Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
No 55, Volume 14, Issue 3

Research Article

Evaluation of Chemical Compounds and Comparison of Antibacterial Activity of Essential Oil and Nanoemulsion Containing Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides L*

Hadi Yazdani[1], Amir Amani[2*], Maryam Besharati[3], Maryam Tatari[4], Ali Marjani[4]

[1] PhD Candidate in Horticultural Science, Shirvan Branch, Islamic Azad University, Shirvan, Iran
[2] Professor of Pharmaceutics, Department of Advanced Technologies, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[3] Postdoc Researcher, Department of Advanced Technologies, Department of Advanced Sciences and Technologies, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Agronomy, Shirvan Branch, Islamic Azad University, Shirvan, Iran

***Corresponding author:** Amir Amani, Department of Advanced Technologies, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: a.amani@nkums.ac.ir

DOI: **10.32592/nkums.14.3.70**

How to Cite this Article:
Yazdani H, Amani A, Besharati M, Tatari M, Marjani A. Evaluation of Chemical Compounds and Comparison of Antibacterial Activity of Essential Oil and Nanoemulsion Containing Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides L*. J North Khorasan Univ Med Sci. 2022;**14**(3): 70-77. DOI: 10.32592/nkums.14.3.70

Received: 16 Apr 2022
Accepted: 13 Jun 2022

Keywords:
Antibacterial
Essential oil
Nanoemulsion
Ziziphora clinopodioides

Abstract

Introduction: Medicinal plants have played a major role in the treatment of multiple diseases for centuries. *Ziziphora clinopodioides* is one of these plants with well-known antibacterial properties. The present study aimed to investigate the antibacterial effects of *Z. Clinopodioides* essential oil and nanoemulsion.

Method: After preparing and collecting the plant in spring, the samples were dried in the shade and transferred to the laboratory. Thereafter, the essential oil was extracted by Clevenger. Gram-negative *Escherichia coli* and Gram-positive *Staphylococcus aureus* were used to determine antibacterial properties.

Results: Pulegone had the highest composition (44.49%) of essential oil. Particle size in 5% nanoemulsion of *Z. Clinopodioides* essential oil was 13.0 nm. The results demonstrated that considering the diameter zone of the no-growth, there was no significant difference between 5% nanoemulsion and 5% *Z. Clinopodioides* essential oil in both gram-positive and gram-negative bacteria.

Conclusion: Nanoemulsion containing essential oil showed no significant difference in antibacterial activity compared to essential oils.

Copyright *© 2022 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۴، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

بررسی ترکیبات شیمیایی و مقایسه فعالیت ضدباکتریایی اسانس و نانوامولسیون حاوی اسانس گیاه کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides*)

هادی یزدانی[۱]، امیر امانی[۲*]، مریم بشارتی[۳]، مریم تاتاری[۴]، علی مرجانی[۴]

[۱]دانشجوی دکتری علوم باغبانی، واحد شیروان، دانشگاه آزاد اسلامی، شیروان، ایران
[۲]استاد فارماسیوتیکس، گروه فناوری‌های نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۳]پسادکتری، گروه فناوری‌های نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۴]استادیار، گروه زراعت، واحد شیروان، دانشگاه آزاد اسلامی، شیروان، ایران
[*]**نویسنده مسئول:** امیر امانی، گروه فناوری‌های نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، خراسان شمالی، ایران. ایمیل: a.amani@nkums.ac.ir

DOI: 10.32592/nkums.14.3.70

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۳

واژگان کلیدی:
اسانس
ضدباکتریایی
کاکوتی کوهی
نانوامولسیون

چکیده

مقدمه: گیاهان دارویی طی قرن‌ها نقش مهمی در درمان بسیاری از بیماری‌ها داشته‌اند. کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides*) یکی از گیاهانی است که خواص ضدباکتریایی آن به‌خوبی شناخته شده است. در این مطالعه اثرات ضدباکتریایی اسانس و نانوامولسیون گیاه کاکوتی بررسی شده است.

روش کار: بعد از تهیه و جمع‌آوری گیاه در فصل بهار، نمونه‌ها در سایه خشک و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس اسانس‌گیری با دستگاه کلونجر انجام شد. به‌منظور تعیین خواص ضدباکتریایی از باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد.

یافته‌ها: بیشترین ترکیب اسانس مربوط به ماده پولگون (۴۴/۴۹ درصد) بود. اندازه ذرات در نانوامولسیون ۵ درصد اسانس کاکوتی کوهی ۱۳/۰ نانومتر به‌دست آمد. با توجه به قطر هاله عدم رشد، هیچ اختلاف معنی‌داری بین نانوامولسیون ۵ درصد و اسانس کاکوتی ۵ درصد در باکتری گرم مثبت و باکتری گرم منفی مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نانوامولسیون حاوی اسانس در مقایسه با اسانس تفاوت معنی‌داری از نظر فعالیت ضدباکتریایی نداشت.

مقدمه

امروزه از گیاهان دارویی به‌عنوان یک روش مطمئن برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی نام برده می‌شود [۱]. به دلیل مقاومت باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و نگرانی‌هایی که به دنبال آن وجود دارد، پوشش‌های آنتی‌بیوتیکی به صورت گسترده مورد توجه قرار گرفته است [۲]. پژوهشگران عقیده دارند فرآورده‌های گیاهی استعداد بالقوه‌ای برای استفاده به صورت مواد ضدباکتریایی زیستی دارند که به جای مواد شیمیایی به کار برده شوند [۳،۴]. گیاه کاکوتی کوهی ازجمله گیاهان شدیداً معطری است که در طب سنتی ایران به‌خوبی شناخته شده است و برای درمان بیماری‌های گوارشی از آن استفاده می‌شود [۵]. علاوه بر آن، به‌عنوان ضدعفونی‌کننده، آرام‌بخش و ترمیم‌کننده زخم نیز استفاده می‌شود [۶]. این گیاه همچنین به دلیل داشتن ماهیت ضدباکتریایی شناخته شده است [۷].

نانوامولسیون‌ها ترکیباتی هستند که ساختار آن‌ها از قطرات بسیار ریز امولسیونی (در اندازه‌های نانومتری) است. شیری شدن و رسوب امولسیون طی فرایند نگهداری نانوامولسیون‌ها اتفاق نمی‌افتد و ساختار محلول بدون اینکه دوفاز شود، ثبات خود را حفظ می‌کند و شفاف باقی می‌ماند [۸]. نانوامولسیون از دو مایع ناهمگن همچون آب و روغن تشکیل می‌شود [۹]. یک نانوامولسیون با خواص ضدمیکروبی بهینه، نیازمند دو فاکتور اساسی است: طی زمان نگهداری امولسیون باید از نظر فیزیکی ثبات و اسانس مدنظر باید خواص ضدمیکروبی داشته باشد [۱۰]. یک مطالعه نشان داد اسانس و عصاره کاکوتی کوهی مانع رشد باکتری‌های آغازگر ماست (*استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*) می‌شود [۱۱]. اثرات ضدباکتریایی گیاه کاکوتی در مهار رشد باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در یک مطالعه نشان داده شده است [۱۲]. در پژوهش دیگری اثر مهاری روغن فرار کاکوتی بر رشد باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی در ۶ باکتری گرم منفی و ۳ باکتری گرم مثبت، مؤثر گزارش شد [۱۳].

Copyright *© 2022 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

مطالعات نشان داده است نانوامولسیون‌ها در مقایسه با اسانس تام اثرات ضدباکتریایی بهتری دارند؛ برای مثال، در تحقیقی به مقایسه اثرات ضدمیکروبی نانوامولسیون و اسانس پرداخته شد و نتایج نشان داد در تمام باکتری‌های آزمایشی اثرات ضدمیکروبی نانوامولسیون (با MIC=۱۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نسبت به اسانس (با MIC=۱۰۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بیشتر بود [۱۴]. در پژوهش دیگری ترکیبات شیمیایی و خصوصیات ضدمیکروبی کاکوتی کوهی نواحی مختلف ایران بررسی و مشاهده شد که تأثیر ترکیبات اسانس بر میزان هاله عدم رشد در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۳/۳ میلی‌متر) بیشتر از باکتری *اشریشیا کلی* (۲/۱ میلی‌متر) بوده است [۱۵]. هدف از این مطالعه مقایسه اثر نانوامولسیون و اسانس کاکوتی کوهی بر رشد یک سویه باکتری گرم منفی (*اشریشیا کلی*) و یک سویه باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) در شرایط برون‌تنی بود.

روش کار

تهیه مواد اولیه گیاهی

در این پژوهش مواد آزمایشی شامل سورفکتانت غیریونی توین ۸۰ و اتانول ۹۶ درصد، اسانس گیاه کاکوتی و آب مقطر بود. گیاهان مدنظر در اردیبهشت ۱۳۹۹ از نقاط مختلف استان خراسان شمالی شامل بجنورد، آشخانه و چمن‌بید تهیه و در سایه خشک شدند [۱۶]. درنهایت پژوهشگران گیاهان دارویی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان شمالی مونه های گیاهی مد نظر را شناسایی و به شماره هرباریومی MPI286 مشخص کردند.

آماده‌سازی اسانس

به‌منظور استخراج اسانس، گیاهان در سایه خشک شدند. سپس اسانس نمونه‌های گیاهی آسیاب‌شده با دستگاه کلونجر (ساخت ایران با شوف بالن کره‌ای) به مدت ۳ ساعت به روش تقطیر با آب به‌دست آمد و با اضافه کردن مقداری سولفات سدیم (بدون آب)، آب اضافی از اسانس جدا شد. اسانس خالص به‌دست‌آمده در ظروف کدر در بسته در دمای ۴ درجه نگهداری شد [۱۷].

شناسایی مواد تشکیل‌دهنده اسانس

به‌منظور تحلیل اسانس از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Shimadzu-QP2010SE مجهز به ستون Rtx-5MS (طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر) استفاده شد. برنامه دمایی ستون به این صورت تنظیم شد: دمای اولیه آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد و توقف ۴ دقیقه تنظیم شد. در هر دقیقه دمای دستگاه تا زمان رسیدن به دمای ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ درجه افزایش یافت و به مدت ۱۳ دقیقه در این دما ثابت باقی ماند. از گاز هلیم به‌عنوان گاز حامل و با سرعت جریان ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه و طیف‌سنج جرمی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. برای شناسایی طیف‌های حاصل با رسم کروماتوگرام یک سری از پارافین‌های نرمال (C_5-C_{30}) تحت شرایط یکسان با تزریق نمونه انجام شد. با توجه به زمان بازداری این ترکیب‌ها اندیس‌کواتس برای هر جزء موجود درکروماتوگرام نمونه محاسبه شد.

تهیه نانوامولسیون

نانوامولسیون مدنظر در غلظت ۵ درصد وزنی/وزنی تهیه شد. از توین ۸۰ به‌عنوان سورفکتانت، اتانول ۹۶درصد به‌عنوان کمک سورفکتانت، اسانس کاکوتی کوهی به‌عنوان فاز روغنی و آب مقطر دو بار تقطیر به‌عنوان فاز آبی استفاده شد. به‌منظور آماده‌سازی نانوامولسیون از روش امولسیون‌سازی خودبه‌خودی استفاده شد. ۰/۴ گرم (۱۰ درصد) توین ۸۰ و ۰/۲ گرم اسانس (۵ درصد) در یک ویال شیشه‌ای با ترازوی دیجیتال وزن شد و به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه روی همزن مگنت‌دار قرار گرفت. سپس ۰/۴ گرم اتانول (۱۰ درصد) به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه هم زده شد. ۳ گرم آب مقطر (۷۵ درصد) نیز در مدت ۲۰ دقیقه با قطره‌چکان به محلول در حال چرخش روی همزن افزوده شد. پس از اضافه شدن فاز آبی، هم زدن به مدت ۲۰ دقیقه ادامه یافت.

پایداری نانوامولسیون و تعیین اندازه ذرات

با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) مدل Scatteroscopel (شرکت K-ONE ساخت کشور کره جنوبی) که روشی فیزیکی است، اندازه ذرات موجود در محلول نانوامولسیون مشخص و بررسی شد [۱۸]. نانوامولسیون‌ها در سه چرخه ۲۴ ساعته دمایی سرما-گرما (۴+ درجه سانتی‌گراد تا ۴۵+ درجه سانتی‌گراد) و ذوب-انجماد (۲۰- درجه سانتی‌گراد تا دمای اتاق) و نیز نگهداری در مدت ۶۰ روز در دمای ۴۰+ درجه سانتی‌گراد بررسی شد.

فعالیت ضدباکتریایی اسانس و نانوامولسیون حاوی اسانس

خاصیت ضدباکتریایی با استفاده از باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (Staphylococcus aureus) و باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* (Escherichia coli) (سویه‌های بیمارستانی) و با روش انتشار دیسک بررسی شد. از هریک از سویه‌ها یک کلونی جداگانه به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس کدورت محیط‌های کشت حاوی باکتری با استفاده از آب مقطر استریل به غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند (10^8CFU/ml) تنظیم شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت روی محیط کشت مولر هینتون آگار با سوآب استریل کشت یکنواخت داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از نانوامولسیون دارای اسانس (غلظت ۵ درصد وزنی/وزنی)، اسانس خالص (۱۰۰ درصد وزنی/وزنی) و اسانس ۵ درصد وزنی/وزنی روی دیسک‌های خالی استریل بارگذاری شد. دیسک‌های حاوی نمونه با پنس استریل با فاصله استاندارد ۱/۵ سانتی‌متر از لبه پلیت روی سطح محیط کشت قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. اندازه قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر با استفاده ازخط‌کش تعیین شد. از دیسک حاوی

آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این پژوهش تمام آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel تجزیه‌وتحلیل شد. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون تی در سطح ۵ درصد مقایسه و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شد.

یافته‌ها

ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس کاکوتی کوهی

نتایج تحلیل به‌دست‌آمده از دستگاه گازکروماتوگرافی متصل به طیف‌نگار جرمی (جدول ۱) نشان داد ترکیبات اصلی اسانس کاکوتی به ترتیب شامل پولگون (۴۴/۴ درصد)، هگزانوئیک اسید (۱۱/۸ درصد)، ایزومنتون (۴/۷ درصد) و بورنئول (۴/۲ درصد) است.

بررسی اندازه ذرات و پایداری نانوامولسیون‌ها

توزیع اندازه ذرات با روش پراکندگی نور دینامیکی ۱۳/۰ نانومتر گزارش شد (شکل ۱). نانوامولسیون تولیدشده در شرایط چرخه‌های سرما-گرما و ذوب-انجماد و همچنین دو ماه نگهداری در دمای ۴۰ درجه هیچ‌گونه علامتی از دوفاز شدن و ناپایداری نشان نداد. نانوامولسیون تهیه‌شده شامل ۱۰ درصد توین ۸۰، ۵ درصد اسانس کاکوتی کوهی و ۱۰ درصد اتانول ۹۶ درصد بود.

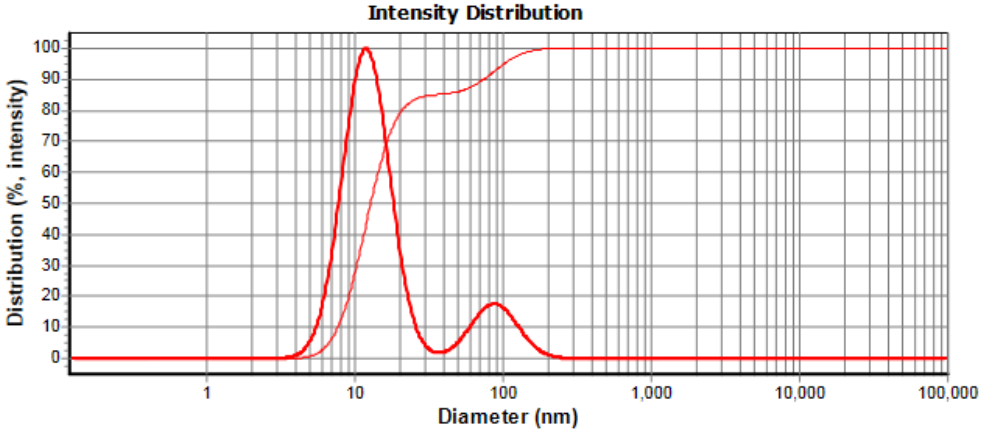
ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی اسانس و نانوامولسیون حاوی اسانس

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، اثرات ضدباکتریایی به صورت هاله عدم رشد باکتری‌ها روی دیسک آغشته به محلول نشان داده شده است. اندازه هاله عدم رشد با خط‌کش تعیین و در جدول ۲ گزارش شد.

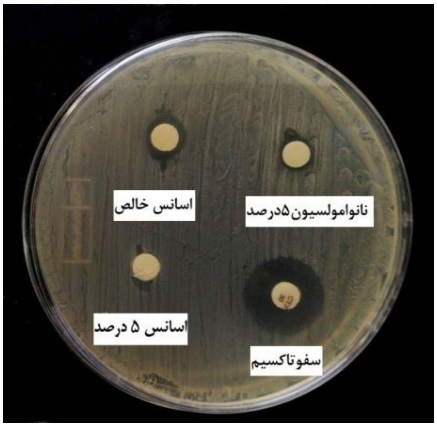
جدول ۱. ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس گیاه کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides*)

ردیف	ترکیبات	RT	KI	درصد
۱	α-pinene	۷/۱۸۴	۹۷۱	۰/۴۵
۲	pinene	۷/۲۷۵	۹۸۳	۰/۵۸
۳	sabinene	۸/۴۲۸	۱۰۳۶	۰/۶۹
۴	Beta-pinene	۸/۵۲۰	۱۰۴۱	۱/۱۸
۵	3-octanol	۹/۱۰۲	۱۰۷۰	۰/۵۹
۶	eucalyptol	۱۰/۱۵۴	۱۱۱۸	۳/۱۷
۷	Yomogi alcohol	۱۳/۸۰۱	۱۶۴۴	۲/۲۱
۸	isomenthon	۱۴/۰۰۳	۱۶۵۴	۴/۷۹
۹	borneol	۱۴/۴۵۹	۱۶۸۵	۴/۲۱
۱۰	Trans-isopolegune	۱۴/۷۱۲	۱۴۰۱	۰/۶۳
۱۱	Neoisomenthol	۱۵/۴۲۳	۱۴۰۷	۱/۰۶
۱۲	Pulegone	۱۷/۲۴۳	۱۵۹۹	۴۴/۴۹
۱۳	piperitone	۱۷/۴۶۲	۱۶۰۰	۲/۸۷
۱۴	Menthol acetate	۱۸/۶۱۵	۱۶۱۶	۱/۲۰
۱۵	Thymol	۱۸/۸۵۰	۱۷۰۵	۰/۴۵
۱۶	2-hexonoic acid	۲۳/۸۳۴	۱۸۴۸	۱۱/۸۷
۱۷	Germacrene	۲۴/۱۱۳	۲۱۵۸	۰/۹۲
۱۸	cyclohexanone	۱۴/۴۱۸	۱۶۷۸	۲/۴۸

%:Area percent KI: شاخص کواتز RT: شاخص بازداری



شکل ۱. توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون اسانس کاکوتی کوهی ۵ درصد (۱۳/۰ نانومتر) با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی

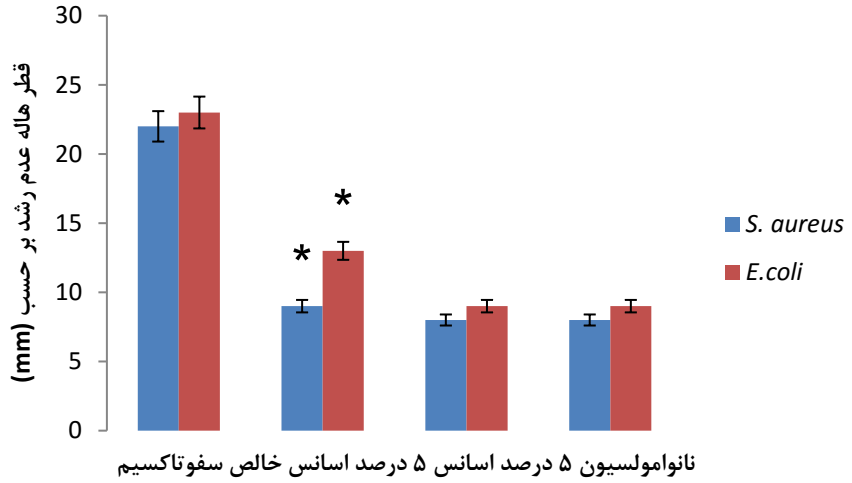


شکل ۲. مشاهده اثرات ضدباکتریایی نانوامولسیون حاوی اسانس ۵ درصد، اسانس خالص، اسانس کاکوتی ۵ درصد و سفوتاکسیم روی باکتری‌های گرم مثبت (راست) و گرم منفی (چپ) با روش انتشار دیسک

طبق ارزیابی انجام‌شده، اندازه قطر هاله عدم رشد نانوامولسیون ۵ درصد در باکتری گرم مثبت ۸ میلی‌متر و گرم منفی ۹ میلی‌متر بود. قطر هاله عدم رشد اسانس خالص در باکتری گرم مثبت ۹ میلی‌متر و گرم منفی ۱۳ میلی‌متر است که نشان‌دهنده اثرات قابل قبول اسانس کاکوتی در برابر باکتری‌های گرم منفی است. در مجموع تأثیر نانوامولسیون نسبت به اسانس خالص با توجه به نتایج حاصل‌شده قابل چشم‌پوشی است. درنهایت مقدار اسانس موجود در نانوامولسیون مدنظر ۵ درصد است. در نمودار ۱ اسانس خالص در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اختلاف معنی‌داری داشته است، اما در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۲. ارزیابی خواص ضدباکتریایی اسانس خالص، اسانس کاکوتی ۵ درصد، نانوامولسیون حاوی ۵ درصد اسانس گیاه کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides*) با توجه به قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

	قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر			
باکتری	نانوامولسیون ۵ درصد اسانس (10micro l/disk)	اسانس خالص ۱۰۰ درصد (10micro l/disk)	اسانس ۵ درصد (10micro l/disk)	سفوتاکسیم
استافیلوکوکوس اورئوس	۸±۱	۹±۱	۸±۱	۲۲±۱
اشریشیا کلی	۹±۲	۱۳±۳	۹±۲	۲۳±۳



نمودار ۱. مقایسه میانگین هاله عدم رشد در باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

* $P<۰/۰۵$

بحث

ترکیبات اصلی اسانس کاکوتی کوهی به ترتیب شامل پولگون (۴۴/۴ درصد)، هگزانوئیک اسید (۱۱/۸ درصد)، ایزومنتون (۴/۷ درصد) و بورنئول (۴/۲ درصد) بود. با توجه به اینکه پولگون بخش عمده‌ای از اسانس را به خود اختصاص داده بود، با نتایج مطالعات دیگر [۱۹،۲۰،۲۱] مشابهت داشت. بر اساس تحقیقات، قسمت عمده اسانس گیاه میکرومریا (Micromeria cilicica) ماده پولگون است که روی باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثرات ضدمیکروبی دارد [۲۲]. بر اساس یافته‌های یک پژوهش، پولگون که نوعی مونوترپن است می‌تواند به غشای سلولی آسیب وارد کند و با ورود به ساختار لیپید دیواره سلولی، باعث دناتوراسیون پروتئین و به هم ریختن تشکیلات سلول شود و با تراوش سیتوپلاسم، سلول از بین می‌رود [۲۳]. با کاهش اندازه قطرات نانوامولسیون، ثبات و پایداری در مقابل پدیده شیری شدن افزایش می‌یابد. اصلی‌ترین عامل بی‌ثباتی در نانوامولسیون‌ها، پدیده درشت شدن ذرات است که با افزایش غلظت سورفکتانت کاهش می‌یابد. خاصیت فیزیکی مواد تشکیل‌دهنده نانوامولسیون، نوع سورفکتانت و روش آماده‌سازی، نقشی اساسی در نگهداری نانوامولسیون از پدیده درشت شدن ذرات دارد [۲۴]. ویسکوزیته نانوامولسیون کم است که این عامل از خصوصیات یک محلول نانوامولسیون است، ولی با افزایش غلظت اسانس، ویسکوزیته نانوامولسیون نیز افزایش می‌یابد [۲۵].

از نظر فیزیک و ساختار تشکیل‌دهنده، امولسیون و نانوامولسیون اسانس متفاوت هستند. برای آماده‌سازی نانوامولسیون حاوی اسانس، کاربرد کمک‌حلال مناسب منجر به تولید یک فرمول بهینه باگرانروی مناسب همراه با پایداری می‌شود [۲۶]. تحقیقی در زمینه اثرات ضدمیکروبی سماق ایرانی و آویشن شیرازی علیه باکتری‌های موجود در غذا نشان داد قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیا کلی* به روش دیسک و فاز بخار به ترتیب ۱۰ و ۲۲ میلی‌متر گزارش شد [۲۷]. در تحقیقی که در رابطه با خاصیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی آویشن شیرازی انجام شد، اندازه قطر هاله ناحیه عدم رشد برای باکتری *اشریشیا کلی* ۱±۹ میلی‌متر به‌دست آمد [۲۸]. دلیل مقایسه بین نانوامولسیون و اسانس ۵ درصد این است که مقدار اسانس مورد نیاز در تهیه نانوامولسیون ۵ درصد است. با توجه به اینکه قطرات اسانس موجود در نانوامولسیون به‌وسیله فاز آبی دارای سورفکتانت احاطه شده است، درنتیجه اثر ضدباکتریایی اسانس خالص در نانوامولسیون مشاهده نشد.

در مطالعه حاضر بهترین عملکرد از نظر میزان هاله مهارکنندگی مربوط به اسانس خالص با ۱۳ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد در باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* بود. اسانس خالص، نانوامولسیون حاوی اسانس ۵ درصد و اسانس ۵ درصد به ترتیب در سویه گرم مثبت، ۹، ۸ و ۸ میلی‌متر و در سویه گرم منفی ۱۳، ۹ و ۹ میلی‌متر است که اختلاف معنی‌دار نداشتند، ولی تیمار شاهد (سفوتاکسیم) با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. در گزارش دیگری که اثرات ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی علیه *اشریشیا کلی* بررسی شده است، قطر هاله عدم رشد در اسانس ۵ درصد، ۸ میلی‌متر و نانوامولسیون، ۹ میلی‌متر بود که اختلاف معنی‌داری نداشتند [۲۹]. نتایج این تحقیق با پژوهش حاضر کاملاً مشابه بود.

در تحقیق دیگری اثرات ضدباکتریایی اسانس و عصاره کاکوتی کوهی بررسی شد و نتایج نشان داد قطر هاله عدم رشد اسانس در باکتری *اشریشیا کلی* (۲۸ میلی‌متر) در مقایسه با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۹ میلی‌متر) عملکرد مؤثرتری داشته است [۳۰] که این نتایج با تحقیق حاضر کاملاً مطابقت داشت. در یک تحقیق دیگر فعالیت‌های ضدباکتریایی و ترکیبات اسانس کاکوتی کوهی در ایران بررسی و مشخص شد قطر هاله عدم رشد در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۲ میلی‌متر) بیشتر از باکتری *اشریشیا کلی* (۲۰ میلی‌متر) است [۳۱]. گزارش دیگری نیز فعالیت ضدمیکروبی چند گونه گیاه دارویی ازجمله کاکوتی را بررسی و مشاهده کرد اثرات ضدمیکروبی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۰ میلی‌متر) بسیار بیشتر از باکتری *اشریشیا کلی* (۱۰ میلی‌متر) است [۳۲] که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نداشت.

در مطالعه انجام‌شده در زمینه اثرات ضدباکتریایی اسانس کاکوتی کوهی روی برخی از باکتری‌های بیماری‌زا مشاهده شد تأثیر اسانس بر قطر هاله عدم رشد در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۴ میلی‌متر و در تیمار کنترل مثبت (آمپی‌سیلین) ۱۳ میلی‌متر بود که نشان‌دهنده اثر ضدباکتریایی زیاد اسانس کاکوتی کوهی است [۳۳]. به‌طورکلی دلیل نبود اختلاف معنی‌دار در مقاله حاضر که با گزارش‌های قبلی متفاوت است (در گزارش‌های قبلی عموماً نانوامولسیون اثر ضدمیکروبی بهتری در مقایسه با اسانس داشته است) احتمالاً به این دلیل است که در حین انجام تست‌های ضدمیکروبی، نانوامولسیون دوفاز شده و ساختار نانویی خود را از دست داده است.

نتیجه گیری

بعد از تحلیل ترکیبات شیمیایی اسانس کاکوتی به‌دست‌آمده از منطقه خراسان شمالی، بیشترین ترکیب تشکیل‌دهنده گیاه کاکوتی کوهی، پولگون بود. بررسی اثر ضدباکتریایی نانوامولسیون ۵ درصد حاوی اسانس و اسانس ۵ درصد نشان داد در هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی بر اساس قطر هاله عدم رشد هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

سپاسگزاری

از آزمایشگاه نانوفناوری پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی که امکانات لازم را برای انجام آزمایش‌های مدنظر فراهم کردند و همکاری لازم را با این پژوهش داشتند، تشکر و قدردانی می‌کنیم (کد اخلاق: IR.NKUMS.REC.1400.077).

تعارض منافع

در پژوهش حاضر هیچ‌گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

References

1. Akhlaghi-Ardekani N, Mohebbi-Kalhori D, Samimi A, Karazhyan R. Improving the Antibacterial and Biofilm properties of Urinary Catheters by Using Green Tea and Ziziphora Extracts. *Sadra Med Sci J*. 2020;**8**(4):381-96. **DOI**: 10.30476/SMSJ.2020.86868.1136
2. Moriarty TF, Zaat SA, Busscher H J. Biomaterials associated infection: immunological aspects and antimicrobial strategies. Springer Science & Business Media; 2012.
3. Combrinck S, Regnier T, Kamatou GPP. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Ind Crops Prod.* 2011;**33**(2): 344-9. **DOI**: 10.1016/j.indcrop.2010.11.011
4. Frewer LJ, Norde W, Fischer A, Kampers F. Nanotechnology in the Agri-Food sectorimplications for the future. John Wiley & Sons; 2011.
5. Shahbazi Y, Shavisi N. Interactions of Ziziphora clinopodioides and Mentha spicata essential oils with chitosan and ciprofloxacin against common food-related pathogens. *LWT Food Sci Technol*. 2016;**71**:364–369. **DOI**: 10.1016/j.lwt.2016.04.011
6. Shahbazi Y, Shavisi N, Mohebi E. Effects of Ziziphora clinopodioides essential oil and nisin, both separately and in combination, to extend shelf life and control Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus in raw beef patty during refrigerated storage. *J Food Saf*. 2016;**36**(2):227–36.
7. Beikmohammadi M. The Evaluation of medicinal properties of Ziziphora clinopodioides. *World Appl Sci J.* 2011;**12**(9):1635–8.
8. Huang Q, Yu H, Ru Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *J Food Sci*. 2010;**75**(1):50-7. **DOI**: 10.1111/j.1750-3841.2009.01457.x **PMID**: 20492195
9. Javadzadeh Y, Bahari L. Therapeutic nanostructures for dermal and transdermal drug delivery. Nano-and Microscale Drug Delivery Systems. Amsterdam: Elsevier; 2017.
10. Chang Y, McLandsborough L, McClements DJ. Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: influence of ripening inhibitors. *J Agric Food Chem*. 2012;**60**(48):12056-63. **DOI**: 10.1021/jf304045a **PMID**: 23140446
11. Hadad Khodaparast MH, Mehraban Sangatash M, Karazhyan R, Habibi Najafi MB, Beiraghi Toosi S. Effect of essential oil and extract of Ziziphora Clinopodioides on Yoghurt Starter culture activity. *World Sci J.* 2007;**2**:194-7.
12. Najafi F, Tavakkoli Z. Comparing essential oil composition and antibacterial effects of Ziziphora tenuior L. in two regions of Iran. *IJMAPR*. 2011;**27**(2):239-48. **DOI**: 10.22092/IJMAPR.2011.6400
13. MEHRBAN SM, Karazhian R, Beyraghi TS. In vitro antimicrobial activity of the essential oil of Ziziphora clinopodioides L. on food spoilage and pathogenic bacteria. *J Med Plant.* 2007;**6**(23):46-51.
14. Ghrenaghadeh S, Samadlouie H R, Sowti M, Gharenaghadeh S. Nano emulsion formulation from essential oil of salvia hypoleuca and investigation of its microbial and physicochemical properties. *J Food Sci Technol.* 2017;**14**(70):337-48.
15. Shahbaz Y. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial properties of Ziziphora clinopodioides Lam. essential oils collected from different parts of Iran. *J Food Sci Technol.* 2017;**54**(11):3491-503. **DOI:** 10.1007/s13197-017-2806-2 **PMID:** 29051644
16. Asri Y, Firozi Ardestani M, Rabie M, Bakhshi-Khaniki G. The effect of enviromental factors on growth charactristics, seed germination and essential oils of Ziziphora clinopodioides. *IJPB*. 2016;**8**(29):91-106. **DOI:** 10.22108/ijpb.2016.21038
17. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia. *Food Chem*. 2007;**103**(4):1449-56. **DOI:** 10.1016/j.foodchem.2006.10.061
18. Merkus HG. Particle size measurements: fundamentals, practice, quality. Springer Science & Business Media; 2009.
19. Behravan J, Ramezania M, Hassanzadeh MK, Eskandari M, Kasaian J, Sabeti Z. Composition, antimycotic and antibacterial activity of Ziziphora clinopodioides Lam. Essential oil from Iran. *J Essent Oil-Bearing plant.* 2007; **10**(4):339-45. **DOI:** 10.1080/0972060X.2007.10643565
20. Shafei M, Sharifan A, Aghazade-Meshki M. Composition of Essential Oil of Ziziphora clinopodioides and Its Antimicrobial Activity on Kluyveromyces marxianus. *Food Sci Nutr*. 2012;**9**(1):101-7.
21. Jafari-Sales A, Shahniani A, Fathi R, Malekzadeh P, Mobaiyen H, Rasi-Bonab F. Evaluation of Antibacterial activity of essential Oil of Ziziphora clinopodioides and Achillea wilhelmsii on Antibiotic-resistant Strains of Staphylococcus aureus. *J Med Invest.* 2017;**2**(2):32-36.
22. Duru ME, Ozturk M, Uğur A, Ceylan O. The Constituents of Essential Oil and in vitro Antimicrobial Activity of Micromeria cilicica from Turkey. *J Ethnopharmacol*. 2004;**94**(1):43-8. **DOI:** 10.1016/j.jep.2004.03.053 **PMID:** 15261961
23. Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory oils against cell membrane and walls of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes. *J Food Prot*. 2006;**69**(5):1046-55. **DOI:** 10.4315/0362-028x-69.5.1046 **PMID**: 16715803
24. Gadhave-Ashish D. Nanoemulsions: formation, stability and applications. *Int J Res Sci Adv Technol*. 2014;**2**(3):38-43.
25. Tadros, Tharwat. Emulsion Formation, Stability, and Rheology. Emulsion formation and stability. 2013;1:1-75.
26. Mandal A, Bera A. Surfactant stabilized nanoemulsion: Characterization and application in enhanced oil recovery. *Int J Chem Biomol Eng.* 2012;**6**(7):543-8.
27. Fazeli M, Amin G, Attari MM, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi N. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food control*. 2007;**18**(6):646-9. **DOI**: 10.1016/j.foodcont.2006.03.002
28. Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH, Khodashenas M, Khoshnoodi M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic Zataria multiflora Boiss. *Food control*. 2007;**18**(7):800-805. **DOI**: 10.1016/j.foodcont.2006.04.002
29. Masoomi V, Tajik H, Moradi M, Forough M, Shahabi N. Antimicrobial effects of *Zataria moltiflora* BOISS. Essential oli nanoemulsion agaist Esherishia coli O157:H7. *J Urmia Nurs Midwifery Fac.* 2016;**27**(7):608-17.
30. Anzabi Y, Khaki A. Antibacterial effects of the essential

oils and ethanol extracts of the native plants; Ziziphora clinopodioides on 3 species of urinary tract isolated bacteria in rats' experimental model. *Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv*. 2015;**37**(3):18-25.
31. Sonboli A, Mirjalili MH, Hadian J, Nejad Ebrahimi S, Yousefzadi M. Antibacterial Activity and Composition of the Essential Oil of Ziziphora clinopodioides subsp. bungeana (Juz.) Rech. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2006;**61**(9-10):677-680. **DOI:** 10.1515/znc-2006-9-1011 **PMID:** 17137113
32. Zakerin AR, Ahmadi E, Fasihi-Ramandi M, Abdollahi S, Molazadeh AR, Jafari S, et al. The effects of ecologic condition on Antimicrobial Activity of Endemic Herbal Extracts in Fars Province. *J Fasa Univ Med Sci.* 2015;**5**(1):111-9.
33. Soltani-Nejad S. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of *Ziziphora clinopodioides Lam.* essential oil against some pathogenic bacteria. *Afr J Microbiol Res.* 2012;**6**(7):1504-8.