

بررسی خواص ضد قارچی و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen.)

عبدالناصر محمدی^{۱*}، حمزه امیری^۲، حامد خدایاری^۱

۱ استادپارگروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران، ۲ دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده

علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

*نویسنده مسول: خرم آباد، کیلومتر ۵ جاده خرم آباد-تهران، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دکتر

چکیده

با توجه به افزایش مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها و تمایل به استفاده از گیاهان دارویی، در مطالعه حاضر ترکیبات شیمیایی و اثرات ضد قارچی اسانس آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus*) (علیه قارچ‌های کاندیدا آلیبکنس، کروزه‌ای و گلابراتا مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه، ترکیب‌های شیمیایی اسانس آویشن کوهی با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌نگار جرمی و فعالیت ضد قارچی آن علیه گونه‌های قارچی به روش میکروداپلوشن انجام و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) قارچ‌ها تعیین گردید. آنالیز شیمیایی اسانس آویشن کوهی منجر به شناسایی ۴۵ ترکیب شد که کارواکرول (۵۲/۴ درصد)، تیمول (۱۰/۴) و گاماترپینن (۱۲/۱۰) عمده‌ترین ترکیبات اسانس آن را تشکیل دادند. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی قارچ‌ها به ترتیب در محدوده ۰/۲۵ تا ۰/۵ و ۰/۵ تا ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس آویشن کوهی از فعالیت ضد قارچی بالایی برخوردار است. لذا با توجه به مقاومت‌های دارویی و اثرات جانبی داروهای ضد قارچی شیمیایی می‌توان با مطالعات بیشتر از اسانس آویشن کوهی به عنوان یک داروی ضد قارچی طبیعی استفاده کرد.

کلید واژه: آویشن؛ اسانس؛ روش میکروداپلوشن؛ فعالیت‌های ضد قارچی؛

مقدمه

جدا شده این گیاه شامل کارواکرول (۴۱/۴ درصد)، تیمول (۱۹/۵ درصد) و گاماترپینن (۱۰/۳ درصد) می‌باشد (Sefidkon and Askari, 2002). روستائیان و همکاران در مطالعه‌ای که از منطقه دیزین استان البرز بر روی *Thymus kotschyanus* انجام دادند، ترکیبات غالب این گیاه را تیمول (۳۸ درصد)، کارواکرول (۱۴/۲ درصد) و ۱ و ۸ - سینئول (۱۳/۲ درصد) را گزارش کردند (Rustaiyan et al., 1999). رسولی و همکاران ترکیبات غالب اسانس *Thymus kotschyanus* را کارواکرول (۳۵/۰۶ درصد)، تیمول (۲۶/۶ درصد) و گاماترپینن (۷/۸۱ درصد) در صد بیان نمودند (Rasooli and Mirmotafa, 2003). اسانس این گیاه در تجارت جهانی جایگاه خاصی دارد (Naghdi, Badi and Makkiza, 2003). اندام هوایی آویشن کوهی برای درمان اختلالات گوارشی استفاده می‌شود. اسانس این گیاه فعالیت‌های بیولوژیک متفاوتی نظیر خواص ضد باکتریایی، قارچی، حشره، درد و آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهد. همچنین بعضی از این روغن‌ها دارای خواص سرطان‌ستند (Pandey et al., 1996; Hammer et al., 1998; Ultee and Smid, 2001; Puertas-Mejia et al., 2002). عفونت‌های قارچی اگرچه در گذشته شیوع کمتری نسبت به عفونت‌های باکتریایی و ویروسی داشته‌اند، ولی در چند دهه اخیر مسوول افزایش چشمگیری در میزان بروز بیماری بوده‌اند. در بررسی‌های انجام شده

جنس آویشن (*Thymus*) یکی از جنس‌های مهم خانواده نعناع (Lamiaceae) و از مشهورترین جنس‌های متعلق به گیاهان اسانس‌دار است. عمدتاً در مناطق مدیترانه، آسیا، جنوب اروپا و شمال آفریقا یافت می‌شوند و دارای ۳۰۰-۴۰۰ گونه می‌باشد. در ایران نیز ۱۸ گونه پایا و معطر دارد که در مناطق مختلف کشور رویش دارند (Stahl-Biskup et al., 2002; Maksimovic et al., 2008). آویشن کوهی (*Tymus kotschyanus*) یکی از گونه‌های آویشن است که در مناطق مختلف ایران شامل مناطق وسیعی از نواحی شمالی، غربی و مرکزی ایران مانند مازندران، گیلان، آذربایجان، کردستان، اطراف تهران، لرستان و برخی مناطق دیگر رشد می‌کند (Zargari et al., 1989). *Tymus kotschyanus* گیاهی چوبی - علفی، تقریباً راست کوتاه قد، ساقه با انشعاب‌های زیاد، بدون شاخه‌های قاعده‌ای خوابیده، رگبرگ‌ها در سطح زیرین برگ برجسته، جام گل سفید یا صورتی کم رنگ که زمان گلدهی اواخر بهار تا اواسط تابستان می‌باشد (Jamzad et al., 2009). آنالیز فیتوشیمیایی گونه‌های آویشن وجود ترکیبات فنلی مانند تیمول، کارواکرول، تیمونین، اسید کافئیک و اسید زمارونیک، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین را تأیید می‌نماید (Blumthall et al., 2000). مطالعات گذشته نشان می‌دهد که عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده *Tymus kotschyanus* را کارواکرول و تیمول تشکیل می‌دهد (Zargari et al., 1989; Rasooli and Mirmotafa et al., 2003; Nickavar et al., 2005). در مطالعه‌ای که توسط سفیدکن و عسگری انجام شد عمده ترکیبات

بررسی فعالیت های ضد قارچی
قارچ های *Candida albicans* سوش استاندارد PTCC: ۵۰۲۷، *Candida glabrata* سوش استاندارد PTCC: ۵۲۹۷ و *Candida kruzei* سوش استاندارد PTCC: ۵۲۹۵ از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. جهت تهیه کشت تازه و فعال از میکروارگانیسم های مورد مطالعه بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار کشت و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. از کنی های مذکور در سرم فیزیولوژی سوسپانسیون قارچی تهیه شد. سپس با استفاده از لام نئوبار غلظتی از سلول های قارچی معادل $10^3 \times 1/5$ اسپور در میلی لیتر بدست آمد.

تعیین حداقل بازدارندگی (MIC) به روش میکروداپلوشن براث

مقدار ۲۵۶ میکرو لیتر از اسانس گیاه *Thymus kotschymanus* در مراحل مختلف رویش در یک میلی لیتر حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد، مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا استوک دارویی استریل تهیه شد. در میکروپلیت های ۹۶ خانه، مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر محیط سابورو دکستروز براث به تمام حفره ها و مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر اسانس به حفره اول اضافه شد. سپس غلظت های سریال (۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲ و ۰/۰۳ میکرو لیتر در میلی لیتر) از اسانس در محیط کشت تهیه گردید. در نهایت مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی که حاوی $10^3 \times 1/5$ اسپور در هر میلی لیتر بود به تمام حفره ها تلقیح شد. در هر بار آزمایش از تمام رقت های اسانس همراه با محیط کشت بدون قارچ به عنوان شاهد منفی جهت مقایسه کدورت و از قارچ ها همراه با محیط کشت به عنوان شاهد مثبت جهت تایید رشد قارچ ها استفاده شد. پس از کشت، میکروپلیت ها شیکر شدند تا مخلوط کاملاً یکنواخت گردد. سپس میکروپلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه قرار داده و نتایج بعد از ۴۸ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. آخرین رقتی که مانع رشد قارچ گردید به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

مقدار ۱۰ میکرو لیتر از هر یک از حفره هایی که قارچ در آن رشد نکرده بود را بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه قرار گرفت و پلیت ها از نظر رشد قارچ بررسی شد. غلظتی از اسانس که مانع رشد $74/9\%$ از سلول های قارچی شد به عنوان حداقل غلظت کشندگی باکتری در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز اسانس *Thymus kotschymanus* در مرحله گلدهی

در اسانس حاصل از بخش های مختلف گیاه *Thymus kotschymanus* ۴۵ ترکیب شناسایی شد که عمده ترین آنها کارواکرول (۵۲/۴ درصد)، تیمول (۱۰/۴) و گاماترپینن (۱۲/۱۰) می باشد که در مجموع ۷۴/۹ درصد کل ترکیبات را تشکیل دادند.

نتایج حاصل از اثرات ضد قارچی اسانس *Thymus kotschymanus* بر روی گونه های کاندیدا

اثرات ضد قارچی اسانس بدست آمده از گونه *Thymus kotschymanus* با روش دیسک دیفیوژن نشان داد که اثرات ضد قارچی اسانس این گیاه بر روی گونه های کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا و کروزه ای به ترتیب تا غلظت های ۱۶، ۳۲ و ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر اثرات مهارتی بیشتری از قطر پلیت از خود نشان دادند. بررسی اثرات غلظت های مختلف گیاه در محدوده ۲۵۶ تا $0/03$ میکروگرم در میلی لیتر با استفاده از روش میکروداپلوشن بر رشد سه گونه

در سال های ۱۹۷۹ تا ۲۰۰۰ در آمریکا بروز عفونت های قارچی ۲۰۷ درصد افزایش داشته است. جنس کاندیدا (*Candida spp*) گونه های زیادی را شامل می شود که ساکن طبیعی دستگاه گوارش، مخاط دهان و واژن است و انسان هنگام تولد در عبور از واژن آن را کسب می کند. اصلی ترین و شایع ترین عامل بیماری زای انسانی کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) است که به عنوان چهارمین عامل عفونت های خونی بیماران بستری در بیمارستان ها مطرح شده است (Martin et al., 2003; Al-Fattani et al., 2006; Patterson et al., 2007). وجود محدودیت هایی مانند تعداد کم داروهای ضد قارچی، سمی بودن آنها برای سلول های بدن و افزایش مقاومت گونه های مختلف کاندیدا به داروهای ضد قارچی از جمله فلوکونازول، امروزه توجه محققین را به یافتن ترکیبات جدید با خواص مهارکنندگی رشد میکروارگانیسم ها با منشأ طبیعی معطوف کرده است (Calderone et al., 2002; Li et al., 2005). بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی خواص ضد قارچی اسانس *Thymus kotschymanus* در سه مرحله نموی بر علیه برخی از گونه های کاندیدا و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس این گیاه در مرحله گلدهی با استفاده از دستگاه GC/MS می باشد.

مواد و روش ها

ارگانیزم ها

به منظور تعیین حساسیت عوامل قارچی نسبت به اسانس گیاه *Thymus kotschymanus* از مخمرهای بیماری زای *Candida albicans*، *Candida glabrata* و *Candida kruzei* استفاده شد.

نحوه جمع آوری گیاهان

گیاه *Thymus kotschymanus* از منطقه جغرافیایی گردن زاغه از فروردین ماه تا تیرماه سال ۹۱ در مراحل مختلف رویشی قبل از گلدهی، زمان گلدهی و بعد از گلدهی جمع آوری و شناسایی شد. بعد از شناسایی، نمونه ها خشک شده و اسانس گیری با دستگاه کلونجر و آنالیز مواد مؤثره با گاز کروماتوگرافی انجام شد.

اسانس گیری

تهیه اسانس به روش تقطیر با آب و بخار انجام شد. مقدار ۱۰۰ گرم از تمام بخش های گیاهان (گل - ساقه - برگ و ...) خشک و پاک شده را با استفاده از آسیاب برقی خرد و گیاه پودر شده به داخل بالن ژوژه دستگاه اسانس گیری (کلونجر مدل دارونامه بریتانیا) ریخته و به آن ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. جریان آب سرد مبرد برقرار، بالن ژوژه درون هیتر برقی دستگاه قرار گرفت. دستگاه روشن و اجازه داده شد تا مدت دو ساعت فرایند تقطیر انجام شود.

آنالیز اسانس ها

جهت آنالیز و شناسایی ترکیبات اسانس از دستگاه های گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. اسانس در شرایط مشابه و یکسان به دستگاه تزریق شد تا نوع ترکیب های تشکیل دهنده آنها مشخص شود. دستگاه GC از مدل Agilent ۶۸۹۰ و دستگاه MS از مدل Agilent ۵۹۷۳ با ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع ۵MS-HP بود. طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent ۵۹۷۳ با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتیگراد بود. شناسایی طیف ها به کمک شاخص بازدارندگی آنها و مقایسه آن با شاخص های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت.

جدول ۱: مواد شناسایی اسانس گونه *Thymus daenensis* subsp. *Lancifolius* در مرحله گلدهی

ردیف	نام ترکیب	RI	درصد	ردیف	نام ترکیب	RI	درصد
۱	Borneol	۲۴	۰,۷۵	۱۱۶۶	۲۴	Borneol	۰,۷۵
۲	ε-Terpeneol	۲۵	۰,۴۸	۱۱۸۷	۲۵	ε-Terpeneol	۰,۴۸
۳	Carvacrol methyl ether	۲۶	۰,۰۳	۱۲۴۲	۲۶	Carvacrol methyl ether	۰,۰۳
۴	Thymol	۲۷	۱۶,۴۳	۱۲۶۷	۲۷	Thymol	۱۶,۴۳
۵	Carvacrol	۲۸	۵۲,۳۴	۱۲۹۹	۲۸	Carvacrol	۵۲,۳۴
۶	Thymyl acetate	۲۹	۰,۰۵	۱۳۵۱	۲۹	Thymyl acetate	۰,۰۵
۷	eugenol	۳۰	۰,۰۲	۱۳۵۱	۳۰	eugenol	۰,۰۲
۸	Carvacryl acetate	۳۱	۰,۱۱	۱۳۵۸	۳۱	Carvacryl acetate	۰,۱۱
۹	Alpha-Ylagene	۳۲	۰,۰۱	۱۳۶۸	۳۲	Alpha-Ylagene	۰,۰۱
۱۰	Beta-Bourbonene	۳۳	۰,۰۳	۱۳۸۲	۳۳	Beta-Bourbonene	۰,۰۳
۱۱	Trans-Caryophyllene	۳۴	۱,۸۳	۱۴۱۴	۳۴	Trans-Caryophyllene	۱,۸۳
۱۲	Alpha-Caryophyllene	۳۵	۰,۰۷	۱۴۱۴	۳۵	Alpha-Caryophyllene	۰,۰۷
۱۳	Germacrene D	۳۶	۰,۴۲	۱۴۷۹	۳۶	Germacrene D	۰,۴۲
۱۴	Bicyclogermacrene	۳۸	۰,۲۶	۱۴۹۲	۳۸	Bicyclogermacrene	۰,۲۶
۱۵	Beta-Bisabolene	۳۹	۰,۶۴	۱۵۱۱	۳۹	Beta-Bisabolene	۰,۶۴
۱۶	Delta-Cadinene	۴۰	۰,۰۵	۱۵۲۶	۴۰	Delta-Cadinene	۰,۰۵
۱۷	Cis-alpha-Bisabolene	۴۱	۰,۷۳	۱۵۱۷	۴۱	Cis-alpha-Bisabolene	۰,۷۳
۱۸	Neryl acetate	۴۲	۰,۰۱	۱۳۶۰	۴۲	Neryl acetate	۰,۰۱
۱۹	Spathulene	۴۳	۰,۱۹	۱۵۸۹	۴۳	Spathulene	۰,۱۹
۲۰	Spathulene	۴۳	۰,۱۹	۱۵۸۹	۴۳	Spathulene	۰,۱۹
۲۱	Caryophyllene Oxide	۴۴	۰,۲۰	۵۹۶	۴۴	Caryophyllene Oxide	۰,۲۰
۲۲	Farnesol	۴۵	۰,۰۴	۱۷۸۵	۴۵	Farnesol	۰,۰۴
۲۳	Tricyclene	۹۰۹	۰,۰۱		۲۳	Tricyclene	۰,۰۱
۲۴	Alpha-Thujene	۹۱۶	۰,۹۲		۲۴	Alpha-Thujene	۰,۹۲
۲۵	Alpha-Pinene	۹۲۶	۰,۴۵		۲۵	Alpha-Pinene	۰,۴۵
۲۶	Comphene	۹۶۱	۰,۲۳		۲۶	Comphene	۰,۲۳
۲۷	Sabinene	۹۷۰	۰,۱۱		۲۷	Sabinene	۰,۱۱
۲۸	Beta-Pinene	۹۶۷	۰,۱۴		۲۸	Beta-Pinene	۰,۱۴
۲۹	۲-Octanone	۹۸۰	۰,۶۳		۲۹	۲-Octanone	۰,۶۳
۳۰	۱-Octen-۳-ol	۹۷۷	۰,۰۷		۳۰	۱-Octen-۳-ol	۰,۰۷
۳۱	Beta-Myrcene	۹۹۲	۱,۱۹		۳۱	Beta-Myrcene	۱,۱۹
۳۲	۲-Octanol	۹۸۸	۰,۰۵		۳۲	۲-Octanol	۰,۰۵
۳۳	Phellandrene	۱۰۰۰	۰,۱۷		۳۳	Phellandrene	۰,۱۷
۳۴	Alpha-Terpinene	۱۰۲۳	۱,۲۲		۳۴	Alpha-Terpinene	۱,۲۲
۳۵	Cymol	۱۰۲۶	۳,۲۶		۳۵	Cymol	۳,۲۶
۳۶	۱,۸-Cineole	۱۰۰۹	۰,۶۰		۳۶	۱,۸-Cineole	۰,۶۰
۳۷	Limonene	۱۰۲۵	۰,۱۸		۳۷	Limonene	۰,۱۸
۳۸	Beta-Ocimene Y	۱۰۳۹	۰,۰۶		۳۸	Beta-Ocimene Y	۰,۰۶
۳۹	Gamma-Terpinene	۱۰۲۶	۱۰,۸۶		۳۹	Gamma-Terpinene	۱۰,۸۶
۴۰	Cis-Sabinene hydrate	۱۰۶۹	۰,۳۱		۴۰	Cis-Sabinene hydrate	۰,۳۱
۴۱	۲-Nonanone	۹۰۳	۰,۰۴		۴۱	۲-Nonanone	۰,۰۴
۴۲	Alpha-Terpinolene	۱۰۸۹	۰,۰۷		۴۲	Alpha-Terpinolene	۰,۰۷
۴۳	Cis-beta-Terpeneol	۱۱۴۴	۰,۱۰		۴۳	Cis-beta-Terpeneol	۰,۱۰
۴۴	Cis-beta-Terpeneol	۱۱۴۴	۰,۱۰		۴۴	Cis-beta-Terpeneol	۰,۱۰
۴۵	Linalool	۱۰۹۸	۰,۲۶		۴۵	Linalool	۰,۲۶
۴۶	Trans-Sabinene hydrate	۱۰۶۴	۰,۰۱		۴۶	Trans-Sabinene hydrate	۰,۰۱

سلول‌های بدن انسان و از طرفی مقاومت‌های ذاتی و اکتسابی دارویی نسبت به قارچ‌ها از جمله گونه‌های کاندیدا و همچنین گرایش به داروهای گیاهی به دلیل تاثیرگذاری مناسب و عوارض جانبی کم، استفاده از آن را افزایش داده است.

در مطالعه حاضر ترکیبات شیمیایی موجود در مرحله گلدهی اسانس این گیاه توسط روش کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی شناسایی و تاثیر مهاری اسانس *Th. kotchyanus* در سه مرحله نموی علیه قارچ‌های *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. krusei* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی ترکیب شیمیایی اسانس آویشن کوهی در مطالعه حاضر تا حدودی با سایر بررسی‌های صورت گرفته توسط محققین دیگر مطابقت دارد (Sefidkon et al., 2002; Rustaiyan et al., 1999; Rasooli and Mirmotafa, 2003). در اغلب این مطالعات ترکیباتی مانند کارواکرول، تیمول، گاماترپینن و ۱، ۸- سینتول عمده‌ترین اجزاء اسانس آویشن کوهی بوده که در مطالعه حاضر نیز عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده این گیاه را کارواکرول (۵۲/۴ درصد)، تیمول (۱۰/۴) و گاماترپینن (۱۲/۱۰) را تشکیل داد (جدول ۱). دو ترکیب کارواکرول و تیمول که از ترکیبات کلیدی اسانس این گیاه هستند، مقادیرشان متفاوت بوده و تعادل بین دو ترکیب می‌تواند تحت تاثیر ارتفاع قرار گیرد که با افزایش ارتفاع میزان کارواکرول کاهش و تیمول افزایش

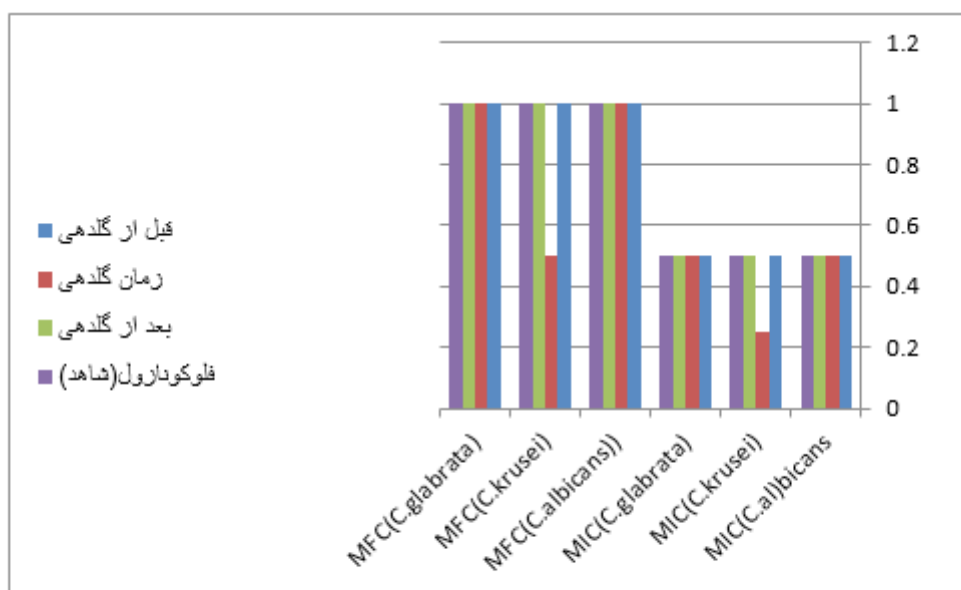
کاندیدا نشان داد که اسانس این گیاه قادر به مهار رشد تا غلظت ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. بنابراین MIC اسانس این گیاه به ترتیب برای گونه‌های کاندیدا آلیکنس، گلابراتا و کروزه‌ای ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و MFC ۱، ۰/۵، ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد (جدول ۱).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان می‌دهد که بین میانگین MIC و MFC اسانس *Thymus kotschyanus* در غلظت‌های مختلف بر روی گونه‌های کاندیدا (بجز کاندیدا کروزه‌ای) در مقایسه با شاهد فلوکونازول در سطح احتمال ۰/۰۰۱ تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دنت استفاده شد ($P < 0/001$). میانگین غلظت اسانس *Thymus kotschyanus* در مراحل قبل گلدهی، زمان گلدهی، بعد از گلدهی در مقایسه با شاهد بر روی سه گونه کاندیدا با هم مقایسه گردید. بیشترین میزان MIC و MFC مربوط به کاندیدا کروزه‌ای بوده از طرفی اثرات ضد قارچی اسانس این گیاه در زمان گلدهی بیشترین اثر را بر روی کاندیدا کروزه‌ای داشته است (نمودار ۱).

سیر روز افزون ابتلا به بیماری‌های کاندیدیایی در افراد مستعد (تحت درمان آنتی بیوتیک، افراد ایدزی و...) وجود محدودیت‌هایی مانند تعداد کم داروهای ضد قارچی مؤثر بر گونه‌های کاندیدا، سمی بودن آنها برای

جدول ۲: نتایج حاصل از آنالیز واریانس اثرات ضد قارچی اسانس *Thymus kotschyanus* بر روی گونه‌های کاندیدا

گونه قارچی	اسانس	محدوده غلظت (میکروگرم/میلی لیتر)	میانگین MIC	میانگین MFC
<i>Candida albicans</i>	قبل از گلدهی	۶۴-۰/۰۳	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^A	۱۰ ± ۰/۰۱
	زمان گلدهی	۶۴-۰/۰۳	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^A	۱۰ ± ۰/۰۱
	بعد از گلدهی	۶۴-۰/۰۳	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^A	۱۰ ± ۰/۰۱
	فلوکونازل (شاهد)	۶۴-۰/۰۳	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^A	۱۰ ± ۰/۰۱
<i>Candida krusei</i>	قبل از گلدهی	۶۴-۰/۰۳	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^B	۱۰ ± ۰/۰۱
	زمان گلدهی	۶۴-۰/۰۳	۰/۲۵ ± ۰/۰۱ ^A	۰/۵۰ ± ۰/۰۵
	بعد از گلدهی	۶۴-۰/۰۳	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^B	۱۰ ± ۰/۰۱
	فلوکونازل (شاهد)	۶۴-۰/۰۳	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^B	۱۰ ± ۰/۰۱
<i>Candida glabrata</i>	قبل از گلدهی	۶۴-۰/۰۳	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^A	۱۰ ± ۰/۰۱
	زمان گلدهی	۶۴-۰/۰۳	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^A	۱۰ ± ۰/۰۱
	بعد از گلدهی	۶۴-۰/۰۳	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^A	۱۰ ± ۰/۰۱
	فلوکونازل (شاهد)	۶۴-۰/۰۳	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^A	۱۰ ± ۰/۰۱



نمودار ۱: مقایسه میانگین MIC و MFC اسانس *Thymus kotschyanus* در مراحل مختلف بر روی گونه‌های

کاندیدا

دارد (جدول ۲). این پتانسیل ناشی از ترکیبات مانند تیمول و کارواکرول بوده که از خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی خوبی برخوردار می‌باشند. کارواکرول ترکیب اصلی اسانس آویشن کوهی (*Th. kotschyanus*) بوده که نه تنها باعث مهار جمعیت میکروبی می‌شود بلکه با افزایش نفوذپذیری غشاء قارچ‌ها، آنها را نسبت به سایر مواد ضد قارچی حساس و آسیب پذیر می‌نماید (Helander et al., 1998). ترکیبات دیگر مانند گاما - ترپینن که با مقدار کمتر در اسانس آویشن کوهی وجود دارد به علت تعامل با کارواکرول و تیمول خاصیت سینرژیک داشته و می‌تواند اثرات ضد میکروبی آنها را افزایش دهد (Vardar-Unlu et al., 2003). در مطالعات انجام شده در داخل و خارج از کشور اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی تعدادی از گیاهان دارویی مانند نظیر اسطوخودوس، آویشن شیرازی، آویشن کوهی، اکلیل کوهی، سیاه دانه، درمنه مورد بررسی قرار گرفته و مثبت ارزیابی شده است (Shahidi

می‌باید که نمونه مطالعه حاضر از مناطق کم ارتفاع کم جمع‌آوری شد که میزان کارواکرول بیش از تیمول گزارش گردید (Ebrahimi et al, 2013). مزوجی و همکاران با مقایسه ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن کوهی دریافتند که مهمترین تفاوت در میزان کارواکرول و تیمول در بین جمعیت‌های مورد بررسی به علت تفاوت در فاکتورهای اکولوژی و جغرافیایی است (Mazooji et al., 2003). فعالیت ضد قارچی اسانس *Th. kotschyanus* در برابر قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا و کروزه‌ای در این مطالعه ابتدا به روش دیسک دیفیوژن مثبت گزارش شد که به ترتیب تا غلظت‌های ۱۶، ۱۶ و ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر فطر هاله عدم رشد بیش از قطر پلیت بود، سپس MIC اسانس مورد نظر به روش میکرودیالوژن بر روی گونه‌های نامبرده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس آویشن کوهی پتانسیل بالایی از فعالیت‌های ضد قارچی در برابر هر قارچ (مخمر) مورد آزمایش

al., 2011). براساس نتایج حاصل از بررسی‌های ضد قارچی در این مطالعه، تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس *Th. Kotschyanus* بر میزان رشد گونه‌های کاندیدیای مورد مطالعه از نظر آماری متفاوت بود بطوری که اثر اسانس این گیاه بر کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا معنی‌دار نشد ولی با کاندیدا کروزه‌ای معنی‌دار گردید ($P > 0.0001$)، هرچند در این مطالعه با افزایش غلظت اسانس، میزان رشد گونه‌های کاندیدیای مورد مطالعه کاهش یافت. باتوجه به اینکه استفاده از گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی از عوارض جانبی کمتری برخوردار بوده و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه هستند، لذا ضروری است تا با مطالعات بیشتر بر روی خواص ضد قارچی و ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آویشن کوهی بتوان در آینده به نتایج مطلوبی دست یافته و اسانس این گیاه را جایگزین داروهای ضد قارچی نمود. این مطالعه در راستای حل مشکلاتی چون اثرات جانبی داروهای ضد قارچی شیمیایی و جایگزینی آنها با داروهای ضد قارچی گیاهی جهت‌گیری شد.

نتیجه‌گیری

از آنجا که اسانس‌های جدا شده از *Thymus kotschyanus* بر روی گونه‌های *Candida* به کار رفته در این مطالعه اثر بازدارندگی و ضد قارچی خوبی داشتند، لذا می‌توان از آنها به عنوان اسانس‌های مفید بر علیه این گروه از قارچ‌ها و حتی با مطالعات وسیع‌تر بر روی قارچ‌های رشته‌ای استفاده نمود، اما بررسی خاصیت ضد قارچی این اسانس در شرایط *Invivo* نیاز به بررسی اثرات دما، pH، مواد داخل بدن موجود زنده و بر روی آن و همچنین ایجاد مقاومت دارویی در برابر این اسانس‌ها و مطالعات تکمیلی‌تر دارد.

et al., 2004; Rasooli and Mirmotafa, 2003; Zarei et al., 2006; Nariman et al., 2007; Negahban et al., 2001; Letessier et al., 2004; et al.). در مطالعه Obaidat و همکاران اثر کارواکرول و تتراسیکلین بر روی کاندیدا آلبیکنس و پنج سوش باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که دیسک‌های حاوی ۴۰ میکروگرم کارواکرول تاثیر بسیار خوبی بر روی کاندیدا آلبیکنس دارند (Obaidat et al., 2011). در مطالعه Vardar-Unlu و همکاران که اثر کارواکرول را بر روی کاندیدا آلبیکنس بررسی کرده بودند MIC ۵۰ و ۹۰ به ترتیب ۶۴ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید که در تحقیق ما MIC نتایج بهتری را از خود نشان داد (Vardar- Unlu et al., 2010). در مطالعه‌ای که توسط محمدی و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد فعالیت ضد قارچی تعدادی از گیاهان از جمله آویشن کوهی را بر روی *Aspergillus flavus*، فوزاریوم اگزیسپوروم و آلتناریا آلترناتا مورد بررسی قرار گرفت و MIC آنها به ترتیب ۰/۵، ۱ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید (Mhammedi et al., 2014). در مطالعاتی که فرزانه و نگهبان بر روی اسانس درمنه انجام دادند اثرات ضد قارچی این گیاه را بر روی قارچ فوزاریوم قوی گزارش نمودند (Negaban et al., 2007; Farzaneh, 2006). در مطالعه دیگری امینی و همکاران اثرات ضد قارچی آویشن کوهی را بر روی قارچ‌ها بررسی، نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس این گیاه در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بطور کامل مانع رشد قارچ‌ها شد (Amini et al., 2012). در مطالعه محمدپور و همکاران MIC آویشن شیرازی، آویشن کوهی مازندران و آویشن دناهی بر روی کاندیدا آلبیکنس به ترتیب ۱، ۳ و ۰/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید که با مطالعه انجام شده در این تحقیق مطابقت دارد (Mohammadpour et

- three genus of thyme plants and two ecotype of ziziphora and satureja bachtiarica essential oils. Journal of Sciences (Islamic Azad University). Vol, 20, 78(1): 111-122
- Naghdi Badi, H. and Makkizade Tafti, M. (2003). Review of *Thymus vulgaris* L. J. Medicinal Plants. 7: 1 - 12
- Nariman, E., Eftekhar, F., Habibi, Z. and Falsafi, T. (2004). Anti-Helicobacter pylori activities of six Iranian plants. Helicobacter. 9 (2): 146 - 51
- Negahban, M., Moharramipour, S. and Sefidkon, F. (2007). Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. Journal of Stored Product Research. 43: 123 - 8
- Nickavar, B., Mojab, F. and Dolat-abadi, R. (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. Food Chemistry. 90: 609-611
- Obaidat, RM., Bader, A., Al-Rajab, W., Abu Sheikha, G. and Obaidat, A.A. (2011). Preparation of mucoadhesive oral patches containing tetracycline hydrochloride and carvacrol for treatment of local mouth bacterial infections and candidiasis. Sci Pharm. 79(1): 197-212
- Pandey, M.C., Sharma, J.R. and Dikshit, A. (1996). Antifungal evaluation of the essential oils of *Cymbopogon pendulus* (Nees ex Steud.) Wats. Cv. Praman. Flavor and Fragrance Journal. 11: 257-260
- Patterson, T. (2007). Treatment and prevention of fungal infections. Focus on candidemia. New York: Applied Clinical Education. 23: 7-80
- Puertas-Mejia, M., Hillebrand, S., Stashenko, E. and Winterhalter, P. (2002). In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. Flav. Frag. J. 17(5): 380-384
- Rasooli, I. and Mirmostafa, S.A. (2003). Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. J. Agric. Food Chem. 51: 2200- 2205
- Rustaiyan, A., Lajvardi, T., Rabbani, M., Yari, M. and Masoudi, S.H. (1999). Chemical constitution of the essential oil of *Thymus kotschyanus* from Iran. Daru. 7 (4): 27 - 8
- Sefidkon, F. and Askari, F. (2002). Essential oil composition of 5 *Thymus* species. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 12: 29 -51
- Shahidi Bonjar, G.H. (2004). Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. Fitoterapia. 75: 231 - 3
- Stahl-Biskup, E. and Saez, F. (2002). Thyme, The genus *Thymus*. Taylor and Francis, 331
- Ultee, A. and Smid, E.J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. Int. J. Food Microbiol. 64: 373-378
- Vardar-Unlu, G., Candan, F., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, M., Donmez, E. and Tepe, B. (2003). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). J. Agric. Food Chem. 51:63-67
- Vardar-Unlu, G., Yagmuroglu, A. and Unlu, M. (2010). Evaluation of in vitro activity of carvacrol against *Candida albicans* strains. Nat Prod Res. 24(12): 1189-93
- Zarei, A., Dabbagh, M. and Fouladi, Z. (2006). In-vitro anti candida activity of *Zataria multiflora* Boiss. eCAM 2007; 4(3): 351-353
- Zargari, A. (1989). Medicinal plants (In Persian 4th ed. Tehran University Press, Iran). 4: 28 - 38
- Al-Fattani, M.A. and Douglas, L.J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol. 55(Pt 8): 999-1008
- Amini, M., Safaie, N., Salmani, M.J. and Shams-Bakhsh, M. (2012). Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. Trakia J. Sci. 10(1):1-8
- Blumenthal, M., Goldberg, A. and Brinckmann, J. (2000). Herbal Medicine, Expanded Commission. E Monographs. Integrative Medicine Communications, Newton, pp. 376-378
- Calderone, R.A. (2002). *Candida* and Candidiasis. A. S. M Press, 1752N St. NW, Washington, DC20036- 2904, USA : 349 - 73
- Ebrahimi, Zabet, S.H., Azizi, A. and Hasani, A. (2013). The effect of altitude on the essential oil content and quality of habitat in Alvandi Thyme (*Thymus elwendicus*). Eighth Congress of Iranian Horticultural Science September. Bu Ali Sina University. 2013
- Farzaneh, M. (2006). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soil-borne phytopathogens – commun. Agric. Apple Biol Sci. 71 (3 pt B): 1327 - 33
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. (1998). In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 42:591-595
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I. and Smid, E.J.(1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 46 (9): 3590-3595
- Jamzad, Z. (2009). *Thymus* and *Satureja* of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands press. pp: 171
- Letessier, M.P, Svoboda, K.P. and Walters, D.R. (2001). Antifungal activity of the Essential oil of Hyssop (*Hyssopus officinalis*). Journal of Phytopathol. 149 (11 - 12): 673 - 8
- Li, H., Qing, C., Zhang, Y. and Zhao, Z. (2005). Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. World Journal of Microbial Biotechnol. 21: 1515-1519
- Maksimovic, Z., Stojanovic, D., Sostaric, I., Dajic, Z. and Ristic M. (2008). Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil. Journal of the Science of Food and Agriculture. 88: 2036-2041
- Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S. and Moss, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. The New England Journal of Medicine. 348(16): 1546-54
- Mazooji, A., Salimpur, F., Danaei, M., Akhoondi Darzikolaei, S. and Shirmohammadi, K. (2012). Comparative study of the essential oil chemical composition of *Thymus Kotschyanus* Boiss. & Hohen. Var *kotschyanus* from Iran. Annals of Biological Research. 3 (3): 1443 - 1451
- Mohammadi, A., Nazari, H., Imani, S. and Amrollahi, H. (2014). Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants. Journal de Mycologie Medical. 24(2): 1-8
- Mohammadpour, G., Majd, A., Najhadsatari, T., Mehrabian, S. and Hossinzadehkalagar, A. (2011). Antibacterial and antifungal effects of

Abdelnaser Mohammadi¹, Hamzeh Amiri², Hamed Khodayari¹

1-Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University .

2-Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorram-
abad, Iran

Abstract

Due to the increasing drug resistance microorganisms and tend to use medicinal plants in the present study, biochemical composition and antifungal effects of *Thymus Kotschyanus* essential oil against *Candida albicans*, *krusei* and *glabrata* have been evaluated. In this study, the chemical composition and antifungal activity essential oil by the Gas chromatography/ mass spectrophotometer (GC/MS) and micro dilution method was determined respectively. The collected data was analyzed by the Minitab 16 software using ANOVA. The chemical analysis of the essential oil by Gas chromatography/ mass spectrophotometer (GC/MS) revealed the presence of 45 substances, mainly including carvacrol (52.4%), Gamatrpynen (12.1%) and thymol (10.4). MIC and MBC of the essential oil determined in the range of 0.25 to 0.5 and 0.5 to 5 μ g/ ml, respectively. The results of this study indicate that essential oil *Thymus Kotschyanus* have a high antibacterial activity. Due to drug resistance and side effects of antifungal drugs are chemical can more studies of thyme essential oil as a natural anti-fungal drug use

Keywords: *Thymus kotschyanus*; essential oil; microdilution broth method; antifungal activity;