

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

فاطمه عسکری^{۱*}، ابراهیم شریفی عاشورآبادی^۲، مهدی میرزا^۳، مریم تیموری^۲ و المیرا احسانی^۴

*- نویسنده مسئول، مربی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، پست الکترونیک: fagari@riff-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 پذیرش: اسفند ۱۳۹۱

تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۱

چکیده

به منظور بررسی تأثیر محل جمع‌آوری گیاه آویشن (*Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak) و غلظت اسانس حاصل از آن بر اثرات ضد میکروبی بر علیه تعدادی از میکروارگانیسم‌ها، آزمایشی به صورت 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 سنتتیک سفتی‌زوکسیم و سیپروفلوکسازین و میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نیز در ۵ سطح شامل *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Candida albicans* بود. ابتدا بذرها را 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. به منظور 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-کاربوفیلین (۲۶٪) و کامفور (۲۴/۲٪)، اسانس تهران شامل ژرانیال (۳۰/۹٪) و ژرانیل استات (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 ژرانیل استات (۱۲/۷٪) و اسانس گیلان شامل آلفا-تریپتول (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 باسیلوس سوبتیلیس 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 به ترتیب بیشترین و کمترین اثر ضد میکروبی را داشت.

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

مقدمه

و غرب کشور دارد گیاه بوته‌ای و کوتاه *Thymus pubescens* است. این گونه در استان‌های گیلان، مازندران، آذربایجان، کردستان، کرمانشاه، لرستان، سمنان، خراسان و

جنس آویشن (*Thymus*) در نقاط مختلف ایران ۱۸ گونه دارد. یکی از گونه‌هایی که پراکندگی وسیعی در شمال

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 ۰/۲۰۳٪ 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، بورنتول، متیل کارواکرول، بتا-کاریوفیلن، ۸،۱-سینتول، لیمونن و ژرانیول بودند (عسکری و همکاران، ۱۳۸۲).

بررسی اثرات ضد میکروبی *T. kotschyanus* نشان‌دهنده اثرات ضد میکروبی بالا بر کلبسیلا پنومونیه بوده است. تأثیر اسانس بر استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس یکسان ولی کمتر از کلبسیلا پنومونیه بوده است (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٪)، بورنتول (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 بوده است. حساس‌ترین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با MIC برابر ۱۲۵ μg/ml بود.

در مطالعه‌ای که توسط Sipailiene و همکاران (۲۰۰۶)، بر روی اسانس صنعتی آویشن انجام شده است، اسانس اثرات ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر میکروارگانیسم‌های آزمایش شده یعنی اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوزنز، سیتروباکتر فروندی، هافنیا الویی، سالمونلا تیفی‌موریوم، باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، انتروباکتر ائروژنز، استافیلوکوکوس ارئوس و پروتوس ولگاریس داشته است. بنابراین به نظر می‌رسد میزان اثرات ضد میکروبی با مقدار تیمول و کارواکرول متناسب بوده است. بررسی عصاره آبی و اتانولی آویشن بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس اثرات ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای را نشان داد (Fan & Chen, 2001). Omidbeygi و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی اثرات

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 ضد میکروبی اسانس سرشاخه‌های گلدار *T. Pubescens* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف واقع در رویشگاه‌های آذربایجان غربی، 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 شده است (Rustaiyan et al., 2000). ترکیب در اسانس اندام‌های هوایی *T. pubescens* شناسایی شد. بیشترین ترکیب‌ها در مراحل قبل از گلدهی و گلدهی کامل به ترتیب 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 به ترتیب ۱/۲۳٪ و ۲/۰۳٪ گزارش کردند. به علاوه اینکه نتایج آنها نشان داد که کارواکرول (۵۴/۷٪ و ۶۹/۲٪)، پارا-سیمن (۶/۷٪ و ۹/۷٪) و بورنتول (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 قابل توجهی در بازده اسانس نقاط مختلف مشاهده نشد، در حالی که 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).

آن در ابتدای ستون برابر ۳ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع، 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 هلیوم، سرعت جریان گاز حامل ۳۵ ml/min و انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنج جرمی معادل ۷۰ الکترون ولت و برنامه حرارتی ۲۴۰-۶۰ با سرعت ۳°C/min و دمای محفظه تزریق ۲۲۰°C 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 کمی این ترکیب‌ها نیز با محاسبه سطوح زیر منحنی در کروماتوگرام‌ها محاسبه شد (Adams, 1995; Davis, 1990; Shibamoto, 1987).

آزمون‌های ضد میکروبی

اثرات ضد میکروبی اسانس با روش انتشار در آگار بر علیه باکتری‌های گرم مثبت (*Bacillus subtilis*) و گرم منفی (*Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*) و قارچ (*Candida albicans*) بررسی شد. باکتری‌های فوق از کلکسیون میکروبی مرکز پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شدند. به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس، کشت ۱۸ ساعته از باکتری‌ها و قارچ در محیط کشت تریپتوکسیس سوی آگار (ساخت شرکت مرک) تهیه شد. ۵۰۰ μl از کشت ۱۸ ساعته میکروارگانیزم‌ها با غلظت معادل شماره ۱ استاندارد مک‌فارلند (۱۰^۸ cfu/ml) در محیط کشت تریپتوکسیس سوی برات (ساخت شرکت مرک) به محیط کشت تریپتوکسیس سوی آگار اضافه و با سوپ استریل به شکل یکنواخت بر سطح محیط پخش شدند.

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

مواد و روشها

به منظور بررسی تأثیر محل جمع‌آوری گیاه آویشن (*Thymus pubescens*) و غلظت اسانس حاصل از آن بر اثرات ضد میکروبی بر علیه تعدادی از میکروارگانیزم‌ها، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. در این آزمایش، محل جمع‌آوری بذر در ۶ سطح شامل رویشگاه‌های آذربایجان غربی، تهران، زنجان، قزوین، کردستان و گیلان، رقت اسانس در ۳ سطح شامل یک پنجم، یک بیست و پنجم، یک پنجاهم و مقایسه آنها با آنتی‌بیوتیک‌های رایج مانند سفنی‌زوکسیم و سیپروفلوکسازین و میکروارگانیزم‌های مورد بررسی نیز در ۵ سطح شامل *Staphylococcus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli aureus* و *Candida albicans* بود. ویژگی مورد مطالعه شامل قطر هاله بازدارنده رشد میکروارگانیزم‌های 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 به وسیله دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شدند. برای تعیین مقدار کمی 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

اسانس‌های هر کدام از رویشگاه‌ها با استفاده از دی‌متیل سولفوکساید که فاقد اثر ضد میکروبی 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 سفتری‌زوکسیم (۳۰μg) برای مقایسه اثر ضد میکروبی اسانس‌ها استفاده شد. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 *microbroth 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

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

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

*: درصد رطوبت در زمان اسانس‌گیری محاسبه شده‌است.

ترکیب شناسایی شد. ۱۳ ترکیب در هر شش نمونه مشترک بود. در ترکیب‌های اصلی تنوع دیده می‌شود. بیشترین درصد ترکیب‌های اسانس نمونه آذربایجان غربی ترانس کاربوفیلین (۲۶٪) و کامفور (۲۴/۲٪) بودند. بیشترین

نتایج حاصل از شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس در جدول ۲ آمده‌است. در اسانس نمونه‌های آذربایجان غربی ۳۰ ترکیب، تهران ۲۸ ترکیب، زنجان ۲۳ ترکیب، قزوین ۲۷ ترکیب، کردستان ۳۰ ترکیب و گیلان ۳۲

زنجان در رقت یک پنجاهم اسانس (۹/۴ میلی متر) بود (جدول ۷).

مقایسه میانگین اثر متقابل منشأ بذره‌های *T. pubescence* و نوع میکروارگانیزم نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیزم مربوط به منشأ بذره‌های 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 میلی متر) بود (جدول ۷).

مقایسه میانگین اثر متقابل میکروارگانیزم و رقت اسانس مشخص نمود که بیشترین قطر هاله عدم رشد (۳۳/۴ میلی متر) مربوط به قارچ کاندیدا آلبیکنس و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا در رقت‌های یک پنجم، یک بیست و پنجم و یک پنجاهم (۹/۷، ۹/۳ و ۹ میلی متر) بود (جدول ۷).

مقایسه میانگین اثر متقابل محل جمع آوری، نوع میکروارگانیزم و رقت اسانس نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد، معادل ۳۵/۵ میلی متر مربوط به اسانس منشأ بذر آذربایجان غربی، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس و کمترین قطر هاله عدم رشد نیز معادل ۸ میلی متر مربوط به اسانس آذربایجان غربی 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 $\mu\text{g/ml}$) در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که اسانس با منشأ بذر تهران و بذر کردستان به ترتیب کمترین ($13/8 \mu\text{g/ml}$) و بیشترین ($475/0 \mu\text{g/ml}$) مقدار MIC را نشان داد. نتایج MBC نیز نشان داد که اسانس با منشأ بذر تهران و بذر کردستان به ترتیب کمترین ($13/8 \mu\text{g/ml}$) و بیشترین ($\geq 470 \mu\text{g/ml}$) 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 به ترتیب بیشترین و کمترین اثر ضد میکروبی را دارند.

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

بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر منشأ بذر، نوع میکروارگانیزم، رقت اسانس، اثر متقابل منشأ بذر و اسانس، اثر متقابل منشأ بذر و میکروارگانیزم، اثر متقابل میکروارگانیزم و اسانس و اثر سه‌گانه متقابل اسانس و منشأ بذر و میکروارگانیزم 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 آذربایجان غربی (۱۷/۵ میلی متر) بود. مقایسه میانگین تیمار رقت اسانس و آنتی‌بیوتیک نشان داد که بیشترین قطر هاله مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین (۲۹/۸ میلی متر) و کمترین قطر هاله مربوط به رقت یک پنجاهم اسانس (۱۰/۵ میلی متر) بود. همچنین مقایسه میانگین تیمار میکروارگانیزم‌ها نشان داد که بیشترین قطر هاله مربوط به قارچ کاندیدا آلبیکنس (۲۱/۷ میلی متر) و کمترین قطر هاله مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا (۱۳/۶ میلی متر) بود.

مقایسه میانگین اثر متقابل منشأ بذر و رقت اسانس نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیزم مربوط به منشأ بذره‌های آذربایجان غربی و تهران و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین به ترتیب معادل ۳۱/۳، ۳۱/۵ میلی متر و کمترین قطر هاله مربوط به منشأ بذر

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

گیلان (۱۱۰۶)	کردستان (۱۱۴۶)	قزوین (۱۱۱۸)	زنجان (۱۱۵۳)	تهران (۱۱۵۵)	آذربایجان غربی (کد ۱۱۱۹)	شاخص کواتس	نام ترکیب‌ها
-	۸/۴	۰/۴	۰/۲	۰/۴	-	۹۳۱	α -thujene
۱/۴	۱/۹	۳/۸	۱/۱	۰/۷	۰/۷	۹۴۰	α -pinene
۰/۹	۲/۹	۱/۴	۱/۳	۰/۷	۰/۹	۹۵۴	camphene
۰/۴	۰/۵	۰/۴	۰/۸	-	۰/۲	۹۷۶	sabinene
۰/۲	۰/۷	۰/۶	۱/۱	۰/۳	۰/۳	۹۸۲	β -pinene
۰/۸	۰/۸	۰/۶	۰/۶	۰/۳	۰/۵	۹۹۳	myrcene
-	۰/۳	۰/۳	۲/۵	۰/۳	-	۱۰۲۰	α -terpinen
۰/۵	۷/۲	۳/۴	۵/۷	۴/۱	۰/۵	۱۰۲۸	p-cymene
۱/۰	۱/۲	۰/۹	-	۰/۳	۰/۲	۱۰۳۳	limonene
۲/۵	۱۰/۴	۴/۹	۲۲/۲	۲/۹	۵/۴	۱۰۳۵	1,8-cineole
۲/۵	۰/۲	۰/۹	۳/۷	-	۰/۴	۱۰۵۱	E- β -ocimene
۰/۲	۰/۷	۰/۷	۰/۹	۰/۸	۳/۴	۱۰۶۵	γ -terpinene
۰/۱	۰/۳	۰/۶	۰/۸	-	۰/۲	۱۰۷۰	cis-sabinene hydrate
-	۰/۳	-	-	-	۰/۴	۱۰۷۶	cis-linalool oxide
۶/۲	۱۷/۲	۴/۱	۲۳/۵	۷/۹	۰/۶	۱۱۰۰	linalool
۱/۵	۲/۱	۱/۲	۲/۲	۰/۸	۲۴/۲	۱۱۴۵	camphor
۲/۵	۳/۹	۲/۹	۳/۷	۱/۸	۱/۵	۱۱۶۷	borneol
۰/۳	۰/۵	۰/۴	۱/۵	۰/۴	۱/۵	۱۱۷۸	terpinene-4-ol
۳۱/۲	۱/۷	۵/۲	-	-	۰/۳	۱۱۹۰	α -terpineol
۱/۵	-	-	-	۰/۴	-	۱۲۲۹	nerol
۱/۸	۰/۲	-	-	۰/۵	۲/۰	۱۲۴۱	neral
-	۱/۳	۱/۴	۰/۶	۰/۳	-	۱۲۴۵	methyl carvacrol
۱۱/۲	۰/۸	۱/۶	-	۰/۶	۱/۰	۱۲۵۷	geraniol
۲/۰	۰/۳	-	-	۳۰/۹	۱۶/۷	۱۲۷۱	geranial
۴/۰	۳/۱	-	۰/۶	-	۱/۵	۱۲۸۷	bornyl acetate
۴/۶	۸/۹	۳۰/۳	۱۰/۶	۰/۳	۰/۶	۱۲۹۳	thymol
۵/۸	۰/۴	۳۰/۲	۴/۶	۱۲/۹	-	۱۳۰۰	carvacrol
۵/۶	۱۷/۶	-	-	-	-	۱۳۵۳	α -terpinyl acetate
۲/۳	۱۲/۷	۰/۸	-	۲۳/۹	۱/۰	۱۳۸۶	geranyl acetate
۴/۶	۰/۵	۱/۳	۱۱/۱	۳/۱	۲۶/۰	۱۴۲۰	E-caryophyllene
۰/۷	-	۰/۳	-	۲/۶	۲/۵	۱۴۸۲	germacrene d
۱/۳	-	-	-	۰/۴	۱/۰	۱۴۹۶	bicyclgermacrene
۰/۴	-	۰/۷	-	۰/۳	۰/۷	۱۵۱۲	β -bisabolene

ادامه جدول ۲-

گیلان (۱۱۰۶)	کردستان (۱۱۴۶)	قزوین (۱۱۱۸)	زنجان (۱۱۵۳)	تهران (۱۱۵۵)	آذربایجان غربی (کد ۱۱۱۹)	شاخص کواتس	نام ترکیب‌ها
-	-	۰/۸	-	-	-	۱۵۱۴	δ -cadinene
۰/۳	-	-	-	-	۰/۵	۱۵۴۷	cissisquisabinene hydrate
۰/۲	-	-	-	-	۰/۶	۱۵۷۸	spathulenol
۱/۲	-	-	-	-	۱/۹	۱۵۸۳	caryophyllene oxide
-	-	-	-	۰/۲	-	-	3-octanone
-	-	-	-	۰/۴	-	-	3-octanol
-	۰/۳	-	-	-	-	-	trans linalool oxide
-	-	-	۷/۸	-	-	-	E-nerolidol
-	-	-	۰/۸	-	-	-	Z- β -ocimene
۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۹۷/۸	۹۷/۹	۹۷/۲	-	Total

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

MIC (mg/ml)					
تهران (۱۱۵۵)	زنجان (۱۱۵۳)	گیلان (۱۱۰۶)	قزوین (۱۱۱۸)	کردستان (۱۱۴۶)	
$\leq 13/75$	۱۹۵/۰	۳۱/۲۵	۷۵	$\geq 470/0$	<i>Escherchia coli</i>
$\leq 13/75$	۴۸/۷۵	۲۵۰	۳۷/۵	۵۸/۷۵	<i>Staphylococcus aureus</i>
۲۷/۵	$\geq 390/0$	≤ 500	≤ 600	$\geq 470/0$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
$\leq 13/75$	$\geq 390/0$	۳۱/۲۵	۳۷/۵	$\geq 470/0$	<i>Candida albicans</i>
$\leq 13/75$	۴۸/۷۵	۳۱/۲۵	۷۵	$\geq 470/0$	<i>Bacillus subtilis</i>

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

MBC (mg/ml)					
تهران (۱۱۵۵)	زنجان (۱۱۵۳)	گیلان (۱۱۰۶)	قزوین (۱۱۱۸)	کردستان (۱۱۴۶)	
$\leq 13/75$	۱۹۵/۰	۳۱/۲۵	۷۵	$\geq 470/0$	<i>Escherchia coli</i>
$\leq 13/75$	۹۷/۵	۵۰۰	۷۵	۱۱۷/۵	<i>Staphylococcus aureus</i>
۲۷/۵	$\geq 390/0$	≤ 500	≤ 600	$\geq 470/0$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
$\leq 13/75$	$\geq 390/0$	۶۲/۵	۳۷/۵	$\geq 470/0$	<i>Candida albicans</i>
$\leq 13/75$	۴۸/۷۵	۶۲/۵	۱۵۰	$\geq 470/0$	<i>Bacillus subtilis</i>

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	
آذربایجان غربی	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	
<i>Escherchia coli</i>	۱۸/۸ c
<i>Staphylococcus aureus</i>	۱۸/۱ b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	۱۳/۶ e
<i>Candida albicans</i>	۲۱/۷ a
<i>Bacillus subtilis</i>	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 میکروارگانیزم (ب) و اثر متقابل نوع میکروارگانیزم و رقت اسانس آویشن بر قطر هاله عدم رشد میکروارگانیزم با استفاده از آزمون LSD، در سطح ۵٪ (ج)

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

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

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

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

ادامه جدول ۸-

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

ادامه جدول ۸-

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

بحث

نمونه استان‌های آذربایجان غربی و زنجان (۲۶/۰٪، ۱۱/۱٪) بودند. این ترکیب‌ها در تحقیقات سایر محققان نیز گزارش شده است (Rustaiyan et al., 2000؛ Sefidkon et al., 2002؛ عسکری و همکاران، ۱۳۸۱).

رسولی (۱۳۷۷) نشان داد که اسانس *Th. kotschyanus* بر کلبسیلاپنومونیه اثر ضد میکروبی خوبی داشته و بر استافلوکوکوس اورثوس اپیدرمیدیس تأثیر یکسان داشته است. تأثیر آن کمتر از آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین و جنتامایسین بوده ولی در مقایسه با سفنازیدین 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 آلیکنس به اسانس *T. pubescence* با نتایج Bergkvist (۲۰۰۷) و نیز یافته‌های Ayoola و همکاران (۲۰۰۸) و Singh و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد. بررسی‌های Bergkvist (۲۰۰۷) نشان‌دهنده حساسیت بالاتر این قارچ به اسانس آویشن و چند گونه دیگر بود. اثرات ضد میکروبی 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 ضد میکروبی اسانس

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 ۰/۴۰٪ تا ۰/۲۰۳٪ گزارش شده بود (عسکری و همکاران، ۱۳۸۲).

در این تحقیق ترکیب‌های 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 استان‌های تهران، زنجان و کردستان (۷/۹٪، ۲۳/۵٪ و ۱۷/۲٪)، کامفور در اسانس نمونه استان آذربایجان غربی (۲۴/۲٪)، آلفا-تریپینئول در اسانس نمونه استان گیلان (۳۱/۲٪)، ژرانیل 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 استان‌های تهران و قزوین (۱۲/۱٪ و ۳۰/۲٪)، آلفا-تریپینیل‌استات در اسانس نمونه استان کردستان (۱۷/۶٪)، ژرانیل‌استات در اسانس نمونه استان‌های تهران و کردستان (۲۳/۹٪ و ۱۲/۷٪)، ترانس کاربوفیلین در اسانس

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 کمی 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 *Syzygium 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 Vlachonasis K.E., 2010. The effects of habitat type and diurnal harvest on essential oil yield and composition of *Lavandula angustifolia* Mill. Fresenius Environmental Bulletin, 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

به شکل مستقیم از طریق جذب بخار اسانس توسط میکروارگانیسم و نیز به شکل غیرمستقیم از طریق محیط کشت که اسانس را جذب کرده است صورت می‌گیرد (Inouye et al., 2000؛ 2001). از آنجایی که مخمرها عمدتاً در سطح محیط کشت رشد می‌کنند، بنابراین به اثر مستقیم بخار حاصل از اسانس حساس‌تر می‌باشند، در حالی که اثر ضد میکروبی بر علیه باکتری‌ها ممکن است وابسته به تجمع بخار اسانس درون محیط کشت باشد. مکانیسم اثر اسانس‌ها بر مخمرها دقیقاً معلوم نیست، اما در بیشتر گزارش‌ها این اثر به تغییرات مرفولوژیک نسبت داده می‌شود (Cavanagh, 2007). در مجموع نتایج این بررسی نشان می‌دهد که اسانس *T. pubescens* می‌تواند در درمان بیماری‌های ناشی از کاندیدا آلبیکنس مؤثر بوده و جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی محسوب شود.

بر اساس یافته‌های این تحقیق می‌توان گفت که بذر با منشأ استان تهران کمترین MIC و MBC و در نتیجه بیشترین فعالیت ضد میکروبی را داشته است، بنابراین برای انجام تحقیقات تکمیلی می‌تواند گزینه مناسبی باشد.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور و رئیس بخش تحقیقات گیاهان دارویی جهت امکاناتی که در اختیار ما قرار دادند صمیمانه تشکر می‌نماییم. از سرکار خانم دکتر جمزاد به خاطر شناسایی گونه‌ها و همکاران گروه شیمی به ویژه آقای مهندس نادری برای تهیه طیف‌های GC بی‌نهایت سپاسگزاریم. در پایان 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، ۱۷۱ صفحه.
- رسولی، ب.، ۱۳۷۷. بررسی اثرات ضد میکروبی 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 کمی اسانس *Thymus pubescens* Boiss. Et Kotschy

- 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.
 - Sipailiene, 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.
 - 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*

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

F. Askari^{1*}, E. Sharifi Ashorabadi², M. Mirza², M. Teimouri² and E. Ehsani²

1*- Corresponding author, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran, E-mail: faskari@rifir-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 aeruginosa* 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.