DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2014.10713

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شماره ۵، صفحه ۷۷۰-۷۵۶ (۱۳۹۳)

بررسی ترکیب‌های شیمیایی و اثرات ضدمیکروبی اسانس اکوتیپ‌های آویشن (*Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak) از مناطق مختلف

فاطمه عسکری[۱*]، ابراهیم شریفی عاشورآبادی[۲]، مهدی میرزا[۲]، مریم تیموری[۳] و المیرا احسانی[۴]

۱*- نویسنده مسئول، مربی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، پست الکترونیک: fasgari@rifr-ac.ir

۲- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

۳- مربی پژوهشی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

۴- کارشناس، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۱ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۱

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر محل جمع‌آوری گیاه آویشن (*Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak) و غلظت اسانس حاصل از آن بر اثرات ضدمیکروبی بر علیه تعدادی از میکروارگانیسم‌ها، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. در این آزمایش، محل جمع‌آوری گیاه در ۶ سطح، رقت اسانس در ۳ سطح و مقایسه آنها با آنتی‌بیوتیک‌های سفتی‌زوکسیم و سیپروفلوکسازین و میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نیز در ۵ سطح شامل *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeroginosa* و *Candida albicans* بود. ابتدا بذرهای این گونه از رویشگاه‌های مختلف جمع‌آوری و در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور کشت گردید. سرشاخه‌های گلدار نمونه‌ها با روش تقطیر با آب مقطر اسانس‌گیری شدند. به‌منظور شناسایی ترکیب‌های اسانس از دستگاه‌های GC و GC/MS استفاده شد. بازده اسانس نمونه‌های مختلف بین ۰/۳۹٪ تا ۰/۸۳٪ (وزنی-وزنی) بود. بیشترین ترکیب‌های شیمیایی اسانس آذربایجان‌غربی شامل ترانس-کاریوفیلن (۲۶٪) و کامفور (۲۴/۲٪)، اسانس تهران شامل ژرانیال (۳۰/۹٪) و ژرانیل‌استات (۲۳/۹٪)، اسانس زنجان شامل لینالول (۲۳/۵٪) و ۸،۱-سینئول (۲۲/۲٪)، اسانس قزوین شامل تیمول (۳۰/۳٪) و کارواکرول (۳۰/۲٪)، اسانس کردستان شامل لینالول (۱۷/۲٪) و ژرانیل‌استات (۱۲/۷٪) و اسانس گیلان شامل آلفا-ترپینئول (۳۱/۳٪) و ژرانیول (۱۱/۲٪) بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس قطر هاله عدم رشد نشان داد که اثر محل جمع‌آوری، نوع میکروارگانیسم، رقت اسانس و اثر متقابل آنها در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر متقابل محل جمع‌آوری، نوع میکروارگانیسم و رقت اسانس نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد، معادل ۳۵/۵ میلی‌متر مربوط به اسانس با منشأ بذر آذربایجان‌غربی، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین بر روی باکتری باسیلوس‌سوبتیلیس و کمترین قطر هاله عدم رشد نیز معادل ۸ میلی‌متر مربوط به اسانس آذربایجان‌غربی با رقت یک پنجاهم بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا بود. نتایج حاصل از بررسی MIC و MBC نشان داد که اسانس با منشأ بذر تهران و با منشأ بذر کردستان به‌ترتیب بیشترین و کمترین اثر ضدمیکروبی را داشت.

واژه‌های کلیدی: آویشن (*Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak)، اثرات ضدمیکروبی، اسانس، تیمول، کارواکرول.

مقدمه

جنس آویشن (*Thymus*) در نقاط مختلف ایران ۱۸ گونه دارد. یکی از گونه‌هایی که پراکندگی وسیعی در شمال و غرب کشور دارد گیاه بوته‌ای و کوتاه *Thymus pubescens* است. این گونه در استان‌های گیلان، مازندران، آذربایجان، کردستان، کرمانشاه، لرستان، سمنان، خراسان و

تهران پراکنش دارد. این گونه در کشور ترکیه نیز یافت می‌شود (جم‌زاد، ۱۳۸۸؛ Mozaffarian, 1996). زمان گلدهی این گونه بهار و تابستان است. هدف از این تحقیق بررسی ترکیب‌های شیمیایی و اثرات ضدمیکروبی اسانس سرشاخه‌های گلدار *T. Pubescens* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف واقع در رویشگاه‌های آذربایجان‌غربی، تهران، زنجان، قزوین، کردستان و گیلان و کاربرد احتمالی آن در صنایع داروسازی و آرایشی-بهداشتی است.

در اسانس *T. pubescens*، ترکیب‌های تیمول (۳۷/۹٪)، کارواکرول (۱۴/۱٪)، پاراسیمن (۱۳/۱٪) و گاما-ترپینن (۸/۰۷٪) گزارش شده‌است (Rustaiyan *et al.*, 2000). ۳۷ ترکیب در اسانس اندام‌های هوایی *T. pubescens* شناسایی شد. بیشترین ترکیب‌ها در مراحل قبل از گلدهی و گلدهی کامل به‌ترتیب کارواکرول (۶۴/۸٪ و ۴۸/۸٪)، تیمول (۱۱/۹٪ و ۱۳/۹٪)، گاما-ترپینن (۶/۱٪ و ناچیز) و پارا-سیمن (۲/۹٪ و ۱۲/۷٪) بودند (Sefidkon *et al.*, 2002).

عسکری و همکاران (۱۳۸۱) بازده اسانس *T. pubescens* از سه نقطه رویشی دره لار گلدهی کامل را به‌ترتیب ۱/۲۳٪ و ۲/۰۳٪ گزارش کردند. به‌علاوه اینکه نتایج آنها نشان داد که کارواکرول (۵۴/۷٪ و ۶۹/۲٪)، پارا-سیمن (۶/۷٪ و ۹/۷٪) و بورنئول (۱/۷٪ و ۵/۱٪) ترکیب‌های عمده اسانس بودند.

نمونه‌های گیاهی *T. pubescens* از سه نقطه رویشی در دره لار (شرق استان تهران) و در دو مرحله قبل از گلدهی (اواسط اردیبهشت) و گلدهی (اواسط تیر ماه) جمع‌آوری شدند. مقدار بازده اسانس اندام‌های هوایی در مرحله رویشی از ۰/۵۳٪ تا ۰/۹۳٪ و در مرحله گلدهی از ۱/۲۳٪ تا ۲/۰۳٪ متغیر بود. در مرحله قبل از گلدهی تفاوت قابل‌توجهی در بازده اسانس نقاط مختلف مشاهده نشد، در حالی‌که این تفاوت در مرحله گلدهی معنی‌دار بود. در مجموع ۲۶ ترکیب (۹۸٪ تا ۹۹/۳٪) در مرحله رویشی و ۳۲ ترکیب (۹۷/۷٪ تا ۹۸/۵٪) در مرحله گلدهی شناسایی شدند. البته ۲۴ ترکیب در هر دو مرحله مشترک بودند. ترکیب‌های شاخص در مرحله قبل از گلدهی کارواکرول (۵۲/۶٪ تا ۷۷/۹٪)، تیمول (۲/۷٪ تا ۲۱/۸٪)، گاما-ترپینن (۳/۳٪ تا ۷/۴٪)، پارا-سیمن (۲/۲٪ تا ۴/۴٪) و بتا-کاریوفیلن (۱/۷٪ تا ۲/۵٪) بودند (عسکری و همکاران، ۱۳۸۱).

گیاه *T. pubescens* در دو مرحله قبل از گلدهی و گلدهی از چهار منطقه مختلف در استان تهران، دره لار و دماوند (شرق استان)، سیراچال و فشم (شمال استان) جمع‌آوری شدند. بازده اسانس اندام‌های هوایی در مرحله رویشی از ۰/۴۳٪ تا ۰/۸۶٪ و در مرحله گلدهی از ۰/۴۰٪ تا ۲/۰۳٪ متغیر بود. مقدار اسانس نمونه‌های دره لار و دماوند بیشتر از سیراچال و فشم بود. بیشترین ترکیب‌ها عبارت از: کارواکرول، تیمول، گاما-ترپینن، پارا-سیمن، بورنئول، متیل کارواکرول، بتا-کاریوفیلن، ۸،۱-سینئول، لیمونن و ژرانیول بودند (عسکری و همکاران، ۱۳۸۲).

بررسی اثرات ضدمیکروبی *T. kotschyanus* نشان‌دهنده اثرات ضدمیکروبی بالا بر کلبسیلا پنومونیه بوده‌است. تأثیر اسانس بر استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس یکسان ولی کمتر از کلبسیلا پنومونیه بوده‌است (رسولی، ۱۳۷۷).

Shahnazi و همکاران (۲۰۰۷)، در اسانس آویشن تالشی (*T. trautvetteri* Klokov & Desj. Shost) تعداد ۴۹ ترکیب را شناسایی کردند که در این میان تیمول (۲۴/۴۳٪)، بورنئول (۱۱/۳۶٪)، پاراسیمن (۱۰/۰۹٪)، گاما-ترپینن (۷/۷۸٪)، آلفا-پینن (۵/۲۹٪) و کارواکرول (۵/۰۷٪) ترکیب‌های عمده بودند. نتایج بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس این گیاه روی ۷ باکتری نشان داد که بازدارندگی رشد اسانس بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بسیار خوب بوده‌است. حساس‌ترین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با MIC برابر ۱۲۵μg/ml بود.

در مطالعه‌ای که توسط Sipailienee و همکاران (۲۰۰۶)، بر روی اسانس صنعتی آویشن انجام شده‌است، اسانس اثرات ضدمیکروبی قابل‌ملاحظه‌ای بر میکروارگانیسم‌های آزمایش شده یعنی اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز، سیتروباکتر فروندی، هافنیا الویی، سالمونلا تیفی‌موریوم، باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، انتروباکتر ائروژنز، استافیلوکوکوس ارئوس و پروتئوس ولگاریس داشته‌است. بنابراین به‌نظر می‌رسد میزان اثرات ضدمیکروبی با مقدار تیمول و کارواکرول متناسب بوده‌است. بررسی عصاره آبی و اتانولی آویشن بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس ارئوس و باسیلوس‌سوبتیلیس اثرات ضدمیکروبی قابل ملاحظه‌ای را نشان داد (Fan & Chen, 2001). Omidbeygi و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی اثرات

ضدقارچی نشان دادند که اسانس آویشن با غلظت ۳۵۰ppm بالاترین اثر را در ممانعت از رشد اسپرژیلوس فلاوس داشته‌است.

مواد و روشها

به‌منظور بررسی تأثیر محل جمع‌آوری گیاه آویشن (*Thymus pubescens*) و غلظت اسانس حاصل از آن بر اثرات ضدمیکروبی بر علیه تعدادی از میکروارگانیسم‌ها، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. در این آزمایش، محل جمع‌آوری بذر در ۶ سطح شامل رویشگاه‌های آذربایجان‌غربی، تهران، زنجان، قزوین، کردستان و گیلان، رقت اسانس در ۳ سطح شامل یک‌پنجم، یک‌بیست‌وپنجم، یک‌پنجاهم و مقایسه آنها با آنتی‌بیوتیک‌های رایج مانند سفتی‌زوکسیم و سیپروفلوکسازین و میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نیز در ۵ سطح شامل *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeroginosa* و *Candida albicans* بود. ویژگی مورد مطالعه شامل قطر هاله بازدارنده رشد میکروارگانیسم‌های مورد بررسی و غلظت بازدارنده رشد بود. ابتدا بذرهای این گونه از رویشگاه‌های فوق جمع‌آوری و در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور (تهران) کشت گردید. سپس سرشاخه‌های گلدار نمونه‌ها با روش تقطیر با آب به‌وسیله دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شدند. برای تعیین مقدار کمّی و شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس از دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. مشخصات این دستگاه‌ها بشرح زیر بود.

مشخصات کروماتوگراف گازی (GC)

کروماتوگراف گازی فوق‌سریع مدل (Thermo-UFM) مجهز به دتکتور .F.I.D (یونیزاسیون توسط شعله هیدروژن) و داده‌پرداز با نرم‌افزار Chrom-card 2006، ستون DB-5 نیمه‌قطبی (به طول ۱۰ متر، قطر داخلی ۰/۱ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۴ میکرون) است. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۶۰ تا ۲۸۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت افزایش دمای ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه، در مدت زمان ۸/۵ دقیقه انجام شد. گاز حامل، هلیوم و فشار آن در ابتدای ستون برابر ۳ کیلوگرم بر سانتی‌مترمربع، نسبت شکافت برابر ۱:۱۰۰، برای رقیق کردن نمونه، دمای قسمت تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد و دمای آشکارساز ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود.

مشخصات گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS)

کروماتوگراف گازی Varian-3400 متصل شده با طیف‌سنج جرمی (Saturn II)، ستون DB-5 نیمه‌قطبی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میکرون و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرون است. دتکتور Ion trap، گاز حامل هلیم، سرعت جریان گاز حامل ۳۵ml/min و انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنج جرمی معادل ۷۰ الکترون ولت و برنامه حرارتی ۲۴۰C–۶۰ با سرعت ۳°C/min و دمای محفظه تزریق ۲۲۰C بود.

با استفاده از زمان بازداری ترکیب‌ها (Tr)، شاخص بازداری (RI)، طیف جرمی و مقایسه این پارامترها با ترکیب‌های استاندارد و یا با اطلاعات موجود در کتابخانه نسبت به شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس اقدام گردید. درصد کمّی این ترکیب‌ها نیز با محاسبه سطوح زیر منحنی در کروماتوگرام‌ها محاسبه شد (Adams, 1995؛ Davis, 1990؛ Shibamoto, 1987).

آزمون‌های ضدمیکروبی

اثرات ضدمیکروبی اسانس با روش انتشار در آگار بر علیه باکتری‌های گرم مثبت (*Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus*) و گرم منفی (*Escherichia coli* و *Pseudomonas aeroginosa*) و قارچ (*Candida albicans*) بررسی شد. باکتری‌های فوق از کلکسیون میکروبی مرکز پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شدند. به‌منظور بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس، کشت ۱۸ ساعته از باکتری‌ها و قارچ در محیط کشت تریپتوکیس سوی آگار (ساخت شرکت مرک) تهیه شد. ۵۰۰µl از کشت ۱۸ ساعته میکروارگانیسم‌ها با غلظت معادل شماره ۱ استاندارد مک‌فارلند (3×10^{8} cfu/ml) در محیط کشت تریپتوکیس سوی برات (ساخت شرکت مرک) به محیط کشت تریپتوکیس سوی آگار اضافه و با سواپ استریل به شکل یکنواخت بر سطح محیط پخش شدند.

اسانس‌های هر کدام از رویشگاه‌ها با استفاده از دی‌متیل سولفوکساید که فاقد اثر ضدمیکروبی است به نسبت‌های یک‌پنجم (۱:۵)، یک‌بیست‌وپنجم (۱:۲۵) و یک‌پنجاهم (۱:۵۰) رقیق و ۳۰ میکرولیتر بر روی دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متر (ساخت شرکت پادتن طب) قرار داده شده و بر روی پلیت‌های کشت شده قرار گرفتند. از دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین (۵μg) و سفتی‌زوکسیم (۳۰μg) برای مقایسه اثر ضدمیکروبی اسانس‌ها استفاده شد. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و پس از این مدت هاله ممانعت از رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و مقایسه شد. هر کدام از آزمون‌ها در ۴ تکرار انجام شده‌اند.

تعیین مقادیر MIC و MBC

از روش mirobroth dilution برای تعیین مقادیر MIC (Minimum inhibitory concentration: حداقل غلظت از یک آنتی‌بیوتیک که مانع رشد باکتری‌ها می‌شود) و MBC (Minimum Bactericidal Concentration: حداقل غلظت از یک آنتی‌بیوتیک که موجب مرگ باکتری‌ها می‌شود) استفاده شد. برای این منظور غلظت‌های متوالی از هر کدام از اسانس بین ۶۰۰μg/ml تا ۳/۷۵ 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 در ۳۷ درجه سانتی گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری و پس از این مدت کمترین غلظتی از اسانس که فاقد رشد میکروبی است (فاقد کدورت) به‌عنوان MIC تعیین شد. برای تعیین MBC، ۵ میکرولیتر از هر کدام از چاهک‌های میکروپلیت برداشته و به محیط کشت فاقد اسانس منتقل و در ۳۷ درجه سانتی گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. حداقل غلظت اسانس که مانع از رشد میکروارگانیسم می‌شود به‌عنوان MBC تعیین شد (Pepeljnjak *et al*., 2005).

نتایج

در جدول ۱، محل جمع‌آوری، وزن هزاردانه و بازده اسانس زردرنگ سرشاخه‌های گلدار *T. pubescens* آورده شده‌است. وزن هزاردانه بین ۰/۳۰ تا ۰/۳۶ گرم و بازده اسانس رویشگاه‌های مختلف (بر پایه وزنی-وزنی خشک شده) بین ۰/۳۹٪ تا ۰/۸۳٪ بود.

جدول ۱- وزن هزاردانه و بازده اسانس سرشاخه‌های گلدار *Thymus pubescens* با منشأ مختلف

محل جمع‌آوری استان (شهرستان)	وزن هزاردانه (گرم)	درصد رطوبت*	بازده (براساس وزن خشک) (٪)
آذربایجان‌غربی (پیرانشهر)	۰/۳۴	٪۶	۰/۴۰
تهران (فیروزکوه)	۰/۳۶	٪۸	۰/۶۴
زنجان (زنجان)	۰/۳۰	٪۴	۰/۸۲
قزوین (قزوین)	۰/۳۲	٪۸	۰/۸۳
کردستان (سقز)	۰/۳۳	٪۵	۰/۳۹
گیلان (سیاهکل)	۰/۳۴	٪۳	۰/۸۳

*: درصد رطوبت در زمان اسانس‌گیری محاسبه شده‌است.

نتایج حاصل از شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس در جدول ۲ آمده‌است. در اسانس نمونه‌های آذربایجان‌غربی ۳۰ ترکیب، تهران ۲۸ ترکیب، زنجان ۲۳ ترکیب، قزوین ۲۷ ترکیب، کردستان ۳۰ ترکیب و گیلان ۳۲ ترکیب شناسایی شد. ۱۳ ترکیب در هر شش نمونه مشترک بود. در ترکیب‌های اصلی تنوع دیده می‌شود.

بیشترین درصد ترکیب‌های اسانس نمونه آذربایجان‌غربی ترانس کاریوفیلین (۲۶٪) و کامفور (۲۴/۲٪) بودند. بیشترین

درصد ترکیب های اسانس نمونه تهران ژرانیال (۳۰/۹٪)، ژرانیل استات (۲۳/۹٪) و لینالول (۷/۹٪) بودند. بیشترین درصد ترکیب های اسانس نمونه زنجان لینالول (۲۳/۵٪)، ۸،۱-سینئول (۲۲/۲٪)، ترانس کاریوفیلین (۱۱/۱٪) و تیمول (۱۰/۶٪) بودند. بیشترین درصد ترکیب های اسانس نمونه قزوین تیمول (۳۰/۳٪) و کارواکرول (۳۰/۲٪) بودند. بیشترین درصد ترکیب های اسانس نمونه کردستان آلفا-ترپینیل‌استات (۱۷/۶٪)، لینالول (۱۷/۲٪)، ژرانیل‌استات (۱۲/۷٪)، ۸،۱-سینئول (۱۰/۴٪)، تیمول (۸/۹٪) و آلفا-توجن (۸/۴٪) بودند بیشترین درصد ترکیب های اسانس نمونه گیلان آلفا-ترپینئول (۳۱/۳٪) و ژرانیول (۱۱/۲٪) بودند (جدول ۲).

بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر منشأ بذر، نوع میکروارگانیسم، رقت اسانس، اثر متقابل منشأ بذر و اسانس، اثر متقابل منشأ بذر و میکروارگانیسم، اثر متقابل میکروارگانیسم و اسانس و اثر سه‌گانه متقابل اسانس و منشأ بذر و میکروارگانیسم در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۵).

مقایسه میانگین تیمارها (جدول ۵) نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد (۲۰/۴ میلی متر) مربوط به نمونه‌های آویشن استان تهران و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به نمونه‌های آذربایجان‌غربی (۱۷/۵ میلی متر) بود. مقایسه میانگین تیمار رقت اسانس و آنتی‌بیوتیک نشان داد که بیشترین قطر هاله مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین (۲۹/۸ میلی‌متر) و کمترین قطر هاله مربوط به رقت یک‌پنجاهم اسانس (۱۰/۵ میلی متر) بود. همچنین مقایسه میانگین تیمار میکروارگانیسم‌ها نشان داد که بیشترین قطر هاله مربوط به قارچ کاندیدا آلبیکنس (۲۱/۷ میلی‌متر) و کمترین قطر هاله مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا (۱۳/۶ میلی‌متر) بود.

مقایسه میانگین اثر متقابل منشأ بذر و رقت اسانس نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم مربوط به منشأ بذرهای آذربایجان‌غربی و تهران و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین به ترتیب معادل ۳۱/۳، ۳۱/۵ میلی متر و کمترین قطر هاله مربوط به منشأ بذر زنجان در رقت یک‌پنجاهم اسانس (۹/۴ میلی متر) بود (جدول ۷).

مقایسه میانگین اثر متقابل منشأ بذرهای *T. pubescence* و نوع میکروارگانیسم نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم مربوط به منشأ بذرهای تهران و قزوین و مخمر کاندیدا آلبیکنس به ترتیب معادل ۲۳/۵ و ۲۴/۲ میلی متر و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به منشأ بذر کردستان و باکتری سودوموناس آئروژینوزا (۱۲/۲ میلی‌متر) بود (جدول ۷).

مقایسه میانگین اثر متقابل میکروارگانیسم و رقت اسانس مشخص نمود که بیشترین قطر هاله عدم رشد (۳۳/۴ میلی‌متر) مربوط به قارچ کاندیدا آلبیکنس و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا در رقت های یک‌پنجم، یک‌بیست و پنجم و یک‌پنجاهم (۹/۷، ۹/۳ و ۹ میلی‌متر) بود (جدول ۷).

مقایسه میانگین اثر متقابل محل جمع آوری، نوع میکروارگانیسم و رقت اسانس نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد، معادل ۳۵/۵ میلی متر مربوط به اسانس منشأ بذر آذربایجان‌غربی، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین بر روی باکتری باسیلوس‌سوبتیلیس و کمترین قطر هاله عدم رشد نیز معادل ۸ میلی متر مربوط به اسانس آذربایجان‌غربی با غلظت یک پنجاهم بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا بود (جدول ۸).

نتایج حاصل از بررسی MIC یا حداقل غلظت بازدارنده از ماده مورد بررسی (برحسب μg/ml) در جدول ۳ نشان داده شده‌است. نتایج نشان می‌دهد که اسانس با منشأ بذر تهران و بذر کردستان به‌ترتیب کمترین (۱۳/۸μg/ml) و بیشترین (۴۷۵/۰μg/ml) مقدار MIC را نشان داد. نتایج MBC نیز نشان داد که اسانس با منشأ بذر تهران و بذر کردستان به‌ترتیب کمترین (۱۳/۸μg/ml) و بیشترین (≥۴۷۰μg/ml) را از خود نشان دادند (جدول ۴). براساس مقادیر MIC و MBC می‌توان گفت که اسانس با منشأ بذر تهران و با منشأ بذر کردستان به‌ترتیب بیشترین و کمترین اثر ضدمیکروبی را دارند.

جدول ۲- مقایسه ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس سرشاخه گلدار آویشن (*Thymus pubescence*) از رویشگاه‌های مختلف

نام ترکیب‌ها	شاخص کواتس	آذربایجان‌غربی (کد۱۱۱۹)	تهران (۱۱۵۵)	زنجان (۱۱۵۳)	قزوین (۱۱۱۸)	کردستان (۱۱۴۶)	گیلان (۱۱۰۶)
α-thujene	۹۳۱	–	۰/۴	۰/۲	۰/۴	۸/۴	–
α-pinene	۹۴۰	۰/۷	۰/۷	۱/۱	۳/۸	۱/۹	۱/۴
camphene	۹۵۴	۰/۹	۰/۷	۱/۳	۱/۴	۲/۹	۰/۹
sabinene	۹۷۶	۰/۲	–	۰/۸	۰/۴	۰/۵	۰/۴
β-pinene	۹۸۲	۰/۳	۰/۳	۱/۱	۰/۶	۰/۷	۰/۲
myrcene	۹۹۳	۰/۵	۰/۳	۰/۶	۰/۶	۰/۸	۰/۸
α-terpinen	۱۰۲۰	–	۰/۳	۲/۵	۰/۳	۰/۳	–
p-cymene	۱۰۲۸	۰/۵	۴/۱	۵/۷	۳/۴	۷/۲	۰/۵
limonene	۱۰۳۳	۰/۲	۰/۳	–	۰/۹	۱/۲	۱/۰
1,8-cineole	۱۰۳۵	۵/۴	۲/۹	۲۲/۲	۴/۹	۱۰/۴	۲/۵
E-β-ocimene	۱۰۵۱	۰/۴	–	۳/۷	۰/۹	۰/۲	۲/۵
γ-terpinene	۱۰۶۵	۳/۴	۰/۸	۰/۹	۰/۷	۰/۷	۰/۲
cis-sabinene hydrate	۱۰۷۰	۰/۲	–	۰/۸	۰/۶	۰/۳	۰/۱
cis-linalool oxide	۱۰۷۶	۰/۴	–	–	–	۰/۳	–
linalool	۱۱۰۰	۰/۶	۷/۹	۲۳/۵	۴/۱	۱۷/۲	۶/۲
camphor	۱۱۴۵	۲۴/۲	۰/۸	۲/۲	۱/۲	۲/۱	۱/۵
borneol	۱۱۶۷	۱/۵	۱/۸	۳/۷	۲/۹	۳/۹	۲/۵
terpinene-4-ol	۱۱۷۸	۱/۵	۰/۴	۱/۵	۰/۴	۰/۵	۰/۳
α-terpineol	۱۱۹۰	۰/۳	–	–	۵/۲	۱/۷	۳۱/۲
nerol	۱۲۲۹	–	۰/۴	–	–	–	۱/۵
neral	۱۲۴۱	۲/۰	۰/۵	–	–	۰/۲	۱/۸
methyl carvacrol	۱۲۴۵	–	۰/۳	۰/۶	۱/۴	۱/۳	–
geraniol	۱۲۵۷	۱/۰	۰/۶	–	۱/۶	۰/۸	۱۱/۲
geranial	۱۲۷۱	۱۶/۷	۳۰/۹	–	–	۰/۳	۲/۰
bornyl acetate	۱۲۸۷	۱/۵	–	۰/۶	–	۳/۱	۴/۰
thymol	۱۲۹۳	۰/۶	۰/۳	۱۰/۶	۳۰/۳	۸/۹	۴/۶
carvacrol	۱۳۰۰	–	۱۲/۹	۴/۶	۳۰/۲	۰/۴	۵/۸
α-terpinyl acetate	۱۳۵۳	–	–	–	–	۱۷/۶	۵/۶
geranyl acetate	۱۳۸۶	۱/۰	۲۳/۹	–	۰/۸	۱۲/۷	۲/۳
E-caryophyllene	۱۴۲۰	۲۶/۰	۳/۱	۱۱/۱	۱/۳	۰/۵	۴/۶
germacrene d	۱۴۸۲	۲/۵	۲/۶	–	۰/۳	–	۰/۷
bicyclogermacrene	۱۴۹۶	۱/۰	۰/۴	–	–	–	۱/۳
β-bisabolene	۱۵۱۲	۰/۷	۰/۳	–	۰/۷	–	۰/۴

ادامه جدول ۲-

نام ترکیب‌ها	شاخص کواتس	آذربایجان‌غربی (کد۱۱۱۹)	تهران (۱۱۵۵)	زنجان (۱۱۵۳)	قزوین (۱۱۱۸)	کردستان (۱۱۴۶)	گیلان (۱۱۰۶)
δ-cadinene	۱۵۱۴	–	–	–	۰/۸	–	–
cissesquisabinene hydrate	۱۵۴۷	۰/۵	–	–	–	–	۰/۳
spathulenol	۱۵۷۸	۰/۶	–	–	–	–	۰/۲
caryophyllene oxide	۱۵۸۳	۱/۹	–	–	–	–	۱/۲
3-octanone	–	–	۰/۲	–	–	–	–
3-octanol			۰/۴				
trans linalool oxide	–	–		–	–	۰/۳	–
E-neroliodol	–	–	–	۷/۸	–	–	–
Z-β-ocimene	–	–	–	۰/۸	–	–	–
Total	–	۹۷/۲	۹۷/۹	۹۷/۸	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰

جدول ۳- کمترین غلظت بازدارنده (**MIC**) اسانس ***Thymus pubescence*** از رویشگاه‌های مختلف

	MIC (mg/ml)				
	کردستان (۱۱۴۶)	قزوین (۱۱۱۸)	گیلان (۱۱۰۶)	زنجان (۱۱۵۳)	تهران (۱۱۵۵)
Escherchia coli	≥۴۷۰/۰	۷۵	۳۱/۲۵	۱۹۵/۰	≤۱۳/۷۵
Staphylococcus aureus	۵۸/۷۵	۳۷/۵	۲۵۰	۴۸/۷۵	≤۱۳/۷۵
Pseudomonas aeruginosa	≥۴۷۰/۰	≤۶۰۰	≤۵۰۰	≥ ۳۹۰/۰	۲۷/۵
Candida albicans	≥۴۷۰/۰	۳۷/۵	۳۱/۲۵	≥ ۳۹۰/۰	≤۱۳/۷۵
Bacillus subtilis	≥۴۷۰/۰	۷۵	۳۱/۲۵	۴۸/۷۵	≤۱۳/۷۵

جدول ۴- کمترین غلظت کشنده (**MBC**) اسانس ***Thymus pubescence*** از رویشگاه‌های مختلف

	MBC (mg/ml)				
	کردستان (۱۱۴۶)	قزوین (۱۱۱۸)	گیلان (۱۱۰۶)	زنجان (۱۱۵۳)	تهران (۱۱۵۵)
Escherchia coli	≥۴۷۰/۰	۷۵	۳۱/۲۵	۱۹۵/۰	≤۱۳/۷۵
Staphylococcus aureus	۱۱۷/۵	۷۵	۵۰۰	۹۷/۵	≤۱۳/۷۵
Pseudomonas aeruginosa	≥۴۷۰/۰	≤۶۰۰	≤۵۰۰	≥ ۳۹۰/۰	۲۷/۵
Candida albicans	≥۴۷۰/۰	۳۷/۵	۶۲/۵	≥ ۳۹۰/۰	≤۱۳/۷۵
Bacillus subtilis	≥۴۷۰/۰	۱۵۰	۶۲/۵	۴۸/۷۵	≤۱۳/۷۵

جدول ۵- تجزیه واریانس قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم تحت تیمار رقت اسانس *Thymus pubescence* از رویشگاه‌های مختلف

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات قطر هاله عدم رشد
منشأ بذر	۵	۱۶۳/۲۸۳ **
رقت اسانس	۴	۷۹۰۹/۶۳۲ **
اثر متقابل منشأ بذر و اسانس	۲۰	۷۶/۱۱۰ **
میکروارگانیسم	۴	۱۱۴۶/۸۴۰ **
اثر متقابل منشأ بذر و میکروارگانیسم	۲۰	۱۷/۵۸۸ **
اثر متقابل میکروارگانیسم و اسانس	۱۶	۲۳۵/۵۵۶ **
اثر متقابل اسانس و منشأ بذر و میکروارگانیسم	۸۰	۸/۷۲۶ **
خطا	۴۵۰	۱/۷۱۷
کل	۵۹۹	۴۴۱۵۵/۹۸۵
CV		٪۷/۰۸

**: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

جدول ۶- اثر منشأ بذر، نوع میکروارگانیسم و رقت اسانس *Thymus pubescence* بر قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵٪

تیمارها	قطر هاله عدم رشد (mm)
منشأ بذر	
آذربایجان‌غربی	۱۷/۵ d
تهران	۲۰/۴ a
زنجان	۱۷/۸ cd
قزوین	۱۹/۸ b
کردستان	۱۷/۹ c
گیلان	۱۷/۶ cd
رقت اسانس و آنتی‌بیوتیک:	
رقت یک پنجم اسانس	۱۶/۰ c
رقت یک بیست و پنجم اسانس	۱۲/۴ d
رقت یک پنجاهم اسانس	۱۰/۵ e
سفتی زوکسیم	۲۳/۸ b
سیپروفلوکسازین	۲۹/۸ a
میکروارگانیسم	
Escherchia coli	۱۸/۸ c
Staphylococcus aureus	۱۸/۱ b
Pseudomonas aeruginosa	۱۳/۶ e
Candida albicans	۲۱/۷ a
Bacillus subtilis	۲۰/۴ b

میانگین‌های دارای حروف غیرمشترک اختلاف معنی‌داری را حداقل در سطح احتمال ۵٪ دارند.

جدول ۷- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل منشأ بذر و رقت اسانس *Thymus pubescence* (الف)، اثر متقابل منشأ بذر آویشن و نوع میکروارگانیسم (ب) و اثر متقابل نوع میکروارگانیسم و رقت اسانس آویشن بر قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم با استفاده از آزمون LSD، در سطح ۵٪ (ج)

الف		ب		ج	
منشأ بذر × رقت اسانس	هاله (mm)	منشأ بذر × میکروارگانیسم	هاله (mm)	میکروارگانیسم و رقت اسانس	هاله (mm)
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵	۱۱/۴ o	آذربایجان‌غربی× *Escher*	۱۷/۶ij	رقت ۱:۵× *Escher*	۱۵/۱j
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۲۵	۱۰/۲ pq	آذربایجان‌غربی× *Staph*	۱۶/۶k	رقت ۱:۵× *Staph*	۱۶/۳i
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵۰	۹/۵ qr	آذربایجان‌غربی× *Pseudo*	۱۳/۲m	رقت ۱:۵× *Pseudo*	۹/۷n
آذربایجان‌غربی× سفتی‌زوکسیم	۲۴/۸ ef	آذربایجان‌غربی× *Candida*	۱۹/۹f	رقت ۱:۵× *Candida*	۲۰/۰g
آذربایجان‌غربی×سیپروفلوکسازین	**۳۱/۳ a**	آذربایجان‌غربی× *Bacillus*	۲۰/۰f	*Bacillus*× رقت ۱:۵	۱۹/۰h
تهران× رقت ۱:۵	۱۷/۸ k	تهران× *Escherchia*	۲۲/۳bc	رقت ۱:۲۵×*Escher*	۱۲/۳l
تهران× رقت ۱:۲۵	۱۵/۰ l	تهران× *Staph*	۱۹/۷fg	رقت ۱:۲۵× *Staph*	۱۲/۴l
تهران× رقت ۱:۵۰	۱۲/۲ no	تهران× *Pseudo*	۱۴/۲l	رقت ۱:۲۵× *Pseudo*	۹/۳n
تهران× سفتی زوکسیم	۲۵/۵ e	**تهران× *Candida***	**۲۳/۵a**	رقت ۱:۲۵× *Candida*	۱۴/۱k
تهران× سیپروفلوکسازین	**۳۱/۵ a**	تهران× *Bacillus*	۲۲/۴b	رقت ۱:۲۵× *Bacillus s*	۱۴/۰k
زنجان× رقت ۱:۵	۱۴/۵ l	زنجان× *Escherchia coli*	۱۷/۲jk	رقت ۱:۵۰× *Escher*	۱۰/۷m
زنجان× رقت ۱:۲۵	۱۱/۸ no	زنجان× *Staph*	۱۶/۹jk	رقت ۱:۵۰× *Staphy*	۱۰/۸m
زنجان× رقت ۱:۵۰	۹/۳ r	زنجان× *Pseudo*	۱۳/۷lm	رقت ۱:۵۰× *Pseudo*	۹/۰n
زنجان× سفتی زوکسیم	۲۴/۰ gl	زنجان× *Candida*	۲۱/۵cd	رقت ۱:۵۰× *Candida*	۱۱/۱m
زنجان× سیپروفلوکسازین	۲۹/۴ bc	زنجان× *Bacillus*	۱۹/۶fg	رقت ۱:۵۰× *Bacillus*	۱۰/۸m
قزوین× رقت ۱:۵	۲۰/۱ i	قزوین× *Escher*	۱۹/۷fg	سفتی زوکسیم ×*Escher*	۲۶/۳de
قزوین× رقت ۱:۲۵	۱۴/۵ l	قزوین× *Staphy*	۱۸/۹gh	سفتی زوکسیم × *Staph*	۲۵/۸ef
قزوین× رقت ۱:۵۰	۱۲/۰ no	قزوین× *Pseudo*	۱۴/۳l	سفتی‌زوکسیم × *Pseudo*	۱۰/۷m
قزوین× سفتی زوکسیم	۲۳/۸ h	**قزوین× *Candida***	**۲۴/۲a**	سفتی زوکسیم × *Candida*	۲۶/۸c
قزوین× سیپروفلوکسازین	۲۸/۸ c	قزوین× *Bacillus*	۲۲/۵bc	سفتی زوکسیم × *Bacillus*	۲۶/۶d
کردستان× رقت ۱:۵	۱۹/۰ j	کردستان× *Escher*	۱۷/۵ij	سیپروفلوکسازین × *Escher*	۲۹/۴c
کردستان× رقت ۱:۲۵	۱۲/۵ mn	کردستان× *Staphy*	۱۸/۹gh	سیپروفلوکسازین × *Staphy*	۲۵/۲f
کردستان× رقت ۱:۵۰	۱۰/۲ pq	کردستان× *Pseudo*	۱۲/۱n	سیپروفلوکسازین × *Pseudo*	۲۹/۲c
کردستان× سفتی زوکسیم	۲۰/۳ i	کردستان× *Candida*	۲۰/۹de	سیپروفلوکسازین× *Candida*	**۳۳/۳a**
کردستان× سیپروفلوکسازین	۲۷/۵ d	کردستان× *Bacillus*	۲۰/۳ef	سیپروفلوکسازین× *Bacillus*	۳۱/۸b
گیلان× رقت ۱:۵	۱۳/۲ m	گیلان× *Escher*	۱۸/۲hi		
گیلان× رقت ۱:۲۵	۱۰/۴ p	گیلان× *Staphy*	۱۷/۶ij		
گیلان× رقت ۱:۵۰	۹/۵ qr	گیلان× *Pseudo*	۱۳/۹lm		
گیلان× سفتی زوکسیم	۲۴/۷ fg	گیلان× *Candida*	۲۰/۱ef		
گیلان× سیپروفلوکسازین	۳۰/۱ b	گیلان× *Bacillus*	۱۸/۲hi		

میانگین‌های دارای حروف غیرمشترک اختلاف معنی‌داری را حداقل در سطح احتمال ۵٪ دارند.

جدول ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع منشأ بذر و میکروارگانیسم و رقت اسانس *Thymus pubescence* بر قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵٪

اثرات متقابل نوع منشأ بذر و میکروارگانیسم و رقت اسانس	قطر هاله عدم رشد (mm)	اثرات متقابل نوع منشأ بذر و میکروارگانیسم و رقت اسانس	قطر هاله عدم رشد (mm)
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵× *Escher*	۱۰/۰	تهران× رقت ۱:۲۵× *Candida*	۱۶/۲
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵× *Staph*	۱۱/۸	تهران× رقت ۱:۲۵× *Bacillus*	۱۸/۰
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵× *Pseudo*	۹/۲	تهران× رقت ۱:۵۰× *Escher*	۱۲/۸
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵× *Candida*	۱۲/۵	تهران× رقت ۱:۵۰× *Staph*	۱۲/۰
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵× *Bacillus*	۱۳/۸	تهران× رقت ۱:۵۰× *Pseudo*	۹/۲
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۲۵× *Escher*	۹/۲	تهران× رقت ۱:۵۰× *Candida*	۱۳/۲
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۲۵× *Staph*	۱۰/۲	تهران× رقت ۱:۵۰× *Bacillus*	۱۳/۸
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۲۵× *Pseudo*	۸/۸	تهران× سفتی زوکسیم × *Escher*	۳۱/۰
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۲۵× *Candida*	۱۱/۰	تهران× سفتی زوکسیم × *Staph*	۲۶/۸
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۲۵× *Bacillus*	۱۲/۰	تهران× سفتی زوکسیم × *Pseudo*	۱۰/۲
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵۰× *Escher*	۹/۲	تهران× سفتی زوکسیم × *Candida*	۳۲/۲
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵۰× *Staph*	۹/۸	تهران× سفتی زوکسیم× *Bacillus*	۲۷/۲
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵۰× *Pseudo*	۸/۰	تهران× سیپروفلوکسازین × *Escher*	۳۳/۰
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵۰× *Candida*	۱۰/۰	تهران× سیپروفلوکسازین × *Staph*	۲۷/۲
آذربایجان‌غربی× رقت ۱:۵۰× *Bacillus*	۱۰/۵	تهران× سیپروفلوکسازین × *Pseudo*	۳۱/۰
آذربایجان‌غربی× سفتی‌زوکسیم × *Escher*	۲۷/۸	تهران× سیپروفلوکسازین × *Candida*	۳۴/۸
آذربایجان‌غربی× سفتی‌زوکسیم × *Staph*	۲۶/۲	تهران× سیپروفلوکسازین × *Bacillus*	۳۱/۸
آذربایجان‌غربی× سفتی‌زوکسیم × *Pseudo*	۱۰/۸	زنجان× رقت ۱:۵× *Escher*	۱۱/۸
آذربایجان‌غربی× سفتی‌زوکسیم× *Candida*	۳۱/۰	زنجان× رقت ۱:۵× *Staph*	۱۴/۲
آذربایجان‌غربی× سفتی‌زوکسیم × *Bacillus*	۲۸/۲	زنجان× رقت ۱:۵× *Pseudo*	۹/۵
آذربایجان‌غربی×سیپروفلوکسازین × *Escher*	۳۱/۸	زنجان× رقت ۱:۵× *Candida*	۱۸/۲
آذربایجان‌غربی×سیپروفلوکسازین × *Staph*	۲۵/۰	زنجان× رقت ۱:۵× *Bacillus*	۱۸/۸
آذربایجان‌غربی×سیپروفلوکسازین × *Pseudo*	۲۹/۵	زنجان× رقت ۱:۲۵× *Escher*	۱۰/۸
آذربایجان‌غربی×سیپروفلوکسازین × *Candida*	۳۴/۸	زنجان× رقت ۱:۲۵× *Staph*	۱۱/۵
آذربایجان‌غربی×سیپروفلوکسازین × *Bacillus*	**۳۵/۵**	زنجان× رقت ۱:۲۵× *Pseudo*	۹/۲
تهران× رقت ۱:۵× *Escher*	۱۸/۸	زنجان× رقت ۱:۲۵× *Candida*	۱۳/۵
تهران× رقت ۱:۵× *Staph*	۱۷/۲	زنجان× رقت ۱:۲۵× *Bacillus*	۱۳/۸
تهران× رقت ۱:۵× *Pseudo*	۱۰/۸	زنجان× رقت ۱:۵۰× *Escher*	۹/۵
تهران× رقت ۱:۵× *Candida*	۲۱/۰	زنجان× رقت ۱:۵۰× *Staph*	۱۰/۰
تهران× رقت ۱:۵× *Bacillus*	۲۱/۲	زنجان× رقت ۱:۵۰× *Pseudo*	۸/۸
تهران× رقت ۱:۲۵× *Escher*	۱۶/۰	زنجان× رقت ۱:۵۰× *Candida*	۹/۸
تهران× رقت ۱:۲۵× *Staph*	۱۵/۰	زنجان× رقت ۱:۵۰× *Bacillus*	۸/۸
تهران× رقت ۱:۲۵× *Pseudo*	۹/۸	زنجان× سفتی زوکسیم × *Escher*	۲۵/۸

ادامه جدول ۸-

اثرات متقابل نوع منشأ بذر و میکروارگانیسم و رقت اسانس	قطر هاله عدم رشد (mm)	اثرات متقابل نوع منشأ بذر و میکروارگانیسم و رقت اسانس	قطر هاله عدم رشد (mm)
زنجان× سفتی زوکسیم × *Staph*	۲۵/۰	قزوین× سیپروفلوکسازین × *Bacillus*	۳۱/۰
زنجان× سفتی زوکسیم × *Pseudo*	۱۱/۵	کردستان× رقت ۱:۵× *Staph*	۱۸/۸
زنجان× سفتی زوکسیم × *Candida*	۳۱/۲	کردستان× رقت ۱:۵× *Pseudo*	۹/۲
زنجان× سفتی زوکسیم × *Bacillus*	۲۶/۲	کردستان× رقت ۱:۵× *Escher*	۱۸/۲
زنجان× سیپروفلوکسازین × *Escher*	۲۸/۵	کردستان× رقت ۱:۵× *Candida*	۲۴/۸
زنجان× سیپروفلوکسازین × *Staph*	۲۳/۸	کردستان× رقت ۱:۵× *Bacillus*	۲۴/۰
زنجان× سیپروفلوکسازین × *Pseudo*	۲۹/۲	کردستان× رقت ۱:۲۵× *Escher*	۱۲/۰
زنجان× سیپروفلوکسازین × *Candida*	**۳۵/۰**	کردستان× رقت ۱:۲۵× *Staph*	۱۳/۰
زنجان× سیپروفلوکسازین × *Bacillus*	۳۰/۵	کردستان× رقت ۱:۲۵× *Pseudo*	۹/۰۰
قزوین× رقت ۱:۵× *Escher*	۱۸/۰	کردستان× رقت ۱:۲۵× *Candida*	۱۴/۸
قزوین× رقت ۱:۵× *Staph*	۲۰/۲	کردستان× رقت ۱:۲۵× *Bacillus*	۱۴/۰۰
قزوین× رقت ۱:۵× *Pseudo*	۱۰/۲۵	کردستان× رقت ۱:۵۰× *Escher*	۱۰/۲
قزوین× رقت ۱:۵× *Candida*	۲۸/۸	کردستان× رقت ۱:۵۰× *Staph*	۱۰/۸
قزوین× رقت ۱:۵× *Bacillus*	۲۳/۵	کردستان× رقت ۱:۵۰× *Pseudo*	۹/۰
قزوین× رقت ۱:۲۵× *Escher*	۱۵/۰	کردستان× رقت ۱:۵۰ × *Candida*	۱۰/۸
قزوین× رقت ۱:۲۵× *Staph*	۱۳/۲	کردستان× رقت ۱:۵۰ × *Bacillus*	۱۰/۲
قزوین× رقت ۱:۲۵× *Pseudo*	۹/۸	کردستان× سفتی زوکسیم × *Escher*	۲۱/۸
قزوین× رقت ۱:۲۵× *Candida*	۱۸/۰	کردستان× سفتی زوکسیم × *Staph*	۲۴/۰
قزوین× رقت ۱:۲۵× *Bacillus*	۱۶/۵	کردستان× سفتی زوکسیم × *Pseudo*	۸/۰
قزوین× رقت ۱:۵۰× *Escher*	۱۲/۲	کردستان× سفتی زوکسیم × *Candida*	۲۴/۲
قزوین× رقت ۱:۵۰× *Staph*	۱۲/۰	کردستان× سفتی زوکسیم × *Bacillus*	۲۳/۸
قزوین× رقت ۱:۵۰× *Pseudo*	۱۰/۰	کردستان× سیپروفلوکسازین × *Escher*	۲۵/۲
قزوین× رقت ۱:۵۰× *Candida*	۱۳/۲	کردستان× سیپروفلوکسازین × *Staph*	۲۷/۸
قزوین× رقت ۱:۵۰× *Bacillus*	۱۲/۵	کردستان× سیپروفلوکسازین × *Pseudo*	۲۵/۵
قزوین× سفتی زوکسیم × *Escher*	۲۴/۸	کردستان× سیپروفلوکسازین × *Candida*	۲۹/۸
قزوین× سفتی زوکسیم × *Staph*	۲۶/۲	کردستان× سیپروفلوکسازین × *Bacillus*	۲۹/۵
قزوین× سفتی زوکسیم × *Pseudo*	۱۲/۰	گیلان× رقت ۱:۵× *Escher*	۱۳/۸
قزوین× سفتی زوکسیم × *Candida*	۲۹/۰	گیلان× رقت ۱:۵× *Staph*	۱۵/۵
قزوین× سفتی زوکسیم × *Bacillus*	۲۶/۸	گیلان× رقت ۱:۵× *Pseudo*	۹/۲
قزوین× سیپروفلوکسازین × *Escher*	۲۸/۲	گیلان× رقت ۱:۵× *Candida*	۱۴/۵
قزوین× سیپروفلوکسازین × *Staph*	۲۲/۸	گیلان× رقت ۱:۵× *Bacillus*	۱۳/۰
قزوین× سیپروفلوکسازین × *Pseudo*	۲۹/۸	گیلان× رقت ۱:۲۵× *Escher*	۱۰/۸
قزوین× سیپروفلوکسازین × *Candida*	۳۲/۲	گیلان× رقت ۱:۲۵× *Staph*	۱۱/۲

ادامه جدول ۸-

اثرات متقابل نوع منشأ بذر و میکروارگانیسم و رقت اسانس	قطر هاله عدم رشد (mm)	اثرات متقابل نوع منشأ بذر و میکروارگانیسم و رقت اسانس	قطر هاله عدم رشد (mm)
گیلان× رقت ۱:۲۵ ×*Pseudo*	۹/۲	گیلان× سفتی زوکسیم ×*Staph*	۲۶/۲
گیلان× رقت ۱:۲۵ ×*Candida*	۱۱/۲	گیلان× سفتی زوکسیم ×*Pseudo*	۱۱/۵
گیلان× رقت ۱:۲۵ ×*Bacillus*	۹/۸	گیلان× سفتی زوکسیم ×*Candida*	۳۱/۰
گیلان× رقت ۱:۵۰ ×*Escher*	۱۰/۰	گیلان× سفتی زوکسیم ×*Bacillus*	۲۷/۵
گیلان× رقت ۱:۵۰ ×*Staph*	۱۰/۲	گیلان× سیپروفلوکسازین ×*Escher*	۲۹/۵
گیلان× رقت ۱:۵۰ ×*Pseudo*	۹/۰۰	گیلان× سیپروفلوکسازین ×*Staph*	۲۴/۸
گیلان× رقت ۱:۵۰ ×*Candida*	۹/۸	گیلان× سیپروفلوکسازین ×*Pseudo*	۳۰/۵
گیلان× رقت ۱:۵۰ ×*Bacillus*	۸/۸	گیلان× سیپروفلوکسازین ×*Candida*	۳۳/۸
گیلان× سفتی زوکسیم ×*Escher*	۲۷/۰	گیلان× سیپروفلوکسازین ×*Bacillus*	۳۲/۲

بحث

در این تحقیق بازده اسانس سرشاخه‌های گلدار *T. pubescence* مناطق مختلف بین ۰/۳۹٪ تا ۰/۸۳٪ بدست آمد که اختلاف چندانی مشاهده نگردید. عسکری و همکاران (۱۳۸۱) بازده اسانس *T. pubescence* منشأ بذر فیروزکوه را در مرحله گلدهی ۱/۴۵٪ گزارش کردند. بازده اسانس این گونه از چهار منطقه در استان تهران (دره لار، دماوند، سیراچال و فشم) در مرحله رویشی ۰/۴۳ تا ۰/۸۶٪ و در مرحله گلدهی از ۴۰٪ تا ۲/۰۳٪ گزارش شده بود (عسکری و همکاران، ۱۳۸۲).

در این تحقیق ترکیب های اصلی اسانس رویشگاه‌های مختلف متفاوت بوده است. آلفا-توجن در اسانس نمونه استان کردستان (۸/۴٪)، ۸،۱-سینئول در اسانس نمونه استان‌های زنجان و کردستان (۲۲/۲٪ و ۱۰/۴٪)، لینالول در اسانس نمونه استان های تهران، زنجان و کردستان (۷/۹٪، ۲۳/۵٪ و ۱۷/۲٪)، کامفور در اسانس نمونه استان آذربایجان‌غربی (۲۴/۲٪)، آلفا-ترپینئول در اسانس نمونه استان گیلان (۳۱/۲٪)، ژرانیال در اسانس نمونه استان تهران (۳۰/۹٪)، تیمول در اسانس نمونه استان‌های زنجان، قزوین و کردستان (۱۰/۶٪، ۳۰/۳٪ و ۸/۹٪)، کارواکرول در اسانس نمونه استان های تهران و قزوین (۱۲/۱٪ و ۳۰/۲٪)، آلفا-ترپینیل‌استات در اسانس نمونه استان کردستان (۱۷/۶٪)، ژرانیل‌استات در اسانس نمونه استان های تهران و کردستان (۲۳/۹٪ و ۱۲/۷٪)، ترانس کاریوفیلین در اسانس نمونه استان‌های آذربایجان‌غربی و زنجان (۲۶/۰٪، ۱۱/۱٪) بودند. این ترکیب ها در تحقیقات سایر محققان نیز گزارش شده‌است (Rustaiyan *et al*., 2000؛ Sefidkon *et al*., 2002؛ عسکری و همکاران، ۱۳۸۱).

رسولی (۱۳۷۷) نشان داد که اسانس *Th. kotschyanus* بر کلبسیلاپنومونیه اثر ضدمیکروبی خوبی داشته و بر استافلوکوکوس اورئوس اپیدرمیدیس تأثیر یکسان داشته است. تأثیر آن کمتر از آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین و جنتامایسین بوده ولی در مقایسه با سفتازیدین اختلاف معنی‌دار نداشته است.

این تفاوت در ترکیب اجزای تشکیل‌دهنده می‌تواند ناشی از تفاوت‌های منشأ بذری و آب و هوایی مناطق باشد که بر میزان و نوع متابولیت ثانویه گیاهان اثر می‌گذارد (Hassiotis *et al*., 2010؛ Nikolic & Zlatkovic., 2010). در این تحقیق حساسیت بالاتر کاندیدا آلبیکنس به اسانس *T. pubescence* با نتایج Bergkvist (۲۰۰۷) و نیز یافته‌های Ayoola و همکاران (۲۰۰۸) و Singh و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد. بررسی های Bergkvist (۲۰۰۷) نشان‌دهنده حساسیت بالاتر این قارچ به اسانس آویشن و چند گونه دیگر بود. اثرات ضدمیکروبی اسانس‌ها بر مخمرها توسط Cavanagh (۲۰۰۷) به تفصیل مورد بحث قرار گرفته است. علت اینکه چگونه اسانس‌ها مانع از رشد مخمرها می‌شوند و چرا برخی از اسانس‌ها اثرات بازدارنده قویتری بر مخمرها در مقایسه با باکتری‌ها دارند دقیقاً مشخص نیست. اثر ضدمیکروبی اسانس

بـه شـکل مسـتقیم از طریـق جـذب بخـار اسـانس توسـط میکروارگانیسم و نیز به شکل غیرمستقیم از طریق محیط کشت که اسانس را جذب کرده‌است صورت می‌گیرد (Inouye *et al.*, 2000؛ Inouye *et al.*, 2001). از آنجایی که مخمرها عمدتاً در سطح محیط کشت رشد می‌کنند، بنابراین به اثر مسـتقیم بخـار حاصل از اسانس حسـاس‌تـر مـی‌باشـند، در حـالی کـه اثـر ضدمیکروبی بر علیه باکتری‌ها ممکن است وابسـته بـه تجمـع بخار اسانس درون محیط کشت باشد. مکانیسم اثر اسـانس‌هـا بر مخمرها دقیقاً معلوم نیست، اما در بیشتر گزارش‌ها این اثر به تغییرات مرفولوژیک نسبت داده می‌شود (Cavanagh, 2007). در مجموع نتایج این بررسی نشـان مـی‌دهـد کـه اسـانس *T. pubescence* می‌تواند در درمان بیماری‌های ناشی از کاندیـدا آلبیکنس مؤثر بوده و جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی محسوب شود.

براساس یافته‌های این تحقیق می‌توان گفت کـه بـذر بـا منشـأ اسـتان تهـران کمتـرین MIC و MBC و در نتیجـه بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را داشته است، بنـابراین بـرای انجام تحقیقات تکمیلی می‌تواند گزینه مناسبی باشد.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم مؤسسـه تحقیقـات جنگلهـا و مراتـع کشور و رئـیس بخـش تحقیقـات گیاهـان دارویـی جهـت امکانـاتی کـه در اختیـار مـا قـرار دادنـد صـمیمانه تشـکر می‌نماییم. از سرکار خانم دکتر جمزاد بـه خـاطر شناسـایی گونه‌ها و همکاران گروه شیمی به‌ویژه آقای مهندس نـادری برای تهیه طیف‌های GC بی‌نهایـت سپاسـگزاریم. در پایـان لازم می‌دانیم از کلیه همکارانی که ما را در اجرای این طرح یاری نمودند، تشکر نماییم.

منابع مورد استفاده

– جم‌زاد، ز.، ۱۳۸۸. آویشن‌ها و مرزه‌های ایران. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، ۱۷۱صفحه.

– رسولی، ب.، ۱۳۷۷. بررسی اثرات ضدمیکروبی آویشن و سنبله‌ای ارغوانی از تیره نعناع، سماق و بنه از تیره پسته به روش In vitro. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه.

– عسکری، ف.، سفیدکن، ف. و رضایی، م.ب.، ۱۳۸۱. بررسی تغییرات کیفی و کمّی اسانس *Thymus pubescens* Boiss. Et Kotschy ex Celark در چند نقطه رویشی دره لار. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۱۲: ۱۲۷–۸۷.

– عسکری، ف.، سفیدکن، ف. و میرزا، م.، ۱۳۸۲. مقایسه کمّی و کیفی اسانس *Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak در رویشگاههای مختلف استان تهران. فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۱۹(۲): ۱۳۶–۱۲۵.

- Adams, R.P., 1995. Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy. Academic Press, New York, 310p.
- Ayoola, G.A., Lawore, F.M., Adelowotan, T., Aibinu, I.E., Adenipekun, E., Coker, H.A.B. and Odugbem, T.O., 2008. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzigium aromaticum* (clove). African Journal of Microbiology Research, 2: 162-166.
- Bergkvist, T.P., 2007. Antimicrobial Activity of Four Volatile Essential Oils. Master thesis in Pharmacy Göteborg University British Pharmacopoeia, Distillation In: Appendix XI E. Volatile Oil in Drugs.
- Cavanagh, H.M.A., 2007. Antifungal activity of the volatile phase of essential oils: a brief review. Natural Product Communications, 2: 1-3.
- Davies, N.W., 1990. Gas chromatographic retention index of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and carbowax 20M phases. Journal of Chromatography A, 503: 1-24.
- Fan, M. and Chen, J., 2001. Studies on antimicrobial activity of extracts from thyme. Wei Sheng Wu Xue Bao, 41(4): 499-504.
- Mozaffarian, V., 1996. A Dictionary of Iranian Plant Names: Latin, English, Persian. Farhang Moaser Publisher, Tehran, Iran, 596p.
- Nikolic, G.S. and Zlatkovic, S.Z., 2010. Assaying the variation in secondary metabolites of St. John's wort for its better use as an antibiotic. Journal of Medicinal Plants Research, 4(3): 211-224.
- Hassiotis, C.N., Lazari D.M. and Vlachonasios K.E., 2010. The effects of habitat type and diurnal harvest on essential oil yield and composition of *Lavandula angustifolia* Mill. Fresenius Environmental Bullein, 19(8): 1491-1498.
- Inouye, S., Takizawa, T. and Yamaguchi, H., 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 47(5): 565-573.
- Inouye, S., Tsuruoka, T., Watanabe, M., Takeo, K., Akao, M., Nishiyama, Y. and Yamaguchi, H., 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. Mycoses, 43: 17-23.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z. and Naghdibadi, H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control, 18(2): 1518-1523.
- Pepeljnjak, S., Kosalec, I., Kalodera, Z. and Blazević, N., 2005. Antimicrobial activity of juniper berry

essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). Acta Pharmaceutica, 55(4): 417-422.
- Rustaiyan, A., Masoudi S., Monfared, A., Kamalinejad, M., Lajevardi, T., Sedaghat, S. and Yari, M., 2000. Volatile constituents of three *Thymus* species grown wild in Iran. Planta Medica, 66(2): 197-198.
- Sefidkon, F., Ghorbanli, M. and Askari, F., 2002. Essential oil composition of *Thymus pubescens* Boiss. et Kotschy ex Celak from Iran. Journal of Essential Oil Research, 14(2): 116-117.
- Shahnazi, S., Khalighi Sigaroudi, F., Ajani, Y., Yazdani, D., Ahvazi, M. and Taghizad Farid, R., 2007. Study on chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus trautvetteri* Klokov & Desj.-Shost. Journal of Medicinal Plants, 6(23): 80-88.
- Shibamoto, T., 1987. Retention indices in essential oil analysis: 259-274. In: Sandra, P. and Bicchi, C., (Eds.). Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. Huethig, New York, 435p.
- Singh, P., Mishra, G., Jha, K.K., Garg, V.K. and Khosa, R.L., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaves of *Vitex negundo* Linn. (Verbenaceae). International Journal of ChemTech Research, 2(3): 1686-1690.
- Sipailienee, A., Venskutonis, P.R., Baranauskiene, R. and Sarkinas, A., 2006. Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. Journal of Essential Oil Research, 18(6): 698-703.

Chemical composition and antimicrobial effects of the essential oil of *Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak from different localities

F. Askari[1*], E. Sharifi Ashorabadi[2], M. Mirza[2], M. Teimouri[2] and E. Ehsani[2]

1*- Corresponding author, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran, E-mail: fasgari@rifr-ac.ir
2- Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran

Received: July 2012 Revised: March 2013 Accepted: March 2013

Abstract

This research was aimed to investigate the effect of collection locality and essential oil concentration of *Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak on antimicrobial activity against some microorganisms. The statistical design used in this study was a factorial experiment in a completely randomized design with four replications. In this experiment, collection locality at six levels including the habitats of West Azarbaijan, Tehran, Zanjan, Qazvin, Kurdistan and Guilan, essential oil dilution at three levels including one fifth (1:5), one twenty-fifth (1:25), one fiftieth (1:50) and comparison with the antibiotics of ciprofloxacin and ceftizoxime, and studied microorganisms at five levels including *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeroginosa and Candida albicans* were investigated. The seeds were collected from different habitats and cultivated in the field of Research Institute of Forests and Rangelands. The essential oil was isolated from shoots by hydro-distillation. Chemical compositions of the oils were analyzed by GC and GC/MS. The essential oil yield obtained from different localities varied between 0.39% to 0.83% (w/w). The major constituents of the essential oil obtained from the samples collected from West Azarbaijan, Tehran, Zanjan, Qazvin, Kurdistan and Guilan were as follows: West Azarbaijan: E-caryophyllene (26.0%) and camphor (24.2%); Tehran: geranial (30.9%) and geranyl acetate (23.9%); Zanjan: linalool (23.5%) and 1,8-cineol (22.2%); Qazvin: thymol (30.3%) and carvacrol (30.1%); Kurdistan: linalool (17.2%) and geranyl acetate (12.7%), and Guilan: α–terpineol (31.2%) and geraniol (11.2%). Analysis of variance of inhibition zone diameter of *T. pubescence* essential oil showed significant difference ($p<0.05$) among collection locality, microorganism type, essential oil dilution and their interaction. Mean comparisons of the collection locality, microorganism type and essential oil dilution showed that the highest inhibition zone diameter (35.5mm) was recorded for the essential oil obtained from West Azarbaijan, ciprofloxacin against *Bacillus subtilis*. The lowest inhibition zone diameter (8.0 mm) was observed in the essential oil obtained from West Azerbaijan with essential oil dilution of 1:50 against *P. aeruginosa*. According to the MIC and MBC results, the most and the least antimicrobial activity was recorded for the essential oils obtained from the seeds collected from Tehran and Kurdistan, respectively.

Keywords: *Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak, antimicrobial activity, essential oils, thymol, carvacrol.