

بررسی فیتوشیمیایی و آنتی کاندیدیایی اسانس گیاه *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas.

در مراحل مختلف رشد گیاه در استان لرستان

عبدالناصر محمدی*¹، حمزه امیری²، حامد خدایاری¹، علی زارعی³، داریوش اقبالی³، فریده آذربانی¹

¹استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

²دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

³کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: 93/10/17 ؛ تاریخ پذیرش: 94/2/21

چکیده

در این مطالعه ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas و خواص ضد قارچی آن علیه گونه‌های *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. krosei* مورد بررسی قرار گرفت. گیاه مورد نظر در سه مرحله نموی از فروردین تا تیرماه سال 1391، از منطقه جغرافیایی دره سید واقع در روستای چمشک جنوب خرم‌آباد (استان لرستان) جمع‌آوری و اسانس آن به روش تقطیر با آب با دستگاه کلونجر استخراج گردید. ترکیبات موجود در اسانس در مرحله گلدهی به وسیله کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) شناسایی و خواص ضد قارچی اسانس در سه مرحله نموی با استفاده از روش میکروداپلوشن، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) تعیین گردید. نتایج نشان داد که در مرحله گلدهی، مهمترین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه شامل: تیمول (42/6 درصد) و کارواکرول (32/33 درصد) بوده که MIC و MFC آن برای گونه‌های *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. krosei* به ترتیب 0/125 تا 0/25 و 0/25 تا 0/5 میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. از آنجایی که اسانس گیاه در هر سه مرحله، علیه هر 3 گونه از *Candida*، اثر بازدارندگی خوبی از خود نشان داد، لذا می‌توان از آن به عنوان یک اسانس موثر علیه این گروه از قارچ‌ها استفاده کرد و با مطالعات بیشتر جایگزین داروهای ضد قارچی شیمیایی نمود.

واژه‌های کلیدی: آویشن، *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas، آنتی کاندیدیازیس، اسانس، استان لرستان

عفونت‌های کانیدیازیس می‌باشد (Douglas, 2003; Edwards, 1995). *Candida albicans* چهارمین عاملی است که از عفونت‌های خونی بیماران بستری در بیمارستان جدا می‌شود (Eggimann et al., 2003) و به‌عنوان یک مخمر فرصت طلب در افراد مستعد از قبیل مبتلایان به ایدز، دیابت، مصرف‌کنندگان آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و افرادی که پیوند عضو دریافت نموده‌اند ایجاد عفونت می‌کند و گاهی با سپتی سمی‌های کشنده همراه است (Menon, 2001). در خانم‌ها یکی از عوامل مهم واژینیت‌های قارچی است که با داروهای فعلی ریشه کن نمی‌شود (Avijgan et al., 2006). امروزه در درمان عفونت‌های کانیدیایی از داروهای مختلف از قبیل داروهای گروه آزول (فلوکونازول)، داروهای پل ان (نیستاتین) و اکینوکاندین (کاسپوفانژین) استفاده می‌شود. اما بررسی‌ها نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف *Candida* نسبت به داروهای ضدقارچی از خود مقاومت نشان داده و داروهایی مانند فلوکونازول که کاربرد وسیعی در درمان عفونت‌های قارچی به صورت جلدی و خوراکی دارد، دارای اثر سمی و عوارض جانبی زیادی می‌باشد (Gualco et al., 2007; Saag et al., 2000; He et al., 1994; Fan-Havard et al., 1991; Boken et al., 1993; White et al., 1994; Troillet et al., 1993).

بنابراین نیاز به عوامل ضدقارچی جدیدی می‌باشد که دارای کمترین اثرات سیتوتوکسیسیته و عوارض جانبی باشند که این عوامل عمدتاً از اسانس و عصاره گیاهان به‌دست می‌آیند. این عوامل دارای فعالیت بیولوژیکی ضدقارچی و ضدباکتریایی در *in vitro* و *in vivo* بوده که ناشی از ترکیبات فنلیک و ترپنوئید می‌باشد و توجه محققین و پژوهشگران را به خود جلب نموده‌اند و به نظر می‌رسد که محل اثر اسانس‌های این گیاهان محل‌های هدف جدیدی غیر از محل هدف داروهای فعلی باشد که قارچ‌ها نسبت

جنس آویشن (*Thymus L.*) متعلق به تیره نعناع Lamiaceae از مشهورترین گیاهان اسانس‌دار است. گونه *Thymus eriocalyx* در استان‌های کردستان، کرمانشاه، مرکزی، همدان و لرستان می‌روید و در خارج از ایران در شمال کشور عراق نیز گزارش شده است (Kalvandi, 2012). مطالعات فیتوشیمیایی نشان می‌دهد که تمام گونه‌های آویشن غنی از ترکیبات فرار روغنی و ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول می‌باشند. در مطالعه‌ای که در سال 2004 توسط رسولیان و همکاران انجام شد، مهم‌ترین ترکیب جدا شده از آنالیز اسانس گیاه *Thymus eriocalyx* شامل تیمول بود که 64/3 درصد کل ترکیبات را تشکیل داد (Rasooli et al., 2011). سفیدکن و عسگری از آنالیز اسانس آویشن کوهی 25 ترکیب جدا کردند که کارواکرول 41/4 درصد و تیمول 19/5 درصد ترکیبات را تشکیل دادند (Sefidkon et al., 2002). در بررسی دیگری که در ترکیه بر روی آنالیز اسانس گونه‌های آویشن انجام شد، تیمول بیشترین ترکیب اسانس این گیاهان را تشکیل داد (Azaz et al., 2004). از طرفی از اسانس این گیاهان برای دردهای روماتیسمی، گزش حشرات، کشیدگی عضلات، سرفه‌های مزمن و ناراحتی‌های ریوی، سردی معده و روده و شکم استفاده می‌شود و خاصیت ضد باکتریایی و ضدقارچی دارند (Sefidkon, 2002). اسانس‌ها و ترکیبات تشکیل‌دهنده این گیاهان فعالیت‌های ضدقارچی موثری را در شرایط *In vitro* و *In vivo* از خود نشان داده و به‌طور وسیعی علیه گونه‌های کانیدها، اسپرژیلوس و تریکوفیتون استفاده شده‌اند (Mota, 2012). کانیدیازیس یک عفونت قارچی ناشی از گونه‌های کانیدها می‌باشد، در سال‌های اخیر به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. *Candida albicans* شایع‌ترین عامل بوده و مسئول بیش از 90 درصد

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 و یکسان به دستگاه تزریق شد تا نوع ترکیبات تشکیل دهنده آن‌ها مشخص شود. دستگاه GC از مدل Agilent 6890 و دستگاه MS از مدل Agilent 5973 با ستونی به طول 30 متر، قطر داخلی 0/25 میلی‌متر و ضخامت لایه 0/25 میکرومتر از نوع HP-5MS بود. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون 70 الکترون‌ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون 220 درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری 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 اثر ضد قارچی: به منظور تعیین حساسیت عوامل قارچی نسبت به اسانس گیاه از مخمرهای بیماریزای *Candida albicans* سوش استاندارد PTCC:5027، *Candida glabrata* سوش استاندارد PTCC: 5297 و *Candida kruzei* سوش استاندارد PTCC: 5295 استفاده گردید.

رقت سازی: مقدار 128 میکرولیتر از اسانس گیاه *Thymus eriocalyx* در یک میلی‌لیتر حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید به مدت 30 دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا استوک استریل اسانس تهیه شد. سپس رقت‌های متوالی از استوک (0/5، 1، 2، 4، 8، 16، 32، 64، 128، 256) 0/25، 0/125، 0/06 و 0/03 میکرولیتر در میلی-

به آنها مقاوم شده‌اند به این ترتیب می‌توان از بروز مقاومت‌های دارویی جدید جلوگیری نمود (Bonjar, 2004; Li et al., 2005; Conner, 1993).

مطالعه حاضر با هدف شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده و بررسی اثرات ضد قارچی اسانس *Thymus eriocalyx* علیه گونه‌های مخمری شامل *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. krosei* به روش دیسک دیفیوژن و میکرودايلوشن صورت گرفت. به دنبال آن حداقل غلظت مهارکننده قارچ (MIC)¹ و حداقل غلظت کشنده قارچ (MFC)² اسانس گیاه علیه گونه‌های *Candida* به روش میکرودايلوشن و (NCCLS SM27-A) تعیین گردید (NCCLS document, 2002).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه گیاه: گونه *Thymus eriocalyx* از منطقه جغرافیایی دره سید واقع در روستای چمشک جنوب خرم‌آباد از فروردین تا تیرماه سال 1391 در مراحل مختلف رویشی قبل از گلدهی، زمان گلدهی و بعد از گلدهی جمع‌آوری و مورد شناسایی قرار گرفت. بعد از شناسایی، اقدامات بعدی شامل خشک کردن و آماده‌کردن نمونه‌ها جهت 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 100 گرم از تمام بخش‌های گیاه (گل، ساقه و برگ) خشک و پاک شده را به استفاده از آسیاب برقی خرد و گیاه پودر شده را به داخل بالن ژوژه دستگاه اسانس‌گیری (کلونجر مدل دارونامه بریتانیا) ریخته و به آن 700 میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جریان آب سرد مبرد برقرار و بالن

1-Minimum Inhibition Concentration
2-Minimum fungicidal Concentration

اسپور قارچ بود. از غلظت‌های مختلف فلوکونازول نیز به‌عنوان شاهد ضد قارچ استفاده شد. در مرحله آخر پلیت‌ها به مدت 48 ساعت در حرارت 30 درجه قرار داده شدند، با بررسی گوده‌ها و ایجاد و یا عدم ایجاد کدورت و با کشت گوده‌ها بروی محیط کشت سابورودکستروز آگار نسبت به تعیین MIC و MFC قارچ‌ها اقدام گردید. با توجه به کدورت ایجاد شده در اثر رشد میکروارگانیسم در گوده‌های میکروپلیت و انتقال 50 میکرولیتر از محتوای گوده‌ها به سابورودکستروز آگار مقدار MIC تعیین شد به طوری که گوده قبل از اولین گوده‌ای که کدورت در آن مشاهده گردید به عنوان MIC در نظر گرفته شد. آخرین گوده‌ای که با انتقال 50 میکرولیتر از محتویات گوده فاقد کدورت در محیط سابورودکستروز آگار هیچ گونه کلنی مخمری در آن رشد نکرد به عنوان MFC (حداقل غلظتی که سبب مرگ قارچ می‌شود) در نظر گرفته شد (NCCL document, 2002).

آنالیز آماری: پس از گردآوری اطلاعات بر پایه اصول آماری، جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسانس بر روی گونه‌های *Candida* از تکنیک‌های آماری شامل آزمون آنالیز واریانس ANOVA (با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16) و تست دنت (Dunnett) استفاده شد که در قالب یک طرح کاملاً تصادفی اختلاف میانگین اسانس‌ها محاسبه گردید.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز و اثرات ضد قارچی اسانس *Thymus eriocalyx* بروی گونه‌های کاندیدا: آنالیز *Th. eriocalyx* در مرحله گلدهی باعث شناسایی 36 ترکیب شده که مهمترین آنها شامل تیمول (42/6 درصد)، کارواکول (32/33 درصد) و سیمول (4/04 درصد) بود که در مجموع 78/98 درصد کل ترکیبات را تشکیل دادند (جدول 1). اثرات

(لیتر) تهیه گردید و دیسک‌های بلانک استریل با قطر 6/4 میلی‌متر را با 30 میکرولیتر از غلظت تهیه شده از اسانس آغشته و خشک شدند.

روش دیسک دیفیوژن: در روش دیسک دیفیوژن ابتدا قارچ‌ها بروی محیط سابورودکستروز آگار کشت داده و به مدت 48 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سوسپانسیون اسپور قارچی تهیه گردید، این سوسپانسیون از رشد کشت‌های 24 تا 48 ساعت اسپور مخمرها در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. سپس عناصر قارچی با استفاده از لام نئوبار شمارش و غلظتی معادل $10^3 \times 1/5$ اسپور در میلی‌لیتر به دست آمد. اسپورهای قارچ با سواپ استریل بروی محیط کشت سابورو دکستروز آگار پخش شد. دیسک‌های آغشته به اسانس گیاهان بروی محیط کشت داخل پلیت قرار داده شد، دیسک آغشته به فلوکونازول نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. پلیت‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و با اندازه‌گیری قطر هاله ایجاد شده به تفسیر نتایج آزمایش اقدام گردید (NCCLS document, 2002).

روش میکرودیلوژن: در روش میکرودیلوژن که از میکروپلیت‌های 96 خانه‌ای استفاده شد، مقدار 100 میکرولیتر محیط سابورودکستروز برات به گوده‌های ردیف افقی اضافه شد، سپس به گوده اول هر ردیف افقی 100 میکرولیتر اسانس که در حلال دی‌متیل سولفوکساید حل شده بود، اضافه و با انتقال به گوده‌های بعدی رقت‌های متوالی از اسانس تهیه گردید، پس از آن از سوسپانسیون سلولی که حاوی $1/5 \times 10^3$ اسپور در هر میلی‌لیتر بود به گوده‌ها تلقیح شد. دو ردیف آخر میکروپلیت مربوط به شاهد مثبت و منفی بود. شاهد مثبت حاوی محیط کشت، حلال دی‌متیل سولفوکساید و اسپور قارچ، شاهد منفی حاوی محیط کشت و حلال دی‌متیل سولفوکساید بدون

میکروداپلوشن بر رشد سه گونه کاندیدا نشان داد که اسانس این گیاه قادر به مهار رشد تا غلظت 0/125 میکروگرم در میلی لیتر می باشد. MIC اسانس این گیاه به ترتیب برای گونه های *Candida albicans*، *C. glabrata* و *C. Krusei* 0/25، 0/25، 0/125 و MFC 0/25، 0/5، 0/5 میکروگرم در میلی لیتر تعیین گردید (جدول 2).

ضدقارچی اسانس به دست آمده از گونه *Th. eriocalyx* با روش دیسک دیفیوژن نشان داد که اسانس این گیاه بر روی گونه های *Candida albicans*، *glabrata* و *C. krusei* به ترتیب تا غلظت های 16، 32 و 32 میکروگرم در میلی لیتر اثر مهاری خوبی دارد. بررسی اثرات غلظت های مختلف گیاه در محدوده 128-0/03 میکروگرم در میلی لیتر با استفاده از روش

جدول 1- معرفی ترکیب های شیمیایی اسانس گونه *Thymus eriocalyx* در مرحله گلدهی

ردیف	نام ترکیب	RI	درصد
1	tricyclene	909	0.01
2	α -thujene	916	0.92
3	α -pinene	926	0.45
4	comphene	961	0.23
5	sabinene	970	0.11
6	β -pinene	967	0.14
7	3-octanone	980	0.63
8	1-octen-3-ol	977	0.07
9	β -myrcene	992	1.19
10	3-Octanol	988	0.05
11	Phellandrene	1000	0.17
12	α -terpinene	1023	1.22
13	cymol		3.26
14	1.8-cineole	1009	0.60
15	limonene	1025	0.18
16	β -ocimene Y	1039	0.06
17	γ -terpinene	1026	10.86
18	cis-sabinene hydrate	1069	0.31
19	3-nonanone	903	0.04
20	α -terpinolene	1089	0.07
21	cis- β -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

ادامه جدول 1-

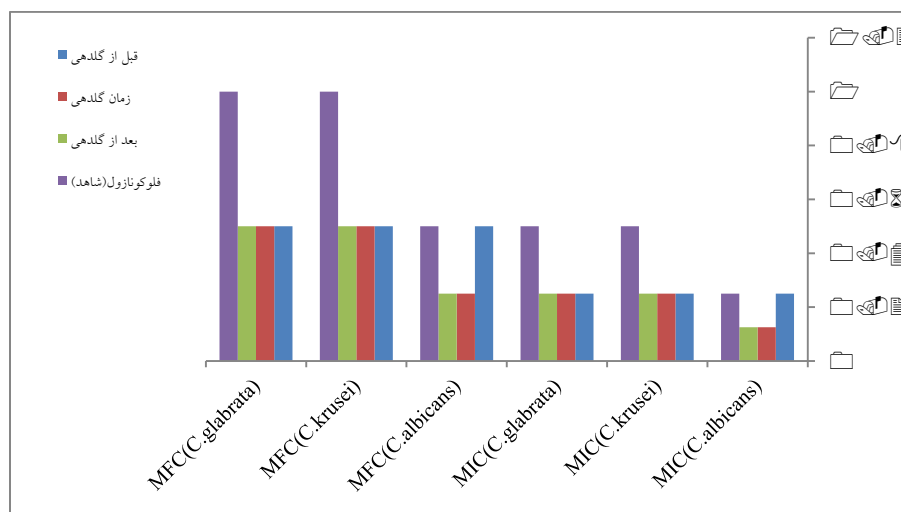
0.02	1351	eugenol	30
0.11	1358	carvacryl acetate	31
0.01	1368	α -Ylagine	32
0.03	1382	β -Bourbonene	33
1.83	1414	trans-Caryophyllene	34
0.07	1414	α -caryophyllene	35
0.42	1479	germacrene D	36
0.26	1492	bicyclogermacrene	38
0.64	1511	β -Bisabolene	39
0.05	1526	delta-Cadinene	40
0.73	1517	cis-alpha-Bisabolene	41
0.01	1360	neryl acetate	42
0.19	1589	spathulene	43
0.20	596	caryophyllene Oxide	44
0.04	1785	farnesol	45

جدول 2- نتایج حاصل از آنالیز واریانس اثرات ضدقارچی اسانس *Thymus eriocalyx* بر روی گونه‌های کاندیدا

میانگین MFC	میانگین MIC	محدوده غلظت (میکروگرم / میلی لیتر)	اسانس	گونه قارچی
0/5 ± 0/05	0/25 ± 0/01 ^A	64 - 0/03	قبل از گلدهی	<i>Candida albicans</i>
0/25 ± 0/01	0/125 ± 0/005 ^B	64 - 0/03	زمان گلدهی	
0/25 ± 0/01	0/125 ± 0/005 ^B	64 - 0/03	بعد از گلدهی	
0/5 ± 0/05	0/25 ± 0/01 ^A	64 - 0/03	فلوکونازول (شاهد)	<i>Candida krusei</i>
0/5 ± 0/05	0/25 ± 0/01 ^B	64 - 0/03	قبل از گلدهی	
0/5 ± 0/05	0/25 ± 0/01 ^B	64 - 0/03	زمان گلدهی	
0/5 ± 0/05	0/25 ± 0/01 ^B	64 - 0/03	بعد از گلدهی	<i>Candida glabrata</i>
1 ± 0/1	0/5 ± 0/05 ^A	64 - 0/03	فلوکونازول (شاهد)	
0/5 ± 0/05	0/25 ± 0/01 ^B	64 - 0/03	قبل از گلدهی	
0/5 ± 0/05	0/25 ± 0/01 ^B	64 - 0/03	زمان گلدهی	<i>Candida glabrata</i>
0/5 ± 0/05	0/25 ± 0/01 ^B	64 - 0/03	بعد از گلدهی	
1 ± 0/1	0/5 ± 0/05 ^A	64 - 0/03	فلوکونازول (شاهد)	

از گلدهی در مقایسه با شاهد بر روی سه گونه *Candida* با هم مقایسه گردید. بیشترین میزان MIC و MFC مربوط به *Candida albicans* بوده از طرفی اسانس این گیاه در زمان گلدهی و بعد از گلدهی بیشترین اثر ضد قارچی را بر روی گونه‌های *Candida* داشته است (شکل 1).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول 1 نشان داد که بین میانگین MIC و MFC اسانس *Thymus eriocalyx* در غلظت‌های مختلف بر روی گونه‌های *Candida* در مقایسه با شاهد فلوکونازول در سطح احتمال 0/001 تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/001$). میانگین غلظت اسانس *Thymus eriocalyx* در مراحل قبل گلدهی، زمان گلدهی، بعد



شکل 1- مقایسه میانگین MIC و MFC اسانس *Thymus eriocalyx* در مراحل مختلف بروی گونه‌های کاندیدا

بحث

گذشته و مطالعه ما نشان می‌دهد تیمول و کارواکرول در گیاه *Thymus eriocalyx* مهم‌ترین و فراوانترین ترکیبات شیمیایی می‌باشند (Salguero *et al.*, 1997a; Azaz *et al.*, 2004; Habibi *et al.*, 2006; Rustaiyan *et al.*, 2002). کارواکرول و تیمول دارای طیف وسیعی از اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی بوده، این مواد فعالیت ATPase را مهار کرده و نفوذپذیری غیراختصاصی غشای سلول قارچی را افزایش می‌دهند. علاوه بر این کارواکرول با افزایش نفوذپذیری غشاء، قارچ‌ها را نسبت به سایر مواد ضدقارچی حساس و آسیب‌پذیر می‌سازد (Helander *et al.*, 1998). براساس نتایج حاصل از بررسی‌های ضد قارچی، تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس *Thymus eriocalyx* در مراحل مختلف رویش بر میزان رشد گونه‌های *Candida* در این مطالعه از نظر آماری (آنالیز واریانس) معنی‌دار ($P < 0/0001$) بود که بیانگر این مطلب است که با افزایش غلظت اسانس، میزان رشد گونه‌های کاندیدای مورد مطالعه کاهش می‌یابد (جدول 1). مطالعاتی که در گذشته بر روی اسانس بدست آمده از گونه‌های آویشن انجام شده، فعالیت‌های ضد قارچی وسیع این گیاهان را نشان

افزایش عفونت‌های قارچی ناشی از قارچ‌های بیماری‌زا و فرصت‌طلب، به ویژه در بیماران با ضعف سیستم ایمنی از اوایل دهه 90، به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر به خصوص در بیماران بستری در بیمارستان مطرح شده است. پاتوژن‌های فرصت‌طلب مهم مانند *Candida albicans* در این میان نقش بسزایی دارند (Kantarcioglu & Yucel, 2002). اما سایر گونه‌های *Candida* نیز در بیماران با نقص سیستم ایمنی مانند بیماران مبتلا به ایدز، سرطان و بیماران پیوندی باعث ایجاد عفونت‌های سیستمیک می‌شوند و گونه‌های *Candida* به‌عنوان چهارمین عامل عفونت‌های خونی بیماران بستری در بیمارستان مطرح شده‌اند که مسؤول تقریباً 40 درصد موارد مرگ و میر می‌باشند (Anaissie *et al.*, 2003).

در مطالعه حاضر تاثیر مهاری اسانس *eriocalyx* در سه مرحله نموی علیه گونه‌های *Candida* *Th.* *C. glabrata* *C. krusei* مورد بررسی قرار گرفت و ترکیبات موجود در اسانس این گیاه توسط روش کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف جرمی شناسایی شد. مطالعات

به ترتیب 0/125، 0/25، 0/25 میکروگرم در میلی لیتر و 0/25MFC، 0/5، 0/5 میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد که در مقایسه با شاهد فلوکونازول (0/25MIC تا 0/5 و 0/5 MFC تا 1 میکروگرم در میلی لیتر) نشان دهنده اثر بسیار خوب اسانس این گونه از آویشن بروی گونه‌های *Candida* در مقایسه با مطالعه انجام شده توسط حقیقی و همکاران می‌باشد (جدول و نمودار، 2). نتایج حاصل از بررسی خواص ضد قارچی اسانس مورد بررسی و مقایسه میانگین‌ها در این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس گیاهان مذکور علیه هر سه گونه مخمری آزمایش شده اثرات بازدارندگی قابل توجهی داشته و در مقایسه با شاهد ضدقارچی فلوکونازول مورد استفاده موثرتر بوده‌اند. مقایسه میانگین اثرات ضد قارچی *Thymus eriocalyx* در سه مرحله قبل از گلدهی، زمان گلدهی و بعد از گلدهی بررسی شد و نتایج نشان داد که میانگین اثرات ضد کاندیدایی اسانس در هر سه مرحله نمودی موثر بوده و از نظر آماری معنی‌دار بودند.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عمده ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس *Thymus eriocalyx* مانند سایر گونه‌های جنس آویشن، تیمول و کارواکرول می‌باشد و اثرات ضدقارچی این گونه نیز احتمالاً به دلیل وجود تیمول و سایر ترکیبات ترپنوئید موجود در اسانس می‌باشد. هرچند مطالعاتی در مورد اثرات ضد قارچی گیاهان دارویی در گذشته انجام شده ولی مطالعه حاضر به علت نتایج خوب MIC و MFC در مقایسه با داروهای ضد قارچی (فلوکونازول) و مطالعات انجام شده در گذشته از مزایای بهتری برخوردار می‌باشد. این مطالعه در راستای حل مشکلاتی چون اثرات جانبی داروهای ضدقارچی شیمیایی و جایگزینی آن‌ها با داروهای

می‌دهد، به طوری که اسانس بدست آمده از *Thymus eriocalyx* فعالیت‌های ضد قارچی قوی علیه آسپرژیلوس پارازیتیکوس از خود بروز می‌کند (Rasooli et al., 2005). رسولی و همکاران فعالیت اسانس *Thymus eriocalyx* علیه آسپرژیلوس نایجر را مورد مطالعه قرار دادند نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس این گونه گیاهی در غلظت 125 ppm مانع رشد آسپرژیلوس نایجر شد (Rasooli et al., 2006). در تحقیقی توسط نائینی و همکاران اسانس‌ها و عصاره‌های 50 گیاه دارویی ایران روی سویه‌ای استاندارد کاندیدا آلیکنس انجام شد و نتایج مثبت ارزیابی و اکثر گونه‌های گیاهی خاصیت ضد کاندیدایی قوی از خود نشان دادند (et al., 2011). در چندین مطالعه دیگر اثرات ضد کاندیدایی تعدادی از گیاهان از جمله اسطوخودوس، آویشن شیرازی، آویشن کوهی، مرزه، نعناع و زیره سبز با روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که این گیاهان اثرات ضد کاندیدایی بسیار قوی دارند از خود نشان دادند و بین اسانس این گیاهان با شاهد یک رابطه معنی‌دار به دست آمد (Naini Zarei et al., 2006؛ Farzaneh et al., 2006) (et al., 2011)

در تحقیق ما نیز مقایسه میانگین اسانس *Thymus eriocalyx* با شاهد (فلوکونازول) نشان دهنده اثرات ضد کاندیدایی قوی اسانس گونه مورد مطالعه بوده که با مطالعات گذشته مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که توسط حقیقی و همکاران با اسانس آویشن باغی، جعفری، زیره سبز، زیره سیاه و شاهد فلوکونازول بروی *Candida albicans* انجام شده MIC آنها به ترتیب 25، 72، 130، 412 و 0/5 میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد (Haghighi et al., 2011). در تحقیق حاضر MIC اسانس *Thymus eriocalyx* بر روی *C. krusei* و *C. glabrata*.

- Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy. *Antimicrob Agents*, 35(11): 2302.
11. 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): 1327 - 33.
 12. Gualco, L., Debbia, E.A., Bandettini, R., Pescetto, L., Cavallero, A., and Ossi, MC. 2007. Antifungal resistance in *Candida* spp. isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(2):179-84.
 13. Habibi, H., Mazaheri, N., Fakhr-Tabatabaee, M., and Bigdeli, M. 2006. Effect of altitude on essential oil and components in wild thyme (*Thymus kotschyanus* Boiss.) Taleghan region. *Pajouhesh & Sazandegi*, 73: 2-10
 14. Haghighi, F., Rodbarmohammadi, SH., Soleimani, N., and Sattari, M. 2011. Evaluation of antifungal activity of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Petroselinum crispum*, *Cuminum cyminum* and *Cuminum cyminum* on *Candida albicans* in comparison with Fluconazole. *Modarres Journal of Medical Sciences: Pathology of Life*, 14(1): 29-35.
 15. He, X., Tibbali, R.N., Zarins, L.T., Bradly, S.F., Sangeorzan, J.A. and Kaffman, C.A. 1994. Resistance in oropharyngeal *Candida albicans* strains isolated from patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(6): 2495-7.
 16. Helander, I., Alokomi, H., Latvakal, K., and Sandholm, M. 1998. Characterization of the action of essential oil components on Gram negative bacteria. *J agriculture and Food Chemistry*, 46: 3590-95.
 17. Kalvandi, R., Atri, M., Jamzad, Z., and Safikhani, K. 2012. Taxonomic study of *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas. in Iran with emphasis on Floristic marker and using special station method. *Taxonomy and Biosystematics*. 10: 63-76.
 18. Kantarcioglu, A.S., and Yucel, A. 2002. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strain among *Candida albicans* isolated from immune compromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. *Rev Iberoam Mycol.*, 19(1): 44-48.
 19. Li, H., Qing, C., Zhang, Y., and Zhao, Z. 2005. Screening for endophytic fungi with anti-tumour and antifungal activities from ضدقارچی گیاهی جهت گیری شد. از آنجا که اسانس های جدا شده از *Thymus eriocalyx* بر همه گونه های *Candida* به کار رفته در این مطالعه اثر بازدارندگی خوبی داشتند، لذا می توان از آن ها به عنوان اسانس های موثر بر علیه این گروه از قارچ ها استفاده نمود اما خاصیت ضدقارچی این اسانس در شرایط *vivo* نیاز به بررسی بیشتری دارد و باید در مورد اثرات دما، pH، مواد داخل بدن موجود زنده بر روی آن و همچنین ایجاد مقاومت دارویی در برابر این اسانس ها مطالعات بیشتری صورت گیرد.

منابع

1. Anaissie, E.J., Mc Ginnis, M.R., and Pfaller, M.A. 2003. *Clinical Mycology*. UK: Mosby, pp: 195-96.
2. Avijgan, M., Saadat, M., Nilforoshzadeh, MA., and Hafizi, M. 2006. Antifungal effect of *Echinophora platyloba*'s extract against *Candida albicans*. *Iranian Journal of Pharmacological search*, 4: 285-9.
3. Azaz, A.D., Irtem, H.A., Kurkcuoglu, M. and Baser, K.H.C. 2004. Composition and the *in vitro* Antimicrobial activities of the essential oils of some *Thymus* species. *Z. Naturforsch*, 59c: 75-80.
4. Boken, D.J., Swindells, S., and Rinaldi, M.G. 1993. Fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Clinical Infectious Diseases*, 17(6): 1018-21.
5. Bonjar, S. 2004. Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *J. Ethnopharmacol*, 94: 301-5.
6. Conner, D.E. 1993. Naturally occurring compounds. In: Davidson P, Branen AL, eds. *Antimicrobials in Foods*. New York: Marcel Dekker, 441-68.
7. Douglas, LJ. 2003. *Candida biofilms* and their role in infection. *Trends Microbiol*. 11: 30-6.
8. Edwards, JE. 1995. *Candida* species. In: Mandell, Douglas, Bennett, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. New York, USA: Churchill Livingstone, 2289-301.
9. Eggimann, P., Garbino, J., and Pittet D. 2003. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis*, 3: 772-85.
10. Fan-Havard, P., Capano, D., Smith, S.M., Mangia, A., and Eng, R.H. 1991.

- infection. *Clinical Infectious Diseases*, 30: 749-56.
28. Salguero, L.R., Vila, R., Tomi, F., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. Canigual, S., Casanova, J., Cunha, A. P., and Azadet, J. 1997a. Competition and variability of the essential oil of *Thymus caespitius* From Portugal. *Photochemistry*, 45: 307-311.
 29. Sefidkon F. and Askari F. 2002. Essential Oil Composition of 5 *Thymus* species. *Research Institute of Forests and Rangelands. Iranian Medicinal and Aromatic Plants Research*, 12: 29 - 51.
 30. Sefidkon F. and Rahimi-Bidgoli A. 2003. Quantitative and qualitative variation of essential oil of *Thymus kotschyanus* by different methods of distillation and stage of plant growth. *Research Institute of Forests and Rangelands. Iranian Medicinal and Aromatic Plants Research*. 15: 1-22.
 31. Troillet, N., Durussel, C., Bille, J., Glaouse, M.P., and Chave, J.P. 1993. Correlation between in vitro susceptibility of *Candida albicans* and fluconazole-resistance oropharyngeal Candidiasis in HIV-infected patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 12:911-5.
 32. White, A., Goetz, M.B., 1994. Azole-resistant *Candida albicans*: report of two cases of resistance to fluconazole and review. *Clinical Infectious Diseases*, 19(4): 687-92.
 33. Zarei, A., Dabbagh, M., and Fouladi, Z. 2006. In-vitro anticandida activity of *Zataria multiflora* Boiss. *eCAM*, 1 – 3.
- Chinese medicinal plants. *World J. Microbial Biotechnol.*, 21: 1515–21.
20. Menon, T., Umamaheswari K., Kumarasamy, N., Solomon, S., and Thyagarajan, SP. 2001. Efficacy of fluconazole and it raconazole in the treatment of oral Candidiasis in HIV patients. *Acta Trop*, 80(2): 151-4.
 21. Mota, K.S.L., Pereira, F.O., Oliveira, W.A., Lima, I.O., and Lima, E.O. 2012. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. Essential oil and its constituent phytochemical against rhizopus oryzae: Interaction with ergosterol," *Molecules*, 17: 14418-14433.
 22. Naini, A., Naseri, M., Kamal Nejad, M., and Khosh zaban, F. 2011. Effects of essential oils and extracts50 herbal standard strains of *Candida albicans* in vitro. *Journal of Medicinal Plants*, 2: 38.
 23. NCCLS document M27-A2. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Clin Lab Standards Inst.*, 22(19): 1-29.
 24. Rasooli, I. and Owlia, P. 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 66: 2852-2856.
 25. Rasooli, I., Rezaei, M.B., and Allameh, A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus ericalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*, 17: 359–364.
 26. Rustaiyan, A., Masoudi, S., and Monfared, A. 2002. Volatile constituents of three *Thymus* species grown wild in Iran. *Planta Medica*, 66:197 – 8.
 27. Saag, M., Van der Host, C., and Powderly, W.G. 2000. Refractory Mucosal Candidiasis in advanced human immunodeficiency virus