

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

۱. عبدالناصر محمدی \* ۲. زهر اصفائی

۱. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران\*

۲. متخصص پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۵

### چکیده

با توجه به افزایش مقاومت دارویی میکروارگانیسم ها و تمایل به استفاده از گیاهان دارویی، در مطالعه حاضر ترکیبات شیمیایی و اثرات ضد قارچی اسانس آویشن کوهی (*Thymus Kotschyanus*) علیه قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس، 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 طیف نگار 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.

واژگان کلیدی: آویشن، اسانس، روش میکروداپلوشن، فعالیت‌های ضد قارچی.

(Rustaiyan et al, 1999) را گزارش کردند (۱۳/۲ درصد). رسولی و همکاران ترکیبات غالب اسانس *Thymus kotschyanus* را کارواکرول (۳۵/۰۶ درصد)، تیمول (۲۶/۶ درصد) و گاماترینین (۷/۸۱ درصد) درصد بیان نمودند (Rasooli and Mirmotafa, 2003). اسانس این گیاه در تجارت جهانی جایگاه خاصی دارد (Naghdi. Badi and Makkizade Tafti, 2003). اندام هوایی آویشن کوهی برای درمان اختلالات گوارشی استفاده می‌شود. اسانس این گیاه فعالیت‌های بیولوژیک متفاوتی نظیر خواص ضدباکتریایی، قارچی، حشره، درد و آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهد. همچنین بعضی از این روغن‌ها دارای خواص ضد سرطانی هستند (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 مسؤول افزایش چشمگیری در میزان بروز بیماری بوده‌اند. در بررسی‌های انجام شده در سال‌های ۱۹۷۹ تا ۲۰۰۰ در آمریکا بروز عفونت‌های قارچی ۲۰۷ درصد افزایش داشته‌است. جنس کاندیدا (*Candida spp*) گونه‌های زیادی را شامل می‌شود که ساکن طبیعی دستگاه گوارش، مخاط دهان و واژن است و انسان هنگام تولد در عبور از واژن آن را کسب می‌کند. اصلی‌ترین و شایع‌ترین عامل بیماری‌زای انسانی کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) است که به عنوان چهارمین عامل عفونت‌های خونی بیماران بستری در بیمارستان‌ها مطرح شده است (Al-Martin et al., 2003; Fattani et al., 2006; Patterson et al., 2007). وجود محدودیت‌هایی مانند تعداد کم داروهای ضد قارچی، سمی بودن آنها برای سلول‌های بدن و افزایش مقاومت گونه‌های مختلف کاندیدا به داروهای ضدقارچی از جمله فلوکونازول، امروزه توجه محققین را به یافتن ترکیبات جدید با خواص مهارکنندگی رشد میکروارگانیسم‌ها با منشأ طبیعی معطوف

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 ۴۰۰-۳۰۰ 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 رزمارونیک، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین را تأیید می‌نمایند (Blumenthal 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 جدا شده این گیاه شامل کارواکرول (۴/۱۴ درصد)، تیمول (۵/۱۹ درصد) و گاماترینین (۳/۱۰ 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 (۲/۱۴ درصد) و ۱ و ۸ - سینثول

و یکسان به دستگاه تزریق شد تا نوع ترکیبهای تشکیل دهنده آنها مشخص شود. دستگاه GC از مدل Agilent 6890 و دستگاه MS از مدل Agilent 5973 با ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده مدل ۵۹۷۳ Agilent با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون-ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتیگراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازدارنده آنها و مقایسه آن 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.

#### بررسی فعالیت های ضدقارچی

قارچ‌های *Candida albicans* سوش استاندارد PTCC:5027، *Candida glabrata* سوش استاندارد PTCC: 5297 و *Candida kruzei* سوش استاندارد PTCC: 5295 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. جهت تهیه کشت تازه و فعال از میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بر روی محیط کشت سابوردکستروزآگار\* کشت و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. از کلنی‌های مذکور در سرم فیزیولوژی سوسپانسیون قارچی تهیه شد. سپس با استفاده از لام نئوبار غلظتی از سلول‌های قارچی معادل  $10^3 \times 1/5$  اسپور در میلی‌لیتر بدست آمد.

تعیین حداقل بازدارندگی<sup>۱</sup> (MIC) به روش میکرودايلوشن براث

مقدار ۲۵۶ میکرو لیتر از اسانس گیاه *Thymus kotschyanus* در مراحل مختلف رویش در یک میلی‌لیتر حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید، مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا استوک دارویی

کرده است (Calderone et al, 2002; Li et al., 2005). بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی خواص ضدقارچی اسانس *Thymus kotschyanus* در سه مرحله نموی بر علیه برخی از گونه‌های کاندیدا و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس این گیاه در مرحله گلدهی با استفاده از دستگاه GC/MS می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### ارگانیسم‌ها

به منظور تعیین حساسیت عوامل قارچی نسبت به اسانس گیاه *Thymus kotschyanus* از مخمرهای بیماریزای *Candida albicans*، *Candida glabrata* و *Candida kruzei* استفاده گردید.

##### نحوه جمع آوری گیاهان

گیاه *Thymus kotschyanus* 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 جمع‌آوری و مورد شناسایی قرار گرفت. بعد از شناسایی، نمونه‌ها خشک شده و اسانس‌گیری با دستگاه کلونجر و آنالیز مواد مؤثره با گاز کروماتوگرافی انجام شد.

##### اسانس‌گیری

تهیه اسانس به روش تقطیر با آب و بخار انجام گرفت. مقدار ۱۰۰ گرم از تمام بخش‌های 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 اسانس‌گیری (کلونجر مدل دارونامه بریتانیا) ریخته و به آن ۷۰۰ میلی‌لیتر 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 اسانسها

جهت آنالیز و شناسایی ترکیبات اسانس از دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. اسانس در شرایط مشابه

2. Brain-heart infusion (BHI)

3. Minimum inhibitory concentration

آنها کارواکرو (۵۲/۴ درصد)، تیمول (۱۰/۴) و گاماترینین (۱۲/۱۰) می باشد که در مجموع ۷۴/۹ درصد کل ترکیبات را تشکیل دادند.

### نتایج حاصل از اثرات ضد قارچی اسانس *Thymus kotschyanus* بر روی گونه های کانیدیا

اثرات ضد قارچی اسانس بدست آمده از گونه *Thymus kotschyanus* با روش دیسک دیفیوژن نشان داد که اثرات ضد قارچی اسانس این گیاه بر روی گونه های کانیدیا آلبیکنس، گلابراتا و کروزه ای به ترتیب تا غلظت های ۱۶، ۳۲ و ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر اثرات مهاری بیشتر از قطر پلیت از خود نشان دادند. بررسی اثرات غلظت های مختلف گیاه در محدوده ۲۵۶ تا ۰/۳ میکروگرم در میلی لیتر با استفاده از روش میکروداپلوشن بر رشد سه گونه کانیدیا نشان داد که اسانس این گیاه قادر به مهار رشد تا غلظت ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر می باشد. بنابراین MIC اسانس این گیاه به ترتیب برای گونه های کانیدیا آلبیکنس، گلابراتا و کروزه ای ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و MFC ۱، ۰/۵، ۱ میکروگرم در میلی لیتر تعیین گردید (جدول ۱).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان می دهد که بین میانگین MIC و MFC اسانس *Thymus kotschyanus* در غلظت های مختلف بر روی گونه های کانیدیا (بجز کانیدیا کروزه ای) در مقایسه با شاهد فلوکونازول در سطح احتمال ۰/۰۱ تفاوت معنی داری وجود ندارد. جهت مقایسه میانگین ها 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 کانیدیا با هم مقایسه گردید. بیشترین میزان MIC و MFC مربوط به کانیدیا کروزه ای بوده از طرفی اثرات ضد قارچی اسانس این گیاه در زمان گلدهی بیشترین اثر را بر روی کانیدیا کروزه ای داشته است (شکل شماره ۱).

استریل تهیه شد. در میکروپلیت های ۹۶ خانه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط سابورودکستروز برات به تمام حفره ها و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر 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، ۰/۰۶ و ۰/۰۳ میکرولیتر در میلی لیتر) از اسانس در محیط کشت تهیه گردید. در نهایت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر 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 کاملا 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 سابورودکستروز 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 گردید. غلظتی از اسانس که مانع رشد ۹۹/۹٪ از سلول های قارچی شد به عنوان حداقل غلظت کشندگی باکتری در نظر گرفته شد.

### نتایج

#### نتایج حاصل از آنالیز اسانس *Thymus kotschanus* در مرحله گلدهی

در اسانس حاصل از بخش های مختلف گیاه *Thymus kotschanus* ۴۵ ترکیب ترکیب شناسایی شد که عمده ترین

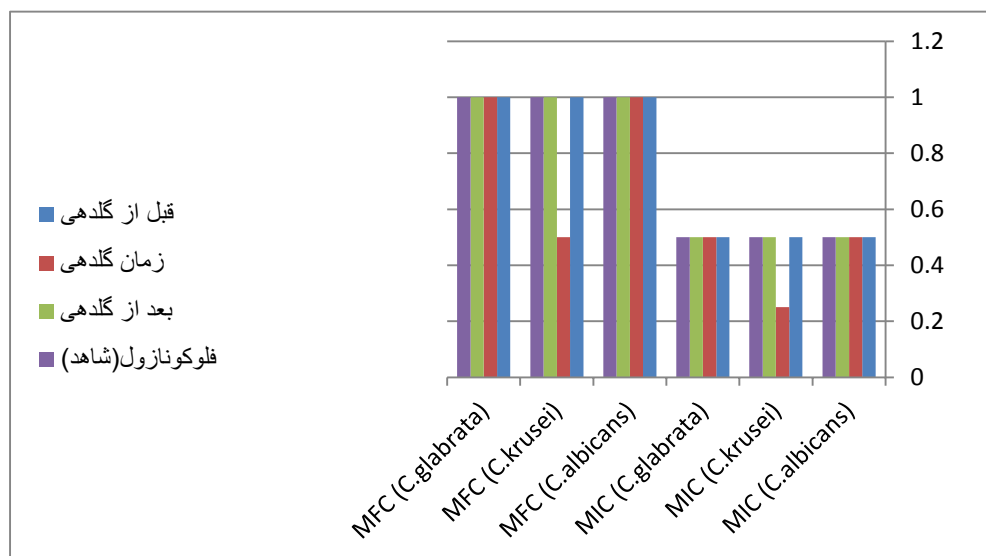
4. Minimum bactericidal concentration

جدول ۱- مواد شناسایی اساسی گونه *Thymus kotschanus* در مرحله گلدهی

ردیف	نام ترکیب	RI	درصد
1	Tricyclene	909	0.01
2	Alpha-Thujene	916	0.92
3	Alpha-Pinene	926	0.45
4	Comphene	961	0.23
5	Sabinene	970	0.11
6	Beta-Pinene	967	0.14
7	3-Octanone	980	0.63
8	1-Octen-3-ol	977	0.07
9	Beta-Myrcene	992	1.19
10	3-Octanol	988	0.05
11	Phellandrene	1000	0.17
12	Alpha-Terpinene	1023	1.22
13	Cymol		3.26
14	1.8-Cineole	1009	0.60
15	Limonene	1025	0.18
16	Beta-Ocimene Y	1039	0.06
17	Gamma-Terpinene	1026	10.86
18	Cis-Sabinene hydrate	1069	0.31
19	3-Nonanone	903	0.04
20	Alpha-Terpinolene	1089	0.07
21	Cis-beta-Terpineol	1144	0.10
22	Linalool	1098	0.26
23	Trans-Sabinene hydrate	1064	0.01
24	Borneol	1166	0.75
25	4-Terpineol	1187	0.48
26	Carvacrol methyl ether	1242	0.03
27	Thymol	1267	16.43
28	Carvacrol	1299	52.34
29	Thymyl acetate	1351	0.05
30	eugenol	1351	0.02
31	Carvacryl acetate	1358	0.11
32	Alpha-Ylagene	1368	0.01
33	Beta-Bourbonene	1382	0.03
34	Trans-Caryophyllene	1414	1.83
35	Alpha-Caryophyllene	1414	0.07
36	Germacrene D	1479	0.42
37	Bicyclogermacrene	1492	0.26
38	Beta-Bisabolene	1511	0.64
39	Delta-Cadinene	1526	0.05
40	Cis-alpha-Bisabolene	1517	0.73
41	Neryl acetate	1360	0.01
42	Spathulene	1589	0.19
43	Caryophyllene Oxide	596	0.20
44	Farnesol	1785	0.04

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	64 - 0.03	0.5 ± 0.05 <sup>A</sup>	1 ± 0.01
	زمان گلدهی	64 - 0.03	0.5 ± 0.05 <sup>A</sup>	1 ± 0.01
	بعد از گلدهی	64 - 0.03	0.5 ± 0.05 <sup>A</sup>	1 ± 0.01
	فلوکونازول (شاهد)	64 - 0.03	0.5 ± 0.05 <sup>A</sup>	1 ± 0.01
<i>Candida krusei</i>	قبل از گلدهی	64 - 0.03	0.5 ± 0.05 <sup>B</sup>	1 ± 0.01
	زمان گلدهی	64 - 0.03	0.25 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.5 ± 0.05
	بعد از گلدهی	64 - 0.03	0.5 ± 0.05 <sup>B</sup>	1 ± 0.01
	فلوکونازول (شاهد)	64 - 0.03	0.5 ± 0.05 <sup>B</sup>	1 ± 0.01
<i>Candida glabrata</i>	قبل از گلدهی	64 - 0.03	0.5 ± 0.05 <sup>A</sup>	1 ± 0.01
	زمان گلدهی	64 - 0.03	0.5 ± 0.05 <sup>A</sup>	1 ± 0.01
	بعد از گلدهی	64 - 0.03	0.5 ± 0.05 <sup>A</sup>	1 ± 0.01
	فلوکونازول (شاهد)	64 - 0.03	0.5 ± 0.05 <sup>A</sup>	1 ± 0.01



شکل ۱- مقایسه میانگین MIC و MFC اسانس *Thymus kotschyanus* در مراحل مختلف بر روی گونه‌های کاندیدا

## بحث

سیر روز افزون ابتلا به بیماری‌های کاندیدایی 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 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. kotschyanus* 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;). مطالعات ترکیباتی مانند کارواکرو، تیمول، گاماترپین و ۱، ۸- سینئول عمده ترین اجزاء اسانس آویشن کوهی بوده که در مطالعه حاضر نیز عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده این گیاه را کارواکرو (۵۲/۴ درصد)، تیمول (۱۰/۴) و گاماترپین (۱۲/۱۰) را تشکیل داد (جدول ۱). دو ترکیب کارواکرو 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 کارواکرو کاهش و تیمول افزایش میابد که نمونه مطالعه حاضر از مناطق با ارتفاع کم جمع‌آوری شد که میزان کارواکرو 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

کارواکرو و تیمول در بین جمعیت‌های مورد بررسی به علت تفاوت در فاکتورهای اکولوژی و جغرافیایی است (Mazooji et al., 2013). 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 میکروآیلوشن 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 دارد (جدول ۲). این پتانسیل ناشی از ترکیبات مانند تیمول و کارواکرو بوده که از خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی خوبی برخوردار می‌باشند. کارواکرو 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 - ترپین که با مقدار کمتر در اسانس آویشن کوهی وجود دارد به علت تعامل با کارواکرو 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 et al., 2004; Rasooli and Mirmotafa, 2003; Zarei et al., 2006; Nariman et al., 2004; Letessier et al., 2001; Negahban et al., 2007;). در مطالعه Obaidat و همکاران اثر کارواکرو و تراسیکلین بر روی کاندیدا آلبیکنس و پنج سوش باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که دیسکهای حاوی ۴۰ میکروگرم کارواکرو تاثیر بسیار

گونه‌های کاندیدای مورد مطالعه از نظر آماری متفاوت بود بطوریکه اثر اسانس این گیاه بر کاندیدای آلبیکنس و کاندیدای گلابراتا معنی دار نشد ولی با کاندیدای کروزه‌ای معنی دار گردید ( $P < 0.0001$ )، هرچند در این مطالعه با افزایش غلظت اسانس، میزان رشد گونه‌های کاندیدای 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 kotchyanus* 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.

خوبی بر روی کاندیدای آلبیکنس دارند (Obaidat et al., 2011) در مطالعه Vardar-Unlu و همکاران که اثر کارواکرول را بر روی کاندیدای 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 اسپرژیلوس فلاووس، فوزاریوم اگریسپوروم و آلترناریا آلترناتا مورد بررسی قرار گرفت و MIC آنها به ترتیب ۰/۵، ۱ و ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر گزارش گردید (Mohammadi 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 (Farzaneh et al., 2006; Negahban et al., 2007). 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 گردید (Amini et al., 2012). در مطالعه محمدپور و همکاران MIC آویشن شیرازی، آویشن کوهی مازندران و آویشن دناپی بر روی کاندیدای 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 al., 2011). براساس نتایج حاصل از بررسی‌های ضد قارچی در این مطالعه، تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس *Th. Kotschyanus* بر میزان رشد

#### References

- Alia, P.S. and Mohanty, P. (1997). Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical- Al-Fattani, M.A, 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., 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. *J Antimicrobial Chemotherapy.* 42:591-595.
- Helander., I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J.(1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 46: 3590–3595.
- Jamzad, Z.( 2009). *Thymus* and *Satureja* of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands press. pp: 171.
- Letessier, M.P., Walters, D.R. (2001). Antifungal activity of the Essential oil of Hyssop. *J of Phytopathol.* 149 (11 - 12): 673 - 8.
- Li, H., Qing, C., Zhang, Y., Zhao, Z.( 2005). Screening for endophytic fungi with anti-tumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World J Microbial Biotechnol.* 21: 1515–21.
- Maksimovic, Z., Stojanovic, D., Sostaric, I., Dajic, Z., Ristic M. (2008). Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil. *J Sci Food Agr.* 88: 2036-2041.
- Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., Moss, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 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 Res.* 3 (3): 1443 - 51.
- Mohammadi, A., Nazari, H., Imani, S., Amrollahi, H. (2014). Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants. *J Mycol Med.;* 24(2).
- Mohammadpour, G., Majd, A., Najhadsatari, T., Mehrabian, S., and Hossinzadehkalagar, A. (2011). Antibacterial and antifungal effects of 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). Rewive of *Thymus vulgaris* L. *J. Medicinal Plants.* 7: 1 - 12.
- Nariman, F., Eftekhari, F., Habibi, Z., Falsafi, T. (2004). Anti-*Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. *Helicobacter.* 9 (2): 146 - 51.
- Negahban, M., Moharrampour, S., Sefidkon, F. (2007). Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *J Stored Product R.* 43: 123 - 8.
- Nickavar, B., Mojab, F., and Dolat-abadi, R. (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chem.* 90: 609-611.
- Obaidat, R.M., Bader, A., Al-Rajab, W., Abu Sheikha, G., Obaida, 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., Dikshit, A. (1996). Antifungal evaluation of the essential oils of *Cymbopogon pendulus* (Nees ex Steud.) Wats. Cv. *Praman. Flavor and Fragrance J.* 11: 257-260.
- Patterson, T. (2007). Treatment and prevention of fungal infections. Focus on candidemia. New York: Applied Clinical Education. 23: p: 7-80.
- Puertas-Mejia, M., Hillebrand, S., Stashenko, E., 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 Medicinal and Aromatic Plants Res.* 12: 29 -51.
- Shahidi Bonjar, G.H. (2004). Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine, *Fitoterapia.* 75: 231 - 5.
- Stahl-Biskup, E., 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., 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., Yağmuroğlu, A., 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., Fouladi, Z. (2006). In-vitro anticandida activity of *Zataria multiflora* Boiss. eCAM 2006; 1 - 3.
- Zargari, A. (1989). Medicinal plants (In Persian 4th ed. Tehran University Press, Iran). 4: 28 - 38.

## Study of antifungal properties and chemical composition of essential oil of *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen

1Abdelnasser Mohammadi\* 2 Zahra Sanaei

Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad

MD , Community Medicine , School of Medicine , Hamadan University of Medical Sciences , Hamadan , 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%), Gamatrypyren (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 1 µg/ 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

**Key words:** *Thymus kotschyanus*, essential oil, microdilution broth method, antifungal activity

\* Corresponding Author, E-mail: Mohammadi.ab@ lu.ac.ir