DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3

بررسی اثرات ضدمیکروبی و ترکیب‌های شیمیایی اسانس جمعیت‌های *Thymus fedtschenkoi* Ronniger در دو استان سمنان و زنجان

فاطمه عسکری[1*]، ابراهیم شریفی عاشورآبادی[1]، مریم تیموری[1] و عاطفه بهمن‌زادگان[2]

[1] **ایران، تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور،**

[2] **ایران، شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات منابع طبیعی استان فارس**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۷

چکیده

در این مطالعه اثرات ضدمیکروبی دو اکسشن از گونه *Thymus fedtschenkoi* از استان‌های زنجان و سمنان بر ضد باکتری‌های *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* و قارچ *Candida albicans* بررسی شد. استخراج اسانس با دستگاه کلونجر و شناسایی ترکیب‌ها با استفاده از دستگاه‌های GC و GC-MS صورت گرفت. برای بررسی اثرات ضدمیکروبی از روش انتشار از دیسک و روش رقت‌سازی در لوله استفاده شد. آزمایش اثرات ضدمیکروبی اسانس در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با دو عامل میکروارگانیسم (عامل اول) و رقت اسانس (عامل دوم) انجام شد. براساس نتایج، بازده اسانس در دو سال برداشت در اکسشن زنجان (۰/۹۵ و ۰/۷۳ درصد) و اکسشن سمنان (۰/۸۳و ۰/۸۶ درصد) بود. ترکیب‌های عمده در اکسشن زنجان شامل پارا-سیمن، لینالول، تیمول و کارواکرول و در اکسشن سمنان پارا-سیمن، تیمول و کارواکرول بود. نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین داده‌های ضدمیکروبی نشان داد که اثر نوع میکروارگانیسم و رقت اسانس و اثر متقابل این دو عامل بر میانگین قطر هاله عدم رشد در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. در اکسشن سمنان بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد در گونه *C. albicans* و در رقت یک پنجم اسانس مشاهده شد. میکروارگانیسم‌های *C. albicans* و *B. subtilis* به اکسشن زنجان و *C. albicans* به اسانس اکسشن سمنان حساسیت بیشتری از خود نشان دادند. تفاوت در حساسیت میکروارگانیسمها می‌تواند ناشی از تفاوت در ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس و اثرات ضدمیکروبی اجزای تشکیل دهنده آن باشد.

واژه های کلیدی: آویشن، اسانس، زنجان، سمنان، ضدمیکروبی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۵-۴۴۵۸۰۲۸۲، پست الکترونیکی: fasgari@rifr-ac.ir

مقدمه

بروز مقاومت‌های دارویی علیه آنتی‌بیوتیک‌ها و گسترش جهانی این مشکل که درمان برخی از عفونت‌ها را با مشکلات جدی مواجه می‌کند باعث شده است که محققان بدنبال یافتن ترکیب‌های جدید با اثرات ضدمیکروبی قوی برای مقابله با این مشکل باشند. گیاهان دارویی از جمله منابعی هستند که برای تولید ترکیبات ضدمیکروبی جدید می‌توانند مورد استفاده قرارگیرند (۲۴). ترکیب‌های طبیعی جدا شده از گونه های مختلف جنس تیموس از جمله اسانس‌ها خواص ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد ویروسی دارند (۲۵).

آویشن یا *Thymus* یکی از جنس‌های خانواده نعنا است. در حدود ۲۱۵ گونه از این جنس شناسایی شده است که ۱۸ گونه آن در ایران رویش دارد (۱۱،۱۹). آویشن‌ها گیاهانی چند ساله به فرم بوته‌ای و کپه‌ای هستند. ساقه آنها

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3

چهار گوش است و سطح ساقه و برگ پوشیده از کرک-های محافظتی می‌باشد. کرک‌های غده‌ای که محل انباشتگی اسانس هستند در سطح گل، برگ و گاهی ساقه مشاهده می‌شوند. گونه‌های آویشن در مناطق مدیترانه گسترش یافته‌اند. گونه *Thymus fedtschenkoi* در ترکیه، قفقاز و ایران می‌روید و یکی از گونه‌های بومی آویشن در ایران است. این گونه در مناطق کوهستانی خزری و ایرانی تورانی در ارتفاع ۲۵۰ تا ۳۷۵۰ متری در استان‌های مازندران، گیلان، گلستان، آذربایجان، تهران، قزوین و کردستان رویش دارد (۱۱). ترکیب‌های عمده اسانس این گونه شامل تیمول و کارواکرول (۱۰،۶،۳) است و گاهی اوقات لینالول (۱۶، ۲۱) و ترپینیل استات (۱۷) نیز به عنوان ترکیب غالب گزارش شده است. از گونه‌های آویشن به ویژه گونه *Th. fedtschenkoi* برای درمان سرماخوردگی و عفونت‌های دستگاه تنفسی و نیز به عنوان طعم دهنده و نگهدارنده مواد غذایی استفاده می‌شود.

محتوای اسانس گیاهان دارویی و فعالیت زیستی آنها براساس روش‌های مختلف کشت، خاستگاه، مرحله رویشی و فصل رویش تغییر می‌کند (۵). فعالیت ضدمیکروبی گونه‌های مختلف آویشن در تحقیقات متعدد مطالعه شده است و به نظر می‌رسد تیمول مسئول ویژگی-های ضدمیکروبی اسانس آویشن باشد. در مطالعه مقایسه-ای ترکیب‌های شیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی انواع خودرو (وحشی) و کاشته شده گونه *Th. fedtschenoi* از آذربایجان‌شرقی مطالعه شد. ترکیب‌های عمده نمونه خودرو شامل تیمول (۲۱ تا ۴۹ ٪)، پاراسیمن (۲۰ تا ۱۵ ٪)، کارواکرول (۱۰ تا۲۰ ٪) و ترکیب‌های اصلی در نمونه کشت شده شامل تیمول (۶۲/۳۳ ٪) و کارواکرول (۷/۱۲ ٪) بود. شاخص MIC برای نمونه خودرو بین ۲-۱۲۸µg/ml و نمونه کشت شده ۲-۱۶µg/ml بود (۱۲). در مطالعه دیگری خواص ضدمیکروبی اسانس و عصاره گونه *Th. daenesis* بر ضد *Candida albicans*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumonia* تائید شده است (۷). در تحقیقی اثرات ضدمیکروبی و ترکیب شیمیایی اسانس گونه آویشن دنایی مطالعه شد. ترکیب‌های عمده شامل تیمول (۲۹/۸ ٪)، کارواکرول (۱۳/۶ ٪)، پاراسیمن (۱۱/۳ ٪)، بورنئول (۶/۸ ٪)، ۱، ۸-سینئول (۵/۸۹ ٪) بود. فعالیت ضدمیکروبی اسانس بر ضد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و سه قارچ با استفاده از روش انتشار از دیسک مطالعه شد. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری *S. aureus* حساس‌ترین باکتری به اسانس است و اسانس این گونه فعالیت ضد-قارچی بر ضد همه قارچ‌های مورد آزمون نشان داده است (۲۳). در تحقیق دیگری فعالیت ضدمیکروبی گونه *Th. fedtschenkoi* با استفاده از آزمون‌های MBC و MIC تائید شده است (۴). اثرات ضدمیکروبی *Th. kotschyanus* بر ضد *K. pneumonia* تائید شده است. تاثیر اسانس بر *S. aureus* و *Staphylococous epidermidis* یکسان ولی کمتر از *K. pneumonia* گزارش شد (۱۴). اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاه *Th. trautvetteri*، روی ۷ باکتری نشان داد که اثر بازدارنده اسانس بر رشد باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بسیار خوب بوده است. حساس‌ترین باکتری *S aureus* با MIC برابر ۱۲۵ µg/ml بود (۲۲). در مطالعه‌ی دیگر ترکیب‌های شیمیایی در مراحل مختلف رویشی و اثرات ضد میکروبی اسانس *Th. caramanicus* بر ضد باکتری‌های مختلف مطالعه شد. بر اساس نتایج این مطالعه، کارواکرول، پارا-سیمن، گاما-ترپینن، تیمول و بورنئول ترکیب‌های غالب اسانس در این گونه بودند و اسانس این گونه اثرات ضد میکروبی را در مراحل مختلف رشد نشان داد. همچنین حساس‌ترین باکتری به اسانس این گونه *Bacillus subtilis* و مقاوم‌ترین باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بود (۲۰). علاوه بر گونه های آویشن سایر گونه های جنس نعنا شامل گونه های مختلف مرزه، اسطوخودوس و رزماری دارای فعالیت ضد باکتری و ضد قارچ هستند (۱ و ۲)

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3

هدف از این مطالعه تعیین اثرات ضدمیکروبی اسانس *Th. fedtschenkoi* دو اکسشن زنجان و سمنان، بر ضد باکتری‌های *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* و قارچ *Candida albicans*، تعیین مقادیر MIC و MBC و مقایسه اثر اسانس با آنتی‌بیوتیک‌های Ceftizoxime و Ciprofloxacin بود.

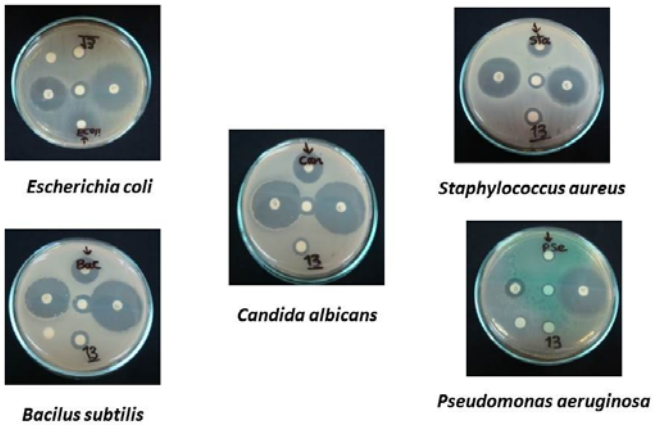
مواد و روشها

روش بررسی یافته ها

کشت گیاهان: بذر دو اکسشن از گونه *Th. fedtschenkoi* از رویشگاه‌های طبیعی آن در استان‌های سمنان و زنجان جمع‌آوری شد و در مزرعه گیاهان دارویی باغ گیاهشناسی ملی ایران کشت گردید. نمونه‌های هرباریومی توسط سرکار خانم دکتر جمزاد شناسایی و در هرباریوم بخش گیاهشناسی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور نگهداری شد.

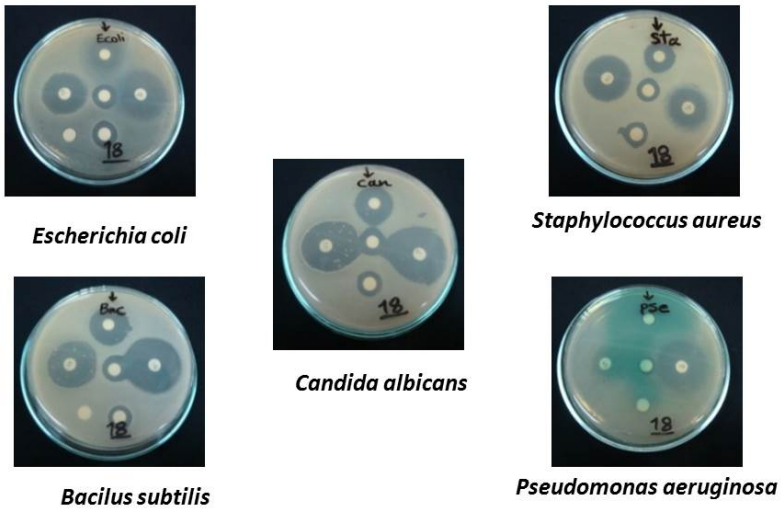
استخراج اسانس و شناسایی ترکیب‌ها: از سرشاخه های گلدار در مرحله گلدهی کامل، به روش تقطیرباآب اسانس گیری شد. درصد و نوع ترکیب‌های موجود در اسانس با استفاده از گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) شناسایی شدند (۱۸)

بررسی اثر ضد میکروبی به روش انتشار از دیسک (Disk diffusion method): باکتری‌های *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* و قارچ *Candida albicans* در محیط کشت تریپتوکیس‌سوی آگار (ساخت شرکت مرک) به مدت ۱۸ ساعت کشت شدند. غلظت معینی از باکتری‌ها معادل استاندارد شماره ۱ مک‌فارلند (۷) در محیط کشت تریپتوکیس سوی برات تهیه گردید. µl ۵۰۰ از سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت تریپتوکیس سوی آگار منتقل و با سواپ استریل به شکل یکنواخت بر روی سطح پخش شدند اسانس‌های هر کدام از نمونه‌ها، با استفاده از دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) که فاقد اثر ضدمیکروبی است به نسبت‌های یک‌پنجم، یک‌بیست‌وپنجم و یک‌پنجاهم رقیق شده و ۳۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده اسانس بر روی دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری قرارداده شد. دیسک‌های آغشته به مقادیر مشخص از اسانس بر روی محیط کشت قرار داده شد و سپس پلیت‌ها در دمای مناسب (۳۷) بمدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه-گذاری شدند. از دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۵ µg) و سفتی‌زوکسیم (۳۰µg) برای مقایسه اثر ضدمیکروبی اسانس‌ها استفاده شد هاله ممانعت از رشد بر حسب میلی‌متراندازه‌گیری شده و با مقادیر آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد (شکل‌های ۱ و۲) مقایسه گردید (۸).



شکل ۱ – هاله های ممانعت از رشد ایجاد شده توسط اسانس *Thymus fedchenkoi* از استان زنجان با روش انتشار از دیسک

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3



شکل ۲ – هاله های ممانعت از رشد ایجاد شده توسط اسانس *Thymus Fedchenkoi* از استان سمنان با روش انتشار از دیسک

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) (Minimum inhibitory concentration) و حداقل غلظت کشنده (MBC) (Minimum bactericidal concentration): از روش رقت لوله‌ای (Serial dilution method)، برای تعیین مقادیرMIC و MBC استفاده شد. به این منظور، رقت‌های متوالی از هر کدام از نمونه‌های اسانس، بین ۳/۷۵ تا ۶۰۰ µg/ml تهیه و به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۱۸ ساعته میکروارگانیسم‌ها با غلظت معادل استاندارد ۱ مک فارلند (3×10^{8} cfu/ml) اضافه شد. میکروپلیت‌ها در۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی از اسانس که فاقد رشد میکروبی است (فاقد کدورت) بعنوان MIC تعیین شد. برای تعیین MBC، ۵ میکرولیتر از هر کدام از چاهک‌های میکروپلیت برداشت شده و به محیط کشت فاقد اسانس منتقل و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و غلظتی که مانع از رشد میکروارگانیسم شدند بعنوان MBC تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: اطلاعات بدست آمده توسط نرم افزارهای SAS و MSTAT-C مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین نیز توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج

بازده و ترکیب‌های شیمیایی عمده اسانس: در اکسشن زنجان بازده اسانس *Th. fedtschenkoi* در سال اول ۰/۹۵درصد و در سال دوم ۰/۷۳ درصد بود. ترکیب‌های عمده شامل پاراسیمن (۶/۴ ٪ و ۱۲/۲۴ ٪)، لینالول (۱۴/۰۴ ٪ و۱۴/۷۴٪)، تیمول (۸/۳۳٪ و ۱۳/۶۳ ٪) و کارواکرول (۳۰/۶۷ ٪ و ۱۹/۱۸ ٪) به‌ترتیب در سال اول و دوم بود (جدول ۱).

در اکسشن سمنان بازده اسانس *Th. fedtschenkoi* در سال اول ۰/۸۳ درصد و در سال دوم ۰/۸۶ بود. در اکسشن سمنان ترکیب‌های غالب شامل پاراسیمن (۱۰/۸۸٪ و ۱۶/۵۱٪)، تیمول (۶۶/۴۱٪ و ۵۸/۱۶ ٪) و کارواکرول (۲/۷۵ ٪ و ۱/۹۷ ٪) به‌ترتیب در سال اول و دوم بود (جدول ۱).

اثرات ضدمیکروبی: تجزیه واریانس اثرات ضدمیکروبی اسانس *Th. fedtschenkoi* اکسشن استان زنجان نشان داد که نوع میکروارگانیسم، مواد ممانعت کننده رشد (آنتی-بیوتیک و رقت‌های مختلف اسانس) و اثر متقابل آنها بر

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3

قطر هاله عدم رشد در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول۲).

جدول ۱- درصد اسانس و ترکیب‌های شیمیایی عمده اکسشن‌های استان‌های زنجان و سمنان گونه *Thymus fedtschenkoi* کاشته شده در باغ گیاهشناسی ملی ایران

ردیف	ترکیب شیمیایی	ایندکس بازداری(RI)	استان زنجان		استان سمنان	
			سال اول	سال دوم	سال اول	سال دوم
۱	p-cymene	۱۰۲۸	۶/۴	۱۲/۲۴	۱۰/۸۸	۱۶/۵۱
۲	1,8-cineole	۱۰۳۵	۳/۹۵	۳/۶۸	۳/۱۳	۵/۰۹
۳	γ–terpinene	۱۰۶۵	۲/۷۳	۲/۱۲	۱/۹۸	۲/۵۹
۴	linalool	۱۱۰۰	۱۴/۰۴	۱۴/۷۴	۰/۰۵	۰/۰۵
۵	borneol	۱۱۶۷	t	t	t	t
۶	α –terpineol	۱۱۹۰	t	t	t	t
۷	geraniol	۱۲۵۷	t	t	t	t
۸	thymol	۱۲۹۳	۸/۳۳	۱۳/۶۳	۶۶/۴۱	۵۸/۱۶
۹	carvacrol	۱۳۰۰	۳۰/۶۷	۱۹/۱۸	۲/۷۵	۱/۹۷
۱۰	α -terpinyl	۱۳۵۳	t	t	t	t
۱۱	geranyl acetate	۱۳۸۶	t	t	t	t

جدول۲- نتایج آنالیز واریانس اثر نوع میکروارگانیسم و مواد ممانعت کننده رشد (آنتی‌بیوتیک‌ها و رقت‌های مختلف اسانس *Th. fedtschenkoi*) اکسشن استان زنجان بر قطر هاله عدم رشد

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات قطر هاله عدم رشد
میکروارگانیسم	۴	۲۰۶/۴۸۸**
مواد ممانعت کننده رشد	۵	۲۶۹۰/۷۳۳**
اثر متقابل میکروارگانیسم و مواد ممانعت کننده رشد	۲۰	۴۹/۶۶۲**
خطا	۹۰	۱/۵۵۰
کل	۱۱۹	۱۵۴۱۲/۳۶۷

مقایسه میانگین‌ها نشان داد، بیشترین قطر هاله عدم رشد اسانس اکسشن استان زنجان مر بوط به قارچ *C. albicans* به مقدار ۱۹/۲۹ میلی‌متر بود. قطر هاله عدم رشد اسانس با رقت‌های یک‌پنجم، یک‌بیست‌وپنجم و یک‌پنجاهم به ترتیب ۱۸/۷۵، ۱۲/۰۰ و ۱۰/۷۰ میلی‌متر با یکدیگر و با آنتی‌بیوتیک‌های سفتی‌زوکسیم (۲۵/۷۵ میلی‌متر) و سیپروفلوکساسین (۳۲/۵۰ میلی‌متر) اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول‌های ۳ و ۴).

نتایج آزمون MIC اکسشن زنجان نشان داد که *E. coli*، *B. subtilis* و *C. albicans* با MIC معادل ۲۳/۷۵µg/ml حساس‌ترین و *P. aeruginosa* با MIC بیش از ۳۸۰µg/ml مقاوم‌ترین باکتری بود. مقادیر MBC و MIC مشابه و برای *C. albicans* و *P. aeruginosa* به‌ترتیب ۲۳/۷۵µg/ml و بیش از ۳۸۰ µg/ml تعیین شد (جدول۵).

تجزیه واریانس بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس *Th. fedtschenkoi* اکسشن استان سمنان نشان داد که همانند اکسشن زنجان، نوع میکروارگانیسم، مواد ممانعت کننده رشد (آنتی‌بیوتیک‌ها و رقت‌های مختلف اسانس) و اثر متقابل آنها بر قطر هاله عدم رشد در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۶).

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اثر نوع میکروارگانیسم و مواد ممانعت کننده رشد (آنتی‌بیوتیک‌ها و رقت‌های مختلف اسانس *Th. fedchenkoi* اکسشن استان زنجان بر قطر هاله عدم رشد با استفاده از آزمون دانکن

تیمار	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
میکروارگانیسم	
E. coli	^{b} ۱۶/۵۸
S. aureus	^{b}۱۶/۶۷
P. aeruginosa	^{c}۱۱/۸۳
C. albicans	^{a}۲۹ ۱۹/
B. subtilis	۱۸/۷۱ ^{a}
مواد ممانعت کننده رشد	
رقت یک‌پنجم	^{c}۱۸/۷۵
رقت یک‌بیست‌وپنجم	^{d}۱۲/۰۰
رقت یک‌پنجاهم	^{e}۱۰/۷۰
Ceftizoxime	^{b}۲۵/۷۵
Ciprofloxacin	^{a}۳۲/۵۰

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل نوع میکروارگانیسم و مواد ممانعت‌کننده رشد (آنتی بیوتیک و رقت‌های مختلف اسانس *Th. fedchenkoi* اکسشن استان زنجان بر قطر هاله عدم رشد با استفاده از آزمون دانکن

میکروارگانیسم × مواد ممانعت‌کننده رشد	قطر هاله عدم رشد (میلی متر)
E. coli $\times \frac{1}{5}$	^{g}۱۷
E. coli $\times \frac{1}{25}$	^{hi}۱۲/۷۵
E. coli $\times \frac{1}{50}$	^{ij}۱۰/۷۵
E. coli × Ceftizoxime	^{de}۲۶/۷۵
E. coli × Ciprofloxacin	^{b}۳۲/۲۵
S. aureus $\times \frac{1}{5}$	^{f}۱۹/۵۰
S. aureus $\times \frac{1}{25}$	^{hij}۱۱/۵۰
S. aureus $\times \frac{1}{50}$	^{ij}۱۰/۷۵
S. aureus × Ceftizoxime	^{c}۲۹/۵۰
S. aureus × ciprofloxacin	^{cd}۲۸/۷۵
P. aeruginosa $\times \frac{1}{5}$	^{j}۹/۷۵
P. aeruginosa $\times \frac{1}{25}$	^{j}۹/۵۰
P. aeruginosa $\times \frac{1}{50}$	^{j}۹
P. aeruginosa × Ceftizoxime	^{hij}۱۱/۵۰
P. aeruginosa × Ciprofloxacin	^{bc}۳۱/۲۵
C. albicans $\times \frac{1}{5}$	^{e}۲۶/۲۵
C. albicans $\times \frac{1}{25}$	^{hi}۱۲/۵۰
C. albicans $\times \frac{1}{50}$	^{hij}۱۱/۵۰
C. albicans × Ceftizoxime	^{bc}۳۰/۷۵
C. albicans × Ciprofloxacin	^{a}۳۴/۷۵
B. subtilis $\times \frac{1}{5}$	^{f}۲۱/۲۵
B. subtilis $\times \frac{1}{25}$	^{h}۱۳/۷۵
B. subtilis $\times \frac{1}{50}$	^{hij}۱۱/۵۰
B. subtilis × Ceftizoxime	^{bc}۳۰/۲۵
B. subtilis × Ciprofloxacin	^{a}۳۵/۵۰

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3

جدول ۵- حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و کشنده (MBC) اسانس *Th. fedtschenkoi* اکسشن استان زنجان

نام آزمون	نام میکروارگانیسم				
	E. coli	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*C. albicans*	*B. subtilis*
MIC (µg/ml)	۲۳/۷۵	۴۷/۵	≥ ۳۸۰	۲۳/۷۵	۲۳/۷۵
MBC (µg/ml(	۲۳/۷۵	۴۷/۵	≥ ۳۸۰	۲۳/۷۵	۴۷/۵

جدول ۶- نتایج آنالیز واریانس اثر نوع میکروارگانیسم و مواد ممانعت کننده رشد (آنتی‌بیوتیک‌ها) و رقت‌های مختلف اسانس *Th. fedtschenkoi* اکسشن استان سمنان بر قطر هاله عدم رشد

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات قطر هاله عدم رشد
میکروارگانیسم	۴	۱۵۱۳/۰۸۳**
مواد ممانعت کننده رشد	۵	۳۵۳۱/۷۹۳**
اثر متقابل میکروارگانیسم و مواد ممانعت کننده رشد	۲۰	۲۷۴/۳۶۸**
خطا	۹۰	۶/۱۳۹
کل	۱۱۹	۸۲۰۵/۹۶۷

**: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد C.V.=6.04%

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد در اکسشن استان سمنان در *C. albicans* به مقدار ۳۲/۳ میلی‌متر بود. قطر هاله عدم رشد اسانس با رقت‌های یک‌پنجم، یک‌بیست‌وپنجم و یک‌پنجاهم به ترتیب ۳۷/۷، ۲۴/۶ و ۱۳/۸ میلی‌متر با یکدیگر و با آنتی‌بیوتیک‌های سفتی‌زوکسیم (۲۵/۱ میلی‌متر) و سیپروفلوکساسین (۳۰/۳ میلی‌متر) اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول‌های ۷ و ۸).

جدول ۷- مقایسه میانگین‌های اثر نوع میکروارگانیسم و مواد ممانعت کننده رشد (آنتی‌بیوتیک‌ها و رقت‌های مختلف اسانس *Th. fedchenkoi*) اکسشن استان سمنان بر قطر هاله عدم رشد با استفاده از آزمون دانکن

تیمار	قطر هاله عدم رشد(mm)
نوع میکروارگانیسم	
E. coli	^{c}۱۹/۲۱
S. aureus	^{c}۲۰/۷۱
P. aeruginosa	^{d}۱۱/۱۳
C. albicans	^{a}۳۲/۳۳
B. subtilis	^{b}۲۶/۲۱
L	
رقت یک‌پنجم اسانس	^{a}۳۷/۷۰
رقت یک‌بیست‌وپنجم اسانس	^{c}۲۴/۶۰
رقت یک‌پنجاهم اسانس	^{d}۱۳/۸۰
Ceftizoxime	^{c}۲۵/۱۰
Ciprofloxacin	^{b}۳۰/۳۰

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3

جدول ۸ – مقایسه میانگین‌های اثر متقابل نوع میکروارگانیسم و مواد ممانعت‌کننده رشد (آنتی‌بیوتیک‌ها و رقت‌های مختلف اسانس ***Th. fedchenkoi*** اکسشن استان سمنان بر قطر هاله عدم رشد با استفاده از آزمون دانکن

میکروارگانیسم × مواد ممانعت‌کننده رشد	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
E. coli × $\frac{1}{5}$	^{fghi}۲۸
E. coli × $\frac{1}{25}$	^{jk}۲۲/۲۵
E. coli × $\frac{1}{50}$	^{mno}۱۲/۷۵
E. coli × *Ceftizoxime*	^{hij}۲۵
E. coli × *Ciprofloxacin*	^{fghij}۲۷/۲۵
S. aureus × $\frac{1}{5}$	^{defg}۳۲
S. aureus × $\frac{1}{25}$	^{ij}۲۴
S. aureus × $\frac{1}{50}$	^{lmn}۱۴/۲۵
S. aureus × *Ceftizoxime*	^{efgh}۲۹/۲۵
S. aureus × *Ciprofloxacin*	^{hij}۲۴/۷۵
P. aeruginosa × $\frac{1}{5}$	^{no}۹/۷۵
P. aeruginosa × $\frac{1}{25}$	^{o}۹
P. aeruginosa × $\frac{1}{50}$	^{o}۹
P. aeruginosa × Ceftizoxime	^{no}۱۰
P. aeruginosa × Ciprofloxacin	^{fghi}۲۹
C. albicans × $\frac{1}{5}$	^{a}۶۷
C. albicans × $\frac{1}{25}$	^{cd}۳۶/۷۵
C. albicans × $\frac{1}{50}$	^{l}۱۷/۷۵
C. albicans × Ceftizoxime	^{cde}۳۴/۲۵
C. albicans × Ciprofloxacin	^{c}۳۸/۲۵
B. subtilis × $\frac{1}{5}$	^{b}۵۱/۷۵
B. subtilis × $\frac{1}{25}$	^{efg}۳۱
B. subtilis × $\frac{1}{50}$	^{lm}۱۵/۲۵
B. subtilis × Ceftizoxime	^{ghij}۲۷
B. subtilis × Ciprofloxacin	^{def}۳۲/۲۵

حروف مشابه در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی دار می باشد

نتایج آزمون MIC اکسشن استان سمنان نشان داد که *S. aureus* با MIC معادل ۱۷/۳۴ µg/ml حساس‌ترین و *C. albicans* و *E. coli* با MIC بیش از ۲۷۷/۵g/ml مقاوم ترین بودند. مقادیر MBC برای *S. aureus* معادل ۳۴/۶۹µg/ml و برای *C. albicans* و *E. coli* بیش از ۵۵۵µg/ml ارزیابی شد (جدول ۹).

جدول ۹– حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و کشنده (MBC) اسانس ***Th. fedtschenkoi*** اکسشن استان سمنان

نام آزمون	*E. coli*	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*C. albicans*	*B. subtilis*
MIC (µg/ml)	۲۷۷/۵	۱۷/۳۴	۶۹/۳۸	۲۷۷/۵	۱۳۸/۷۵
MBC (µg/ml)	۵۵۵/۰	۳۴/۶۹	۶۹/۳۸	۵۵۵/۰	۲۷۷/۵

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3

بحث و نتیجه گیری

با توجه به افزایش مصرف گیاهان دارویی در سرتاسر دنیا و نیز بالا رفتن مقاومت میکروارگانیسم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، یافتن داروهای جدید یک نیاز و از اولویت های مهم برای مقابله با عفونت‌های میکروبی است. با توجه به اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی از جمله آویشن، در این مطالعه ترکیبات تشکیل دهنده اسانس *Th. fedtschenkoi* اکسشن-های استان‌های سمنان و زنجان و اثرات ضدمیکروبی آنها مطالعه شد.

در اغلب مطالعات انجام شده تیمول و کارواکرول به عنوان ترکیبات عمده اسانس در *Th. fedtschenkoi* معرفی شده-اند که با نتایج این مطالعه در اکسشن سمنان مطابقت دارد (۳،۶، ۱۰). اگر چه در برخی دیگر از مطالعات ترکیب‌های دیگری همچون ترپینیل استات و لینالول به تنهایی و یا همراه با ترکیبات فنلی مانند تیمول و کارواکرول به‌عنوان ترکیب‌های عمده در اکسشن‌های دیگر این گونه شناسایی شده است (۱۷). در این مطالعه نیز لینالول به‌عنوان یکی از ترکیب‌های عمده در اکسشن زنجان شناسایی شده است. تفاوت‌های مشاهده شده در ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس می‌تواند ناشی از تنوع ژنتیکی درتفاوت اقلیم‌های اولیه رویشگاه‌های مبداء آنها باشدکه بر خواص و کاربرد آنها موثر می‌باشد (۱۵، ۲۶).

بر اساس روش انتشار از دیسک بالاترین هاله عدم رشد در اکسشن زنجان در باکتری‌های *C. albicans* و *B. subtilis* و در اکسشن سمنان در *C. albicans* مشاهده شد. حساسیت بالای *C. albicans* به اسانس گونه‌های دیگر آویشن نیز قبلاً گزارش شده است (۹). بر اساس مقادیر MIC و MBC، حساس‌ترین باکتری به اسانس اکسشن زنجان باکتری‌های *C. albicans* و *B. subtilis* و *E. coli* است در حالی که به اسانس اکسشن استان سمنان *S. areus* بیشترین حساسیت را نشان داده است. در مطالعات قبلی نیز باکتری *S. aureus* به عنوان حساس‌ترین باکتری به اسانس گونه آویشن دنائی و *Th. trautvetteri* گزارش شده است (۲۲). استافیلوکوکوس آرئوس به عنوان یک باکتری همزیست و نیز بیماریزا عمل می‌کند. در شرایط بیماریزایی *S. areus* می‌تواند انواع متفاوتی از عفونت‌های سطحی پوستی تا انواع سیستماتیک را ایجاد کند. درمان عفونت-های حاصله از این باکتری به دلیل مقاومت آن به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها با مشکلات جدی همراه است و حساسیت بالای آن به اسانس این گونه از آویشن با منشاء استان سمنان می‌تواند در درمان عفونت‌های آن امیدوار کننده باشد. تفاوت‌های مشاهده شده در حساسیت میکروارگانیسم‌های مورد بررسی می تواند ناشی از تفاوت در ترکیبات تشکیل دهنده و نیز درصد آنها باشد که باعث می‌شود میکروارگانیسم خاصی حساسیت بیشتر و یا کمتری داشته باشد که البته برای اثبات این امر نیاز به مطالعات بیشتر ، استخراج ترکیبات اصلی و بررسی اثر ضد میکروبی آن‌ها به صورت مجزا وجود دارد. به‌علاوه در حساسیت میکروارگانیسم‌ها بین دو روش انتشار از دیسک و رقت های متوالی تفاوت مشاهده می‌شود. این تفاوت‌ها می تواند ناشی از تفاوت در قدرت انتشار اسانس‌ها از دیسک و نیز نحوه رشد باکتری‌هادر محیط جامد باشد که بشکل بیوفیلم است. این شکل از رشد می‌تواند مانع دسترسی اسانس به آنها و عملکرد ضدمیکروبی آن شود در حالی که در محیط کشت‌های مایع سلول‌ها در محیط منتشر بوده و به شکل یکدست در معرض اسانس و یا آنتی‌بیوتیک قرار دارند (۱۳).

در مجموع می‌توان گفت که اسانس‌های بررسی شده دارای خواص ضد میکروبی متفاوت بر میکروارگانیسم‌های مختلف هستند که می‌تواند راهی برای تولید مواد ضد میکروبی جدید باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از مسئولان محترم مؤسسه و رییس بخش تحقیقات گیاهان دارویی به‌دلیل امکاناتی که جهت اجرای

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3

این طرح در اختیارشان قرار دادند، صمیمانه قدردانی و سپاسگزاری می نمایند. از همکاران آزمایشگاه شیمی گیاهی به‌ویژه آقای دکتر میرزا به دلیل تهیه طیف های GC/MS و سرکار خانم مهندس فکری به‌دلیل تهیه طیف‌های GC و از خانم دکتر جمزاد به‌دلیل شناسایی گونه و نمونه‌های گیاهی بی‌نهایت قدردانی می شود. در پایان لازم است از کلیه همکارانی که ما را در اجرای این تحقیق یاری کردند، تشکر و سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱- احسانی، ا.، سفید کن، ف.، حسینی،ف. ۱۳۹۶. بررسی اثر اسانس سه گونه مرزه (S. macrantha، S. rechingeri، S. spicigera) علیه باکتریهای عامل عفونت بیمارستانی و قارچ کاندیدا آلبیکنس، مجله پژوهشهای سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۰ (۲): ۱۰۷-۱۱۹.

۲- احمدی اسب‌چین، س.، مصطفی پور، م. ج. ۱۳۹۷. اثرات متقابل ضد باکتریایی اسانس رزماری و اسانس اسطوخودوس روی دو باکتری گرم مثبت و سه باکتری گرم منفی در محیط آزمایشگاهی. مجله پژوهشهای سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۱ (۲): ۱۲۱-۱۳۶.

3-Abousaber, M., Hadjakhoondi, A., Shafiee, A. 2002. Composition of the essential oil of *Thymus pubescens* Boiss. Et Kotschy ex Celak and *Thymus fedtschenkoi* Ronniger from Iran. Journal of Essential oil Research. 14(3): 154-155.

4-Aminkhani, A., Sharifi, R., Ranjbar, E., Chalabian, F., Katouzian, F. 2019. Antimicrobial activities and chemical constituents of essential oil extracted from stem, leaf, and flower of *Thymus fedtschenkoi* from Khoy, Iran. J Food Process preserv. 43(10): e14149. http: //doi.org/10jfpp.14149.

5-Askari, F., Teimouri, M. 2019. Antimicrobial activity of essential oil of *Thymus fedtschenkoi* R. collected from Semnan province. 8th congress on medicinal plants, Iran. 24-25 April: 271.

6-Baser, KHC., Demirci, B., Kirimer, N., Satil, F., Tumen, G. 2002. The essential oil of *Thymus migricus* and *T. fedtschenkoi* var. Handellii from Turkey. Flavour and Fragrance Journal. 17(1): 41-45.

7-Bauer, AW., Kirby, WM., Sherris, JC., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 45: 49 (European)

8-Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement, vol. 28, no. 1. CLSI, Wayne, PA.

9-Ghasemi Pirbalouti, A., Emami Bistghani, Z., Malekpoor, F. 2015. An overview on genus *Thymus*. Journal of Herbal Drugs. 6(2): 93-100.

10-Ghelichnia, H., 2018. Essential oil composition of *Thymus fedtschenkoi* Ronniger at different growing altitudes in Mazandaran, Iran. Cercetari Agronomica in Moldova. 2 (174): 75-83.

11-Jamzad, Z. 2009. *Thymus* and *Satureja* Species of Iran. Research Institute of forest and rangelands. Tehran, Iran. 171p

12-Kazemi, A., Elmib, F., Moradic, A. 2019. Chemical composition and biological activities of essential oils and methanolic extracts obtained from wild and cultivated types of *Thymus fedtschenkoi* from East Azarbayjan, Iran. Advanced Herbal Medicine. 5(1):1-13.

13-Khalili, H., Soltani, R., Negahban, S., Abdollahi, A., Gholami, K. 2012. Reliability of disk diffusion test results for the antimicrobial susceptibility testing of nosocomial gram-positive microorganisms: is e-test method better? Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 11(2): 559–563.

14-Khayami, M., Noujavan Asghari, M., Rasouli, B. 2002. Antibacterial effects of essential oils of *Stachys* and *Thymus* of sumach and wild maunt atlas pistacia in vitro. Pajouhesh-Va-Sazandegi. 15(1): 36-39.

15-Matrotti, M., Dellacecca, V., Piccaglia, R., Glovanelli, E. 1993. Agronomic and chemical evaluation of three varieties of *Foeniculum vulgar* Mill. Acta horticulture. 331:63-69.

16-Mericli, F. 2004. Volatile oils of *Thymus kotschyanus* var. glabrescens and *Thymus fedtschenkoi* var. handelii. Journal of Natural products. 49(5): 942.

17-Mirza, M., Ahmadi, L. 2000. Efficacy of DB-5 and DB-1 columns in Identifying *Thymus fedschenkoi* ronniger essential oil compounds. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic plants. 6(1): 128-139.

18-Mirza, M. 2012. Extraction, qualitative and quantitative analyses of the essential oil of

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3

different *Thymus* species (National Botanic Garden of Iran). Research Institute of Forest and Rangelands. Tehran, Iran.

19- Mozaffarian, V. 2006. A dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser publisher. Tehran, Iran. 596p.

20-Nejad Ebrahimi, S., Hadian, J., Mirjalili, MH., Sonboli, A., Yousefzadi, M. 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. Food Chemistry. 110 (4): 927-931

21-Rustaiee, AR., Mirahmadi, SF., Sefidkon, F., Tabatabaei, MF., Omidbaigi, R. 2011. Essential oil content and composition of *Thymus fedtschenkoi* Ronniger at different phonological stages. Journal of essential oil bearing plant. 14(5): 625-629.

22-Shahnazi, S., Khalighi sigaroudi, F., Ajani, Y., Yazdani, D., Ahvazi, M., Taghizad Farid, R. 2007. Study on chemical composition and antibacterial activity of thyme essential oil of *Thymus trautvetteri* Klokov & Dest.-Shost. Journal of Medicinal Plants. 6(23): 80-88.

23-Teimouri, M. 2012. Antimicrobial activity and essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak from Iran. Journal of Medicinal Plants Research. (4): 631-635.

24-Teimouri, M., Askari, F. 2019. Comparison of Antimicrobial activities of Essential oil of *Thymus vulgaris* from two Iranian localities (Gazvin and central provinces), 8th congress on medicinal plants. Iran, 24-25 April: 114.

25-Tohidi, B., Rahimmalek, M., Trindade, H. 2019. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. Industrial Crops and Products. 134: 89-99.

26-Zarezadeh, A., Mirza, M., Sharifi Ashurabady, E., Mirhosseini, A., Arabzadeh, M.R. 2013. Survey on quality and quantity of essential oil different accessions of *Thymus pubescens* in province Yazd. Eco-phytochemical Journal of Medical Plants. 1(3): 35-43.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.15.3

Study of Antibacterial effect and chemical compounds in populations of *Thymus fedtschenkoi* Ronniger from Semnan and Zanjan

Askari F.[1], Sharifi Ashoorabadi E.[1], Teimouri M.[1], Bahmanzadegan A.[2]

[1] **Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, I.R. of Iran**

Abstract

In this study, antimicrobial effects of two accession of *Thymus fedtschenkoi* originated from Semnan and Zanjan against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Bacillus subtilis* were investigated. The essential oil was extracted by Clevenger apparatus and compounds identified by GC and GC-MS instruments. Disc diffusion and microdilution methods were used to determine antimicrobial activity. The experiment was done on factorial design based on complete randomized design. The effect of microorganism type (as first factor) and essential oil concentration and antibiotics (as second factor) and their interaction was evaluated. According to the results, essential oil yield was %0.73 and %0.95 in Zanjan and %0.83 and %0.86 in Semnan accession in two successive years. The main chemical compounds of Zanjan accession was p-cymene, linalool, thymol and carvacrol and Semnan accession was p-cymene, thymol and carvacrol. Statistical analysis showed that the effect of microorganism type, essential oil concentration and their interaction on inhibition zone was significant at 1% level. In Semnan accession, the highest diameter of inhibition zone was observed in *C. albicans* and in dilution of one fifth of essential oil. *C. albicans* and B. subtilis had the most sensivity to Zanjan accession and *C. albicans* to Semnan accession. The observed difference in antimicrobial effects can be related to difference in chemical composition and their activity.

Key words: *Thymus*, Essential oil, Zanjan, Semnan, Antimicrobial