنس آویشن دارای ۲۱۵ گونه و از مهم‌ترین جنس‌ها در این خانواده است (۴، ۵). آویشن دنا با نام علمی *Thymus daenensi*، گیاهی است علفی و چندساله، ساقه‌های متعدد و پر پشت که برگ‌های متقابل، کوچک، بیضوی یا تخم مرغی شکل دارد، گل‌هایی به رنگ سفید مایل به ارغوانی یا بنفش و مجتمع در کنار برگ‌ها دارد. این گیاه در مناطقی از استان‌های کهگیلویه و بویراحمد (کوه دنا)، فارس،

چهارمحال و بختیاری، همدان، ایلام، مرکزی، در استان کردستان در شهرستان‌های بیجار، کامیاران و دیواندره در شیب‌های شمال و شمال غربی رویش دارد. مواد مؤثره آویشن از سرشاخه‌های گل دار و برگ‌های خشک شده گیاه به دست می‌آید، که در صنایع مختلف مانند داروسازی و صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶، ۷). از این گیاه به صورت سنتی با هدف‌های درمانی مانند ضد نفخ، کمک به هضم غذا، ضد اسپاسم، درمان سرماخوردگی استفاده می‌کنند. اثر ضد قارچی، ضد انگلی و ضد باکتریایی این گیاه به اثبات رسیده است (۸، ۹). در یک مطالعه کارآزمایی بالینی اثر شربت آویشن دنا با همراه با عنباب سبب کاهش فشار خون شد (۱۰). به‌علاوه استفاده از ژل حاوی ۵ درصد آویشن دنا با سبب بهبود علائم بیماران با استئوآرتریت زانو شده بود (۱۱). مطالعات قبلی حاکی از وجود انواع ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها در اسانس آویشن دنا است که با توجه به مناطق مختلف تفاوت‌هایی را نشان داده‌اند. بیش‌ترین ترکیبات شناسایی شده شامل تیمول، پارا-سیمن، ژرانیول، متیل کارواکرول و غیره بوده‌اند (۱۲، ۱۳).

نانوکپسول‌ها، ساختارهایی با اندازه‌هایی بین ۱۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر می‌باشند که دارای یک پوسته، دیواره و یک فضای خالی داخل آن جهت قرار گرفتن و حمل مواد مورد نظر می‌باشند. به مواد مورد نظر که درون این فضا ذخیره می‌شوند نیز هسته، فاز درونی، محموله یا ماده پوشاننده می‌گویند. نانو کپسول‌ها با الهام از فسفولیپیدها ساخته شده‌اند. فسفولیپیدها با یک سر آبدوست و یک سر آب‌گریز وقتی در یک محیط آبی قرار می‌گیرند، تشکیل کپسول‌هایی را می‌دهند که سر آبدوست آن در بیرون و سر آب‌گریز مولکول در درون آن قرار می‌گیرند. نانو کپسول‌ها با توجه به محموله خاصی که در داخل آن‌ها قرار می‌گیرد سنتز می‌شوند. بنابراین خواص آن‌ها نیز در واقع به نحوه سنتز، ماهیت، کاربرد و محموله آن تعیین می‌شود ولی دارای خواص عمومی مشترکی نیز هستند. امروزه تأثیر نانو کپسول‌ها در

علوم پزشکی و دامپزشکی مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱۵، ۱۴). در مطالعه مروری تیاگ و همکاران (۲۰۲۰)، استفاده از ساختارهای نانویی به جهت بهبود زیست دسترسی انواع مواد موثره اسانس‌ها، عصاره‌ها و داروها را گزارش دادند. این نوع ساختارها سبب افزایش رهایش ترکیبات نامحلول در آب، کاهش اثرات جانبی داروها و کاهش تخریب ترکیبات موثره در سطح خارج سلولی و داخل سلولی می‌شوند (۱۶). در بررسی رضایی و همکاران (۲۰۲۱)، با ادغام اسانس آویشن در نانو اسفنج‌های بتا سیکلودکسترین، پایداری حرارتی اسانس آویشن را به طور قابل توجهی افزایش دادند و باعث افزایش فعالیت ضد باکتریایی آن شدند (۱۷).

در مطالعه دیگری بررسی اثر نانو کپسول زئین حاوی اسانس آویشن دناپی جهت افزایش زمان ماندگاری نان مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزودن شکل نانو کپسول اسانس بیش‌ترین اثر ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت را نسبت به گرم منفی داشت و هم‌چنین از تکثیر کپک و مخمر در نان جلوگیری نمود (۱۸). بنابراین با توجه به این که اسانس‌ها می‌توانند دچار اکسایش شوند و در محیط‌های آبی غیر محلول هستند. جهت افزایش پایداری، پوشاندن بوی تند آن‌ها، کاهش فراریت و اکسایش و هم‌چنین تبدیل از شکل مایع به پودر آن‌ها را به شکل میکروکپسوله تبدیل می‌کنند (۱۵، ۱۸). نشاسته و کیتوزان پلی ساکاریدهای با خواص غیر سمی، با قابلیت زیست تخریب‌پذیری و مناسب برای ایجاد ساختار فیلم هستند. به همین دلیل در سال‌های اخیر از این ترکیبات برای تهیه بیوکامپوزیت‌های سبز استفاده می‌شود (۱۹).

افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها علیه عفونت‌های باکتریایی، احتمال افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و هم‌چنین دیدگاه مصرف‌کنندگان در استفاده از ترکیبات طبیعی، سبب شده مطالعات وسیعی برای تولید داروهای ضد میکروبی جدید با اثر بخشی بیش‌تر صورت گیرد. به‌علاوه با توجه به اثرات سوء نگهدارنده‌های شیمیایی

در مواد غذایی فرآوری شده، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی بی‌خطر از جمله اسانس‌ها و ساختارهای نوین نانویی غیر سمی امری ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی ترکیبات موجود در اسانس آویشن دناپی، آثار ضد میکروبی اسانس و شکل نانو کپسوله شده آن علیه لیستریا مونوسیژنر، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلائی، سالمونلا تایفی موریم، پروتئوس میرابیلیس و کلبسیلا پنومونیه بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس و شناسایی اجزا

در این مطالعه تجربی، آویشن دناپی در خرداد ماه ۱۴۰۲ در شهرستان شهرکرد جمع‌آوری و به محل آزمایشگاه تغذیه و محصولات اورگانیک دانشگاه آزاد شهرکرد منتقل شدند. گیاهان جمع‌آوری شده توسط مرکز تحقیقات فرآوری گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تایید شدند. جهت اسانس‌گیری به روش تقطیر با دستگاه کلونجر، ۱۵۰ گرم پودر خشک (اندام هوایی) از اندام به دستگاه منتقل و به مدت ۳ ساعت اسانس‌گیری انجام شد. جهت شناسایی ترکیبات موجود در اسانس از دستگاه گاز کروماتوگرافی Agilent 6890 مجهز به طیف نگار جرمی با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر از نوع BPX5 استفاده شد. برای شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس نمونه توسط هگزان-N رقیق شده و به مقدار ۱ میکرولیتر به دستگاه GC/MS تزریق شد، برنامه دمایی ستون به این صورت تنظیم گردید، دمای ابتدای آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، شیب حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه توقف در این دما و زمان پاسخ ۷۵ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌متر در دقیقه استفاده گردید.

طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل 5973 Agilent با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی گراد بود. محدوده اسکن مس‌ها از ۴۰ تا ۵۰۰ تنظیم گردید. نرم افزار مورد استفاده Chemstation بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداري آن‌ها و مقایسه آن‌ها با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت (۱۵).

تهیه نانو کپسول اسانس

جهت تهیه نانو کپسول اسانس آویشن دنايي، ۸۰۰ میکرولیتر Tween 20 با ۸۰۰ میکرولیتر Tween 80 به عنوان امولسیفایر و ۴۰۰ میکرولیتر پلی اتیلن گلیکول به عنوان حلال کمکی مخلوط شدند (۱۹). سپس برای دستیابی به نانوامولسیون پایدار، نسبت امولسیفایر به اسانس از ۰/۱ به ۲ تغییر کرد تا نهایتاً، پایدارترین امولسیون با نسبت ۰/۶، در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به دست آمد. سنتز تمامی نانوامولسیون‌ها با استفاده از یک مولد امواج اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه (اولتراسونیک مدل UP400S شرکت هشر آلمان با توان ۴۰۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز) انجام شد. پس از آن ۱ گرم کیتوزان توسط اسید استیک به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و به آن ۲۰ میلی لیتر نشاسته اصلاح شده (۵ درصد) اضافه گردید. سپس نانو امولسیون آماده شده قبلی قطره قطره به این محلول اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه توسط مولد امواج اولتراسونیک در دمای اتاق قرار داده شد تا نانو کپسول‌ها تشکیل شوند. به منظور تأیید ساختار ذرات نانو کپسول از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (ZEIS 912 AB-100 KV) و پراکندگی نور دینامیکی (Zetasizer Nano ZS, model ZEN3500) (DLS) استفاده شد (۱۸).

تعیین اثر ضد میکروبی

جهت تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس و نانو کپسول

آویشن دنايي از روش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودايلوشن استفاده شد (۲۰، ۱۷). باکتری‌های گرم مثبت شامل، لیستریا مونوسیترژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس و باکتری‌های گرم منفی شامل، اشرشیا کلاي، سالمونلا تایفی موریوم، پروتئوس میرابیلیس و کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های آبریان (ماهی و لابستر) و انواع مواد غذایی (شیر خام، بستنی سنتی و گوشت گوسفند، گاو، مرغ) موجود در بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشگاه آزاد واحد شهر کرد تهیه شدند، می‌باشد. سپس هر باکتری جهت تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلند به محیط کشت نوترینت براث منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. سوسپانسیون باکتری‌های تهیه شده با غلظت نیم مک فارلند (10^8 CFU/mL) در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (جذب نوری بین ۰/۸-۰/۱۳)، با روش شمارش باکتری‌ها در محیط کشت نیز تأیید شدند. به منظور بررسی اثر ضد میکروبی با روش انتشار دیسک، ابتدا نانو کپسول آویشن دنايي و اسانس آن در دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) با غلظت ۵ درصد با غلظت‌های ۶۲/۱۵ تا ۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه و سپس در زیر هود لامینار، ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت به دیسک‌های بلانک اضافه گردید. از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری نیز یک سوآپ برداشته و در محیط کشت مولر هیئتون آگار (مرک، آلمان) به صورت چمنی کشت داده شد و سپس دیسک‌ها بر روی محیط کشت قرار گرفتند. محیط کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری و سپس قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی متر اندازه گیری گردید. در روش میکرودايلوشن نیز، در هر چاهک پلیت الایزا ابتدا ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هیئتون براث (مرک، آلمان) و سپس ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند اضافه شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۳۱/۲۵ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر

$$\text{درصد کاهش بیوفیلیم} = \left[\frac{(c-b) - (t-b)}{(c-b)} \right] \times 100$$

b: جذب نوری برای کنترل مثبت،

c: جذب نوری برای کنترل منفی،

t: جذب نوری برای نمونه های تیمار شده

روش آنالیز آماری

نرم افزار SPSS نسخه ۱۴ جهت محاسبه میانگین و انحراف معیار نتایج به دست آمده حاصل از ۳ تکرار آزمون های میکروبی استفاده شد. مقایسه میانگین های بین تیمارها با روش آماری ANOVA و آزمون دانکن در $P < 0.05$ انجام شد.

یافته ها

نتایج به دست آمده در جدول شماره ۱ بیانگر آن است که آویشن دناپی دارای انواع ترکیبات و اجزاء موثره است. به ترتیب بیش ترین میزان مربوط به تیمول (۷۵/۳۱ درصد)، p-Cymene (۴/۶۲ درصد)، کارواکرویل (۴/۱۲ درصد)، trans-Cayophyllene (۳/۰۱ درصد)، ترپنین (۲/۰۱ درصد) و بتا میرسین (۱/۲۱ درصد) بود.

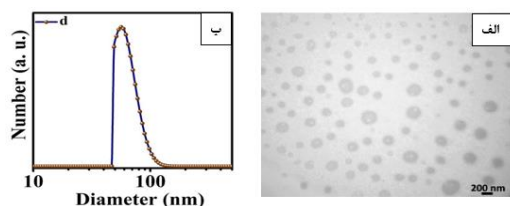
نتایج این تحقیق، توزیع مناسب و یکنواخت از پراکندگی قطرات اسانس در پوشش کیتوزان و نشاسته را نشان می دهد. همان طور که در تصویر شماره ۱-الف مشاهده می شود ساختار کروی و به صورت پخش در کل سوسپانسیون قابل مشاهده می باشد. در شکل شماره ۱-ب بر اساس روش DLS نیز اندازه نانوکپسول ها بین ۵۰ تا ۹۰ نانومتر است.

میزان MIC برای باکتری های مذکور بین ۶۲/۵ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. کم ترین میزان MIC برای پروتئوس میرابیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه با غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانوکپسول اسانس آویشن دناپی گزارش شد. هم چنین میزان MBC برای باکتری های مذکور بین ۱۲۵ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. کم ترین میزان MBC برای

نانوکپسول اسانس آویشن دناپی و اسانس به هر چاهک اضافه گردید. چاهک های حاوی محیط مولر هینتون براث و سوسپانسیون باکتریایی به عنوان کنترل مثبت و محیط مولر هینتون براث بدون حضور باکتری به عنوان کنترل منفی بودند. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شد. آخرین رقت چاهکی که در آن کدورتی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهاری (MIC) در نظر گرفته شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از غلظت MIC و رقت های بعدی در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. غلظتی که در آن هیچ گونه رشدی از باکتری مشاهده نشد به عنوان MBC انتخاب گردید.

بررسی تشکیل بیوفیلیم

برای بررسی میزان تشکیل بیوفیلیم، در هر چاهک پلیت الایزا ۱۷۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث و سپس از سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند باکتری ۲۰ میکرولیتر به آن ها اضافه شد (۱۸). در ادامه ۱۰ میکرولیتر از غلظت های نیم برابر MIC، MIC و ۲ برابر MIC نانوکپسول اسانس و اسانس آویشن دناپی به چاهک ها اضافه گردید. چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت بدون باکتری و با حضور باکتری به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شد. میکروپلیت در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. بعد از ۲۴ ساعت محلول رویی دور ریخته شد و در ادامه هر چاهک ۳ بار با ۳۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات سالین (PBS) شستشو داده شد. باکتری های چسبیده شده با ۲۵۰ میکرولیتر از اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند. هر چاهک ۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ۰/۲ درصد رنگ شد و در نهایت پلیت مورد نظر شسته و خشک گردید. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر از گلاسیال استیک اسید ۳۳ درصد به هر چاهک اضافه و جذب نوری آن ها در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.



تصویر شماره ۱: ساختار نانو کپسول اسانس آویشن دناپی در کپسول کیتوزان و نانوشسته. الف) روش TEM (شکل کروی ذرات) و ب) DLS (اندازه ذرات)

جدول شماره ۱: اجزاء اسانس گیاه آویشن دناپی، شناسایی شده به روش GC/MS

ردیف	ترکیبات	شاخص بازدارندگی (RI)	درصد
۱	α -Thujene	۹۲۶	۰/۰۸
۲	α -Pinene	۹۳۴	۰/۵۴
۳	Camphene	۹۴۹	۰/۱۵
۴	β -Pinene	۹۷۸	۰/۰۸
۵	β -Myrcene	۹۹۰	۱/۲۱
۶	α -Phellandrene	۱۰۰۶	۰/۱۷
۷	α -Terpinene	۱۰۱۷	۰/۹۱
۸	p-Cymene	۱۰۲۶	۴/۶۲
۹	D-Limonene 1029	۱۰۲۹	۰/۱۱
۱۰	1,8-Cineole	۱۰۳۲	۱/۱۰
۱۱	γ -Terpinene	۱۰۵۹	۲/۰۱
۱۲	cis-Sabinene hydrate	۱۰۶۸	۰/۱۳
۱۳	α -Terpinolene	۱۰۹۰	۰/۱۲
۱۴	Linalool	۱۱۰۱	۰/۴۲
۱۵	Borneo	۱۱۷۱	۰/۰۲
۱۶	4-Terpineol	۱۱۸۲	۰/۶۸
۱۷	α -Terpineol	۱۲۰۳	۰/۰۲
۱۸	Carvacrol methyl ether	۱۲۴۹	۴/۱۲
۱۹	Thymol	۱۳۰۹	۷۵/۳۱
۲۰	Carvacrol	۱۳۱۲	۰/۹۴
۲۱	trans-Caryophyllene	۱۴۲۷	۳/۰۱
۲۲	Aromandendrene	۱۴۴۴	۰/۸۸
۲۳	α -Humulene	۱۴۵۸	۰/۱۰
۲۴	Ledene	۱۴۹۸	۰/۷
۲۵	β -Bisabolene	۱۵۰۹	۰/۱۲
۲۶	(E)- α -Bisabolene	۱۵۴۴	۰/۵۱
۲۷	Spathuleno	۱۵۸۴	۰/۰۲
۲۸	Caryophyllene oxide	۱۵۹۰	۰/۹۴
۲۹	α -Cadinol	۱۶۶۱	۰/۴
۳۰	Bis(2-ethylhexyl) phthalat	۱۶۹۶	۰/۴۵
Total			۹۹/۸۷

جدول شماره ۲: میزان MIC و MBC بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس و نانو کپسول اسانس آویشن دناپی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی

باکتری	MIC (µg/mL)		MBC (µg/mL)	
	اسانس	نانو کپسول	اسانس	نانو کپسول
لیستریا مونوسیژنوز	۲۵۰ ^B	۱۲۵ ^A	۵۰۰ ^B	۲۵۰ ^A
اشرشیا کلای	۲۵۰ ^B	۱۲۵ ^A	۵۰۰ ^B	۲۵۰ ^A
باسیلوس سرئوس	۲۵۰ ^B	۱۲۵ ^A	۱۰۰۰ ^B	۲۵۰ ^A
سالمونلا تایفی موربوم	۲۵۰ ^B	۱۲۵ ^A	۵۰۰ ^B	۲۵۰ ^A
پروتئوس میرابیلیس	۱۲۵ ^B	۶۲/۵ ^A	۲۵۰ ^B	۱۲۵ ^A
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲۵ ^B	۶۲/۵ ^A	۵۰۰ ^B	۱۲۵ ^A
کلیدسیلا پنومونیه	۱۲۵ ^B	۶۲/۵ ^A	۵۰۰ ^B	۱۲۵ ^A

حروف نامتشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح معنی‌داری $P < 0/05$ برای هر باکتری نسبت به اسانس و نانو کپسول اسانس آویشن دناپی در آزمون MIC و MBC می‌باشد.

لیستریا مونوسیژنوز، اشرشیا کلای، باسیلوس سرئوس و سالمونلا تایفی موربوم با غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو کپسول آویشن گزارش گردید (جدول شماره ۲). طبق نتایج به دست آمده میزان MIC و MBC برای همه باکتری‌های مذکور نسبت به نانو کپسول اسانس آویشن دناپی کم‌تر از اسانس تنها بود ($P < 0/05$).

بر اساس نتایج با افزایش غلظت اسانس، قطر هاله عدم رشد، افزایش نشان داد در حالی که این نتایج برای نانو کپسول اسانس این طور نبود. در تمام باکتری‌ها به جز استافیلوکوکوس اورئوس، قطر هاله عدم رشد برای غلظت‌های مختلف اسانس بیش‌تر از نانو کپسول اسانس بود ($P < 0/05$). دلیل این امر می‌تواند رهائش طولانی مدت مواد محصور شده به واسطه ساختار نانو کپسول باشد. طبق نتایج، استافیلوکوکوس اورئوس در تمامی غلظت‌های اسانس و نانو کپسول اسانس آویشن دناپی، هاله عدم رشدی نشان نداد. حساس‌ترین باکتری، اشرشیا کلای با بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد (40 ± 2 میلی‌متر) نسبت به اسانس با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود ($P < 0/05$). مقاوم‌ترین باکتری‌ها در برابر نانو کپسول آویشن دناپی، لیستریا مونوسیژنوز، سالمونلا تایفی موربوم و استافیلوکوکوس اورئوس بودند (جدول شماره ۳). پروتئوس میرابیلیس به‌طور معناداری نسبت به سایر باکتری‌ها در غلظت‌های ۶۲/۵ و ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانو کپسول اسانس آویشن دناپی هاله عدم رشد نشان داد ($P < 0/05$).

مقاوم‌ترین باکتری برای مهار تولید بیوفیلم به اسانس و نانو کپسول آویشن دناپی باکتری کلیدسیلا پنومونیه بود ($P < 0/05$). درصد مهار تولید بیوفیلم برای تمام باکتری‌ها به جز کلیدسیلا پنومونیه در غلظت‌های ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو کپسول آویشن دناپی، ۱۰۰ درصد گزارش شد (جدول شماره ۴). در تمامی غلظت‌های نانو کپسول آویشن دناپی، درصد کاهش بیوفیلم باکتری‌ها به‌طور معناداری نسبت به اسانس تنها بیش‌تر بود ($P < 0/05$).

جدول شماره ۳: قطر هاله عدم رشد (میلی متر) باکتری های گرم مثبت و منفی نسبت به غلظت های مختلف (میلی گرم در میلی لیتر) اسانس و نانوکپسول اسانس آویشن دناپی

تیمارها										باکتری ها
۲۵۰ (mg/mL)		۱۲۵(mg/mL)		۶۲/۵(mg/mL)		۳۱/۲۵(mg/mL)		۱۵/۶۲(mg/mL)		
اسانس	نانو کپسول	اسانس	نانو کپسول	اسانس	نانو کپسول	اسانس	نانو کپسول	اسانس	نانو کپسول	
As _{1۱±1}	Ad _{۳۵±۲}	R	Ac _{۳۰±۲}	R	Ab _{۲۶±۲}	R	Aa _{۱۷±۲}	R	Aa _{۱۵±۲}	باسیلوس سرئوس
R	Ac _{۳۲±۳}	R	Ac _{۳۰±1}	R	Bb _{۱۷±1}	R	Ab _{۱۹±۲}	R	Ba _{۱2±1}	لیستریا مونوسیتوزنز
Aa _{۱۰±1}	Bf _{۴۰±۲}	R	Bd _{۳۵±1}	R	Cc _{۲۲±۲}	R	Bb _{۱۵±1}	R	Ba _{۱2±۲}	اشرشیا کلائی
R	Ac _{۳1±۲}	R	Ch _{۲۷±۲}	R	Ab _{۲۵±1}	R	Ch _{۲۴±۲}	R	Aa _{۱۶±1}	سالمونلا تایفی موریوم
Aa _{۱۰±1}	Ac _{۳۰±۲}	R	Cc _{۲۷±۲}	R	Ch _{۲۰±۲}	R	Ba _{۱4±۲}	R	Ba _{۱1±۲}	کلیدیلا پنومونیه
Ba _{۲1±۱۵}	Al _{۳2±1}	Ac _{۲1±۱۲}	Ad _{۲9±1}	Ac _{۲1±۱۰}	Ab _{۲۶±1}	R	Aa _{۲2±۲}	R	Ca _{۱8±۲}	پروتوس میرابلیس
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	استافیلوکوکوس اورئوس

حروف نامتشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنادار بین باکتری ها در سطح معناداری ۰/۰۵ < می باشد.

حروف نامتشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح معنی داری ۰/۰۵ < می باشد.

روغنی خود باعث تغییر در نفوذپذیری غشاء می شوند. در پی این امر خروج یون ها تغییرات فشار اسمزی سلول و در نهایت مرگ میکروارگانیسم رخ می دهد (۲۶، ۲۵).

مومینود و همکاران در سال ۲۰۲۳ در مطالعه ای با بررسی فیتوشیمیایی، ضدباکتریایی و ضدقارچی اسانس دو گونه از گیاه دارویی آویشن شامل آویشن دناپی و آویشن قره باغی در غرب ایران گزارش نمودند که نتایج نشان داد لینالول (۱/۸۳ درصد) و تیمول (۹/۷۳ درصد) به ترتیب مهم ترین ترکیبات آویشن قره باغی و آویشن دناپی را تشکیل دادند (۲۵). در مطالعه ای دیگر موسوی نژاد و همکاران در سال ۲۰۲۱ با بررسی اجزاء گیاه آویشن دناپی گزارش نمودند که بیش ترین ترکیبات موجود در آویشن دناپی به ترتیب تیمول (۳۹/۴ درصد) و کارواکرول (۳۶/۲۷ درصد) بودند (۲۷). در مطالعه حاضر بیش ترین ترکیب آویشن دناپی تیمول (۷۵/۳۱ درصد) و پی سیمن (۴/۶۲ درصد) گزارش گردید که نشان دهنده هم راستایی مطالعات با هم می باشد.

نتایج مطالعات مختلف نشان می دهد که ترکیبات و اجزاء گیاه آویشن دناپی در مناطق مختلف جغرافیایی تفاوت هایی دارند. از این رو جهت توجیه این موضوع باید عنوان نمود که محتوای اسانس گیاهان دارویی و فعالیت زیستی آن ها براساس روش های مختلف کشت، خاستگاه، مرحله رویشی و فصل رویش تغییر می کند (۲۷، ۱۳، ۷، ۴). نانو کپسوله کردن ترکیبات زیست

جدول شماره ۴: درصد کاهش بیوفلم باکتری های گرم مثبت و منفی تحت تاثیر غلظت های نیم برابر MIC، MIC و ۲ برابر MIC اسانس و نانوکپسول اسانس آویشن دناپی

تیمارها						باکتری ها
۲۵۰ (mg/mL)		۱۲۵(mg/mL)		۶۲.۵(mg/mL)		
اسانس	نانوکپسول	اسانس	نانوکپسول	اسانس	نانوکپسول	
Ab۱۰۰±۰٫۰	As۹۵±۵	Ab۱۰۰±۰٫۰	As۹۰±۵	Ab۱۰۰±۰٫۰	As۹۵±۵	لیستریا مونوسیتوزنز
Ac۱۰۰±۰٫۰	Ab۹۲±۶	Ac۱۰۰±۰٫۰	Ab۸۶±۶	Ba۳۰/۱۶±۳	Ba۲۵±۵	اشرشیا کلائی
Ab۱۰۰±۰٫۰	As۹۱±۵	Ab۱۰۰±۰٫۰	As۸۵±۵	.	.	باسیلوس سرتوس
Ac۱۰۰±۰٫۰	Bb۸۷±۳	Ac۱۰۰±۰٫۰	Bb۸۲±۳	Ca۷۶±۳	Ca۷۰±۵	سالمونلا تایفی موریوم
Ab۱۰۰±۰٫۰	As۹۴±۵	Ab۱۰۰±۰٫۰	As۸۴±۵	Ab۱۰۰±۰٫۰	Da۸۳±۵	پروتئوس میرابیلیس
Ab۱۰۰±۰٫۰	As۹۶±۴	Ab۱۰۰±۰٫۰	As۸۰±۴	Ab۱۰۰±۰٫۰	Da۸۰±۵	استافیلوکوکوس اورئوس
Bb۴۱±۳	Ch۳۸±۴	Ba۱۲/۴±۴	Ca۱۵±۴	Da۱۱/۱/۲±۲	Ea۱۴±۵	کلیدیلا پنومونیه

حروف نامتشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین باکتری ها در سطح معناداری ۰/۰۵ < p می باشد.

حروف نامتشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح معنی داری ۰/۰۵ < می باشد

بحث

گیاهان دارویی از جمله منابع طبیعی هستند که به اثر ضد میکروبی آن ها در بسیاری از پژوهش های گذشته اشاره شده است. این ترکیب ها با مکانیسم های متفاوتی نسبت به آنتی بیوتیک ها بر میکروارگانیسم ها موثرند که این امر سبب افزایش دامنه ی فعالیت بیولوژیکی آن ها نیز می شود (۲۲، ۲۱). ویژگی ضد میکروبی گیاهان بر اثر سنتز متابولیت های ثانویه مانند اسانس ها است. اسانس ها ترکیبات معطر و فرار هستند که در گیاه نقش حفاظتی دارند (۲۴، ۲۳). این ترکیبات اغلب بر دیواره سلولی میکروارگانیسم ها اثر کرده و با داشتن ماهیت آبگریز و

فعال از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها محافظت کرده و انتشار این مواد حساس را کنترل می‌نماید. از ترکیبات مختلفی به عنوان دیواره در تولید نانو کپسول می‌توان استفاده می‌کنند که از متداولترین آن‌ها می‌توان به کیتوزان و نشاسته اشاره نمود. تایید نانو کپسول اسانس از لحاظ توزیع مناسب و یکنواختی پراکندگی قطرات در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. در مطالعه حاضر اندازه نانو کپسول‌ها بین ۵۰ تا ۹۰ نانومتر بود که با مطالعه حسنی و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت نداشت. آن‌ها نشان دادند که اندازه ذرات در نانو کپسول‌ها با نسبت‌های متفاوت در ترکیبات دیواره (کیتوزان و نشاسته اصلاح شده)، بین ۳/۳۳۹ تا ۳/۵۵۳ نانومتر متغیر بود. تحقیقات نشان داده ترکیبات مختلف دیواره و تکنیک ریزپوشانی، فاکتورهای مؤثر بر اندازه ذرات و مورفولوژی کپسول‌ها است (۲۶). از محدودیت‌های مطالعه حاضر، عدم محاسبه راندمان ریزپوشانی نانو کپسول اسانس تهیه شده و هم‌چنین تعیین پایداری آن با مشخص نمودن اختلاف پتانسیل بین لایه یونی غیرمتحرک و لایه متحرک در اتمسفر یونی اطراف ذرات باردار (پتانسیل زتا) بود. با این حال در مطالعه‌ای نشان داده‌اند که بیش‌ترین راندمان ریز پوشانی با ۸۵/۴۳ درصد برای نانو کپسول تهیه شده از کیتوزان و نشاسته با نسبت ۱/۵ به ۸/۵ درصد حاوی اسانس لیمو ترش بود. تفاوت در نوع دیواره و هسته (به علت تفاوت موجود بین مواد پلیمری تشکیل‌دهنده دیواره)، انواع روش‌های خشک کردن و ویژگی‌های امولسیون از جمله عوامل تاثیر گذار بر میزان راندمان ریزپوشانی می‌باشند (۲۶).

در مطالعه پاراندا و همکاران (۲۰۲۱)، اثر ضد میکروبی نانو فیلم کیتوزان و نشاسته حاوی اسانس علف لیمو را علیه *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تایفی* موریوم، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کاندیدا آلبیکنس* و *آسپرژیلوس نایجر* بررسی کردند. میزان MIC برای میکروارگانیسم‌ها مقادیری بین ۰/۳۹ تا ۱/۵۶ میکرولیتر در میلی‌لیتر گزارش شد. هم‌چنین آن‌ها نشان دادند

استفاده این پوشش می‌تواند به‌طور معنا داری سبب کاهش بار میکروبی فلفل قرمز در مقایسه با فلفل بدون پوشش در طی زمان نگهداری ۱۶ روز شود (۱۹). نتایج مطالعه حاضر همسو با این تحقیق، اثرات ضد میکروبی بیش‌تر و معنادار ساختار نانو کپسول اسانس را در مقایسه با اسانس تنها نشان می‌دهد.

در مطالعه منصوری و همکاران در سال ۲۰۲۱، نشان دادند نانو امولسیون اسانس آویشن دناپی و توتین ۸۰ با نسبت یک به یک و مدت زمان سونیکیشن ۱۵ دقیقه بهترین اثرات ضدباکتریایی را علیه *سالمونلا تایفی* موریوم، *لیستریا مونوسیژنوز* و *اشریشیا کلی* داشت (۹). در مطالعه دیگری اثر اسانس آویشن دناپی تهیه شده با منشا گیاهی ارومیه علیه ۱۵ باکتری گرم منفی و مثبت بررسی شد. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که بیش‌ترین اثر اسانس علیه باسیلوس سرئوس بود (میزان MIC برابر ۰/۹۳ میکروگرم در میلی‌لیتر و MBC برابر ۱/۸۷ میکروگرم در میلی‌لیتر) (۲۸). در مطالعه حاضر کم‌ترین میزان MIC برای اسانس نانو کپسول آویشن دناپی علیه باکتری‌های پروتئوس میرابیلیس، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا پنومونیه* با غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کم‌ترین میزان MIC در اسانس آویشن دناپی در باکتری پروتئوس میرابیلیس با غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

در مطالعه الاهیان و همکاران در سال ۲۰۲۱، اثرات تغییرات اقلیمی بر روی خواص بیولوژیکی اسانس آویشن دناپی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه آن‌ها حاکی از مقادیر متفاوتی (۰/۱۴ تا ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از خواص باکتریوسیدی علیه باکتری‌های *سالمونلا تایفی* موریوم (ATCC:13311)، *اشریشیا کلی* (ATCC:8739)، *اشریشیا فکالیس* (ATCC:29212)، *باسیلوس سوتیلیس* (ATCC:12711) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC:29923) بود (۲۹). تفاوت‌هایی که بین مطالعه حاضر و بررسی قبلی وجود داشت نوع باکتری‌های مورد استفاده (جدا شده از

نمونه‌های غذایی و آبریان) و همچنین منشا گیاهی اسانس است. در مطالعه حاضر مقاوم ترین باکتری در برابر اسانس آویشن دناپی، *استافیلوکوکوس اورئوس* و حساس ترین باکتری، *اشرشیا کلای* بود. هم‌چنین مقاوم ترین باکتری در برابر نانو کپسول آویشن دناپی، *لیستریا مونوسیترنر*، *سالمونلا تافی*، *موریوم* و *پروتئوس میرابیلیس* و حساس ترین باکتری، *استافیلوکوکوس اورئوس* بود.

در بررسی حیدری و همکاران (۲۰۲۰)، اثر اسانس خالص و نانو کپسول اسانس آویشن دناپی علیه شته مومی کلم (به عنوان یک آفت گیاهی) مورد بررسی قرار گرفت. آن‌ها گزارش دادند که استفاده از نانو کپسول اسانس در مدیریت تلفیقی شته مومی کلم می‌تواند موثر باشد (۳۰). با توجه به این که مطالعاتی در زمینه نانو کپسول اسانس آویشن دناپی تاکنون موجود نبود از سایر گونه‌های جنس آویشن مطالعاتی مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۲، فعالیت‌های بیولوژیکی نانو کپسول اسانس‌های *T. capitatus* و *T. algeriensis* نشان داده شد. نانو ذرات زئین همراه با اسانس‌ها در مالتو دکسترین پایدار شدند و اندازه ذرات به دست آمده ۷۴/۷ نانومتر بود. اثر ضد میکروبی (قطر هاله عدم رشد) علیه باکتری‌های *سودوموناس آنروژینوزا*، *استافیلوکوکوس ارئوس*، *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیترنر* و *سالمونلا تافی* موریوم برای نانو کپسول اسانس‌ها ۱۲ تا ۳۳ میلی‌متر و برای شکل غیر کپسوله ۱۲ تا ۲۸ میلی‌متر بود (۳۱). در مطالعه حاضر اسانس آویشن دناپی، توسط توئین ۸۰ نانوامولسیون شد و سپس توسط نشاسته اصلاح شده و کیتوزان پایدار شدند. اندازه نانو ذرات کپسوله مقادیری بین ۵۰ تا ۹۰ نانومتر داشتند. هم‌چنین اثر ضد باکتریایی (قطر هاله عدم رشد) برای اسانس خالص بیش‌تر از نانو کپسول اسانس بود. دلیل این امر در نوع ساختار نانو کپسول و هم‌چنین رهایش آهسته مواد ضد میکروبی از آن می‌تواند باشد (۳۱). لازم به ذکر است که اسانس‌ها با دارا بودن مولکول‌های فعال

زیستی طبیعی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی، جدید نگهدارنده مواد غذایی و مؤثر برای درمان بیماری‌های عفونی استفاده می‌شوند. اسانس‌ها توسط سازمان غذا و داروی آمریکا و آژانس حفاظت از محیط زیست به عنوان مواد ایمن شناخته می‌شوند و دارای اثرات بیولوژیکی متنوعی هستند (۳۲-۳۰). با این وجود، حلالیت پایین و نوسانات بالای اسانس‌ها دو مانع اصلی برای استفاده از این ترکیبات در زمینه‌های مختلف است. روش‌های کپسوله و یا نانوامولسیون کردن آن‌ها به جهت افزایش حلالیت‌پذیری، پایداری در محیط و اثربخشی فزاینده مورد استفاده می‌باشد (۱۵، ۱۴). چنان‌چه که در مطالعه حاضر نیز مشخص شد نانو کپسول آویشن دناپی اثر قابل قبولی بر جلوگیری از رشد باکتری‌های مورد مطالعه داشت.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ساختار نانو کپسول آویشن دناپی دارای اثرات ضد باکتریایی بیش‌تر و معناداری نسبت به اسانس تنها علیه باکتری‌های *لیستریا مونوسیترنر*، *اشرشیا کلای*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تافی*، *موریوم*، *پروتئوس میرابیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا پنومونیه* داشت. با این وجود پیشنهاد می‌گردد مطالعه‌های آینده جهت سم‌شناسی نانو کپسول تهیه شده در سطح سلول‌های سالم و سرطانی در شرایط آزمایشگاهی صورت گیرد. به‌علاوه جهت کاربردی نمودن آن در صنعت غذا، مطالعه‌های تجربی در مدل‌های غذایی نیز انجام گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دکترای عمومی دامپزشکی خانم آترین آشعبانی با کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1402.071 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد بود. از همکاری اعضای محترم مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، نیز تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Sharafati Chaleshtori F, Sharafati Chaleshtori R. Antimicrobial activity of chitosan incorporated with lemon and oregano essential oils on broiler breast meat during refrigerated storage. *Nutrition Food Science* 2017; 47(3): 306-317.
2. Samiei S, Pourbabaki R, Khadem M, Alefi M, Sadeghi yarandi M, Shahtaheri SJ. Antioxidant and protective effects of plant extract against deltamethrin-induced oxidative stress in liver and kidney: A review. *Razi Journal of Medical Sciences* 2020; 27(7): 25-39 (Persian).
3. Sharafati-Chaleshtori R, Mardani G, Rafieian-Kopaei M, Sharafati-Chaleshtori A, Drees F. Residues of oxytetracycline in cultured rainbow trout. *Pak J Biol Sci* 2013; 16(21): 1419-1422.
4. Bistgani ZE, Sefidkon F. Review on ethnobotany, phytochemical, molecular and pharmacological activity of *Thymus daenensis* Celak. *Biocatal Agric Biotechnol* 2019; 22: 101400.
5. Tohidi B, Rahimmalek M, Trindade H. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. *Ind Crops Prod* 2019; 134: 89-99.
6. Barmoudeh Z, Ardakani MT, Doustimotlagh AH, Bardania H. Evaluation of the Antioxidant and Anticancer Activities of Hydroalcoholic Extracts of *Thymus daenensis* Celak and *Stachys pilifera* Benth. *J Toxicol* 2022; 2022: 1924265.
7. Ali-Arab H, Bahadori F, Mirza M, Badi HN, Kalate-Jari S. Variability in essential oil composition and phenolic acid profile of *Thymus daenensis* Celak. populations from Iran. *Ind Crops Prod* 2022; 178: 114345.
8. Moghimi R, Ghaderi L, Rafati H, Aliahmadi A, McClements DJ. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food chem* 2016; 194: 410-415.
9. Mansouri S, Pajohi- Alamoti M, Aghajani N, Bazargani- Gilani B, Nourian A. Stability and antibacterial activity of *Thymus daenensis* L. essential oil nanoemulsion in mayonnaise. *J Sci Food Agr* 2021; 101(9): 3880-3888.
10. Hasani, D, Ahanghar, H, Bahrami, M, Ramezani, S, Kamalinejad, M, Faghihzadeh, E. Clinical Trial of Combined *Thymus daenensis* Celak and *Ziziphus Jujube* Mill Syrup in Primary Hypertension. *Int J Med Rev* 2022; 9(4): 406-413.
11. Dehghan M, Asgharian S, Khalesi E, Ahmadi A, Lorigooini Z. Comparative study of the effect of *Thymus daenensis* gel 5% and diclofenac in patients with knee osteoarthritis. *Biomedicine* 2019; 9(2): 9.
12. Satyal P, Murray BL, McFeeters RL, Setzer WN. Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods* 2016; 5(4): 70.
13. Mashkani MR, Larijani K, Mehrafarin A, Badi HN. Changes in the essential oil content and composition of *Thymus daenensis* Celak. under different drying methods. *Ind Crops Prod* 2018; 112: 389-395.
14. Saffari I, Motallebi-Moghanjoghi A, Sharafati-Chaleshtori R, Ataee M, Khaledi A. Evaluation of biological properties of *Rosa damascene* essential oil nanoemulsion in vitro. *Feyz* 2023; 27(1): 31-40 (Persian).
15. Saffari I, Motallebi-Moghanjoghi A, Sharafati-Chaleshtori R, Ataee M, Khaledi A.

- Nanoemulsification of Rose (*Rosa damascena*) Essential Oil: Characterization, Anti-Salmonella, In Vitro Cytotoxicity to Cancer Cells, and Advantages in Sheep Meat Application. *J Food Qual* 2023; 2023: 6665799.
16. Tyagi V, Singh VK, Sharma PK, Singh V. Essential oil-based nanostructures for inflammation and rheumatoid arthritis. *J Drug Deliv Sci Technol* 2020; 60: 101983.
 17. Rezaei A, Khavari S, Sami M. Incorporation of thyme essential oil into the β -cyclodextrin nanosponges: Preparation, characterization and antibacterial activity. *J Mol Struct* 2021; 1241: 130610.
 18. da Rosa CG, de Melo AP, Sganzerla WG, Machado MH, Nunes MR, Maciel MV, et al. Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. *Food Hydrocoll* 2020; 99: 105339.
 19. Perdana MI, Ruamcharoen J, Panphon S, Leelakriangsak M. Antimicrobial activity and physical properties of starch/chitosan film incorporated with lemongrass essential oil and its application. *Lwt* 2021; 141: 110934.
 20. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th CLSI supplement (M100-S16). Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute: 2006
 21. Pouyan S, Kafshdouzan K, Jebelli A. Synergistic Effect of *Cinnamomum camphora* and *Origanum vulgare* Essential Oils against bla CTX-M Producing *Escherichia coli* Isolated from Poultry Colibacillosis. *J Med Bacteriol* 2021; 10(1,2): 20-29.
 22. Marouf M, Batal M, Moledor S, Talhouk SN. Exploring the practice of traditional wild plant collection in Lebanon. *Food Cult Soc* 2015; 18(3): 355-378.
 23. Ghavam M, Bacchetta G, Castangia I, Manca ML. Evaluation of the composition and antimicrobial activities of essential oils from four species of Lamiaceae Martinov native to Iran. *Sci Rep* 2022; 12(1): 1-2.
 24. Chaleshtori RS, Kopaei MR, Salehi E. Bioactivity of *Apium petroselinum* and *Portulaca oleracea* essential oils as natural preservatives. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(3): e20128.
 25. Mumivand H, Khanizadeh P, Hassaneian Khoshro H. Evaluation of phytochemical, antibacterial and antifungal properties of essential oils of two species of thyme (*Thymus daenensis* and *Thymus fedtschenkoi*) from west of Iran. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants* 2023; 11(1): 1-16 (Persian).
 26. Hasani S, Ojagh S, Ghorban M. Encapsulation of Lemon essential oil (*Citrus Limon* L.) in chitosan-modified starch complex by sonication. *Innovative Food Technologies* 2018; 6(1): 19-30.
 27. Mosavinezhad K, Shakerian A, Sharafati Chaleshtori R, Rahimi E. Antimicrobial and antioxidant effects of *Thymus daenensis* and *Camellia sinensis* ethanolic extracts of chicken meat during frozen storage. *Journal of Medicinal plants and By-product* 2020; 9(Special): 17-27.
 28. Alamholo M. Investigation of chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of *Thymus daenensis* and *Thymus eriocalyx* essential oils against human pathogenic bacteria. *JoMMID* 2020; 8(4): 148-154.
 29. Elahian F, Garshasbi M, Mehri Asiabar Z, Gholamian Dehkordi N, Yazdinezhad A, Mirzaei SA. Ecotypic variations affected the biological effectiveness of *Thymus daenensis* Celak essential oil. *Evid.-based Complement Altern Med* 2021; 2021: 6686558.

30. Heidary M, Jafari S, Karimzadeh J, Negahban M, Shakarami J. The effects of pure and nanocapsulated formulations of *Thymus daenensis* Celak.(Lamiaceae) essential oil on life-table parameters of cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.) (Hem.: Aphididae). *Plant Pest Research* 2020; 10(2): 15-32 (Persian).
31. Jayari A, Donsi F, Ferrari G, Maaroufi A. Nanoencapsulation of thyme essential oils: Formulation, characterization, storage stability, and biological activity. *Foods* 2022; 11(13): 1858.
32. Sharafati Chaleshtori R, Rafieian Kopaei M, Rokni N, Mortezaei S, Sharafati Chaleshtori A. Antioxidant activity of *Zataria Multiflora* hydroalcoholic extract and its antibacterial effect on *Staphylococcus aureus*. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012; 21 (1):88-94 (Persian).