Eco-phytochemical
Journal of Medicinal Plants
Print ISSN: 2322-3235
Online ISSN: 2783-4697
Islamic Azad University
Gorgan Branch
Iranian Society
of Medical Plants

Evaluation of phytochemical, antibacterial, and antifungal properties of *Thymus daenensis* and *Thymus fedtschenkoi* from west of Iran

Hasan Mumivand[1*], Parisa Khanizadeh[1], Hamid Hassaneian Khoshro[2]

[1] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran, Email: mumivand.h@lu.ac.ir

[2] Dryland Agricultural Research Institute (DARI), Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Maragheh, Iran

Article type:
Research article

Article history
Received: 11-03-2022
Revised: 26-05-2022
Accepted: 28-05-2022

Keywords
Antimicrobial property
Essential oil
Linalool
Thymol
Thymus

Abstract

In this study, the essential oils of *Thymus daenensis* and *Thymus fedtschenkoi* were investigated in terms of phytochemical, antibacterial, and antifungal properties. After identifying the essential compounds of these two species of thyme, their antimicrobial properties against Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecium*), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*), and fungus (*Candida albicans*) were investigated. For this purpose, the flowering branches of *T. daenensis* and *T. fedtschenkoi* were collected at full flowering stage from west of Iran (Arak and Hamedan, respectively) in June. Then, the constituents of the essential oils were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). To determine the sensitivity of microbial agents to the essential oil of these plants, disk diffusion and microdilution methods were used. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the essential oils of both plants were determined against bacteria and fungi. Based on the results, the essential oil content of *T. daenensis* (3.4%) was more than that of *T. fedtschenkoi* (2.9%). The main compositions of the essential oils of *T. fedtschenkoi* and *T. daenensis* were linalool (83.1%) and thymol (73.9%), respectively. The essential oils of both species had significant antibacterial and antifungal effects albeit with different levels. In general, the antibacterial activity of *T. fedtschenkoi* essential oil was higher than that of *T. daenensis*, especially in the case of gram-positive bacteria. On the other hand, the antibacterial activity of *T. daenensis* essential oil against *E. coli* (gram negative) was more than that of *T. fedtschenkoi*. Antifungal activity of *T. daenensis* essential oil was higher than that of *T. fedtschenkoi* against *C. albicans*. The essential oil of *T. fedtschenkoi* was rich in linalool, and the higher antimicrobial activity of this species could be attributed to the high percentage of this compound in comparison with *T. daenensis*.

Cite this article as: Mumivand, H., Khanizadeh, P., Hassaneian Khoshro, H. (2023). Evaluation of phytochemical, antibacterial and antifungal properties of *Thymus daenensis* and *Thymus fedtschenkoi* from west of Iran. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*., 11(1): 1-16.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Doi: 10.30495/ejmp.2022.1954831.1683 Dor: 20.1001.1.23223235.1402.11.1.1.2

اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی
شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۳۲۳۵
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۹۷
دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
انجمن گیاهان دارویی ایران ثبت ۱۸۹۶۳

بررسی فیتوشیمیایی، ضدباکتریایی و ضدقارچی اسانس دو گونه از گیاه دارویی (*Thymus daenensis* و *Thymus fedtschenkoi*) در غرب ایران

حسن مومیوند[1*]، پریسا خانی‌زاده[1]، حمید حسنیان خوشرو[2]

۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران، رایانامه: mumivand.h@lu.ac.ir

۲ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، مراغه، ایران

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۳/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۷

واژه‌های کلیدی:
آنتی‌باکتریال
آویشن
اسانس
تیمول
لینالول

چکیده

در این تحقیق به منظور بررسی فیتوشیمیایی، ضدباکتریایی و ضدقارچی دو گونه از آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.) و آویشن قره‌باغی (*Thymus fedtschenkoi* Ronniger.) علیه باکتری‌های گرم مثبت (*Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* و *Enterococcus faecium*)، باکتری‌های گرم منفی (*Escherichia coli* و *Salmonella enteritidis*) و قارچ (*Candida albicans*) ، سرشاخه های گلدار گیاهان به‌ترتیب از اراک و همدان، در مرحله گلدهی کامل برداشت شد. اسانس گیری به روش تقطیر با آب (طرح کلونجر) و شناسایی ترکیبات اسانس‌ها توسط کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS)انجام گردید. بررسی ضد میکروبی با استفاده از روش های دیسک دیفیوژن ، میکرودایلوشن ، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) محاسبه گردید. نتایج نشان داد محتوی اسانس آویشن دنایی (۳/٤ درصد) بیشتر از آویشن قره‌باغی (۲/۹ درصد) بود. لینالول (۸۳/۱ درصد) و تیمول (۷۳/۹ درصد) به ترتیب مهمترین ترکیبات آویشن قره‌باغی و آویشن دنایی را تشکیل دادند و اینکه اسانس هر دو گونه دارای اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل توجهی بودند؛ به‌طور کلی فعالیت ضدباکتریایی اسانس آویشن قره‌باغی به‌ویژه در مورد باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از اسانس آویشن دنایی بود. درحالی‌که فعالیت ضدباکتریای اسانس آویشن دنایی بر *اشرشیاکلی* (گرم منفی) بیشتر از اسانس آویشن قره‌باغی بود. فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی در مقایسه با آویشن قره‌باغی بر قارچ *کاندیدا آلبیکنس* نیز بیشتر بود. ترکیبات لینالول و تیمول از مهمترین ترکیبات با اثر ضدمیکروبی در هر دو گونه گزارش شده است.

استناد: مومیوند، حسن؛ خانی‌زاده، پریسا؛ حسنیان خوشرو، حمید. (۱٤۰۲). بررسی تنوع فیتوشیمیایی اسانس گیاه دارویی *Perilla frutescens* L. var. *crispa* در مناطق مختلف کشت. *فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی*، ۱۱ (۱)، ۱٦-۱.

Doi: 10.30495/ejmp.2022.1954831.1683
Dor: 20.1001.1.23223235.1402.11.1.1.2

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

جنس آویشن (*Thymus*) از مهمترین جنس‌های تیره نعنا و مشتمل بر ۲۱۵ گونه علفی، دائمی و بوته‌ای کوچک است. اسانس آویشن به دلیل داشتن تیمول، لینالول و کارواکرول دارای خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی ، ضدانگلی و مقوی سیستم ایمنی می‌باشد و کاربرد وسیعی در صنایع دارویی و غذایی دارد (Kalvandi et al., 2012). ترکیبات اصلی گیاه آویشن شامل: تیمول، پارا-سیمین، لینالول، گاما ترپینن، آلفا پینن، بتا میرسن، لیمونن، سینئول، بورنئول، آلفا ترپینئول و ... میباشد که مقادیر آن‌ها بر اساس فصل برداشت، سن گیاه، خاک، شرایط اقلیمی، منطقه جغرافیایی، شیوه خشک کردن گیاه و شیوه اسانس‌گیری متفاوت می‌باشد. (Nagoor Meeran et al., 2017). از میان گونه‌های آویشن تعداد ۱۸ گونه در ایران شناسایی شده است آویشن دنایی با نام علمی *Thymus daenensis* Celak. گیاهی چند ساله است باساقه‌های کوتاه که در پایین کاملا چوبی بوده و ارتفاع گل دهنده آن به ۳۰ سانتی‌متر می‌رسد و به صورت اندمیک و با پراکنش وسیع در کشور رویش دارد. انتشار جغرافیایی این گونه در استان‌های کهکیلویه و بویر احمد، چهارمحال و بختیاری، اصفهان، همدان، لرستان، مرکزی و غیره است (Khoshsokhan et al., 2015; Safaei et al., 2017). آویشن قره‌باغی با نام علمی *Thymus fedtschenkoi* Ronniger گیاهی چند ساله و پر ساقه است که به صورت خودرو در مناطق کوهستانی و سنگلاخی ایران رویش دارد. این گیاه اندمیک ایران، ترکیه و قفقاز است؛ اما بیشترین پراکنش را در ایران دارد. ترکیبات غالب اسانس در اغلب این گونه‌ها عبارتند از تیمول[1]، کارواکرول[2]، پاراسیمین[3]، گاما-ترپنین[4] و β - کاریوفیلن[5] (Ghasemi Pirbalouti et al., 2015). دوری و همکاران (Dorri et al., 2021) درصد اسانس گونه دنایی را حدود ۳/٦ درصد و ترکیب اصلی اسانس آن را تیمول (۷۲ درصد) و کارواکرول (٤۳/۹ درصد) گزارش کردند. در مطالعه‌ای که جهت تعیین ترکیبات فرار اسانس آویشن قره باغی انجام شد ترکیبات اصلی اسانس شامل لینالول (٦۳/۷۷ درصد)، α-ترپینئول (۱۰/۱۷ درصد)، ۱،۸-سینئول (٤/۰۱ درصد)، تیمول (۳/۳ درصد) و سابینن (۲/٦٦ درصد) بودند (Khorshidi et al., 2014). همچنین در گزارش دیگری Rustaiee و همکاران (۲۰۱۱) لینالول (تا ۸۳ درصد) را به‌عنوان ترکیب اصلی اسانس این گونه شناسایی کردند. اسانس‌ها، ترکیبات طبیعی بسیار پیچیده دارند که که اغلب خواص بیولوژیکی اسانس‌ها را تعیین می‌کنند (Calo et al., 2015; El-Mohamedy, 2017; Pandey et al., 2017). فعالیت سیتوتوکسیک اسانس‌ها به دلیل حضور فنل‌ها، آلدئیدها و الکل‌ها می‌باشد (El-Mohamedy, 2017). همچنین اسانس‌ها با تخریب غشای فسفولیپیدی، تداخل در تولید انرژی و متابولیسم، اختلال در DNA و پلاسمید بر روی باکتری‌ها ، اثر ضد باکتریایی ایجاد می‌کنند (Zhu et al., 2021). از این میان مواد فنلی مانند: تیمول، کارواکرول، سینامالدئید و اوژنول رایج‌ترین ترکیبات در اسانس‌ها با فعالیت ضد باکتریایی قابل توجه هستند (Bhavaniramya et al., 2019).باکتری‌های گرم مثبت در مقابل با باکتری‌های گرم منفی نسبت به اسانس‌ها مقاومت کمتری دارند (Bhavaniramya et al., 2019; Zhu et al., 2021).

جنس کاندیدا[6] دارای گونه‌های متعددی می‌باشد اما اصلی‌ترین عامل بیماری‌زای انسانی کاندیدا

1. Thymol
2. Carvacrol
3. ρ-Cymene
4. γ-Terpinen
5. β-Caryophyllene
6. *Candida* genus

آلبیکنس[1] است (Al-Fattani et al., 2006). این قارچ می‌تواند باعث بیماری‌های نظیر برفک، واژنیت، عفونت پوستی، مننژیت و... با میزبانی انسان شود (Seneviratne et al., 2008; Perumal et al., 2007). برای درمان عفونت‌های کاندیدایی از داروهای گروه آزول (فلوکونازول) و داروهای پلی‌ان (نیستاتین) استفاده می‌شود. گونه‌های کاندیدا نسبت به داروهای ضد قارچی از خود مقاومت نشان می‌دهند. علاوه براین داروهای آنتی‌بیوتیک شیمیایی مانند فلوکونازول دارای اثرات سمی و جانبی زیادی هستند (Gualco et al., 2007). با ظهور گونه‌های مقاوم کاندیدا به داروهای شیمیایی و مسائل مرتبط با نگهدارنده‌های شیمیایی محققین برای کاهش عوارض این داروها و اثر گذاری آن‌ها از داروهای گیاهی کمک گرفتند و بررسی‌های لازم را انجام دادند بطوری که در تحقیقی اثر عصاره آبی پونه بر روی کانیدا نتایج بسیار موفقی را نشان داد (Taftian et al., 2020). در تحقیق دیگری اسانس دو گونه آویشن *T. camphoratus* و *T. carnosus* قادر به مهار رشد کاندیدا شد بطوری که نسبت به فلوکونازول، یک داروی ضد قارچی است و به‌طور گسترده در کلینیک استفاده می‌شود موثر تر بود (Alves et al., 2019).

استافیلوکوک اورئوس به عنوان یکی از پنج عامل باکتریایی شایع ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است (Jawetz et al., 2013). در درمان زخم‌های عفونی بیشتر از آنتی بیوتیک‌ها استفاده می‌شود، به دلیل مقاومت آنتی بیوتیک‌ها و با توجه به عوارض جانبی و آسیب‌های زیادی که بر ارگان‌های بدن دارند (Wright, 2014; Sengupta et al., 2013)، نیاز به استفاده از منابع جدید با اثرات جانبی کمتر وجود دارد و معمولاً این‌چنین موادی از عصاره و اسانس گیاهان استخراج می‌شوند.

فعالیت ضدقارچی متابولیت‌های ثانویه برخی گیاهان دارویی از جمله دارچین، پونه‌کوهی، رزماری، مریم گلی، میخک، فلفل، ریحان، آویشن، مرزه، زیره، لیمو، و نعناع در تحقیقات مختلف گزارش شده است (Ranjbar et al., 2008; Hadian et al., 2008). در بررسی اثر آویشن شیرازی و دارچین بر روی تشکیل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اثر بازدارندگی را نشان داد (Rahmati et al., 2020). در مطالعه ای نتایج نشان داد اسانس *Thyme white*، *Oregano* و *Lemongrass* فعالیت بسیار قوی در برابر فاز ثابت استافیلوکوکوس اورئوس از خود نشان داد (Xiao et al., 2020). در تحقیقات انجام شده مشخص شده که اسانس‌های به‌دست‌آمده از گونه‌های آویشن علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی فاز فعالی را داشته است. اثر ضد باکتریایی اسانس آویشن می‌تواند به‌دلیل اثر لینالول، تیمول و .. یا اثر هم افزایی اجزای اصلی و فرعی آن باشد (Han et al., 2017; Afonso et al., 2018).

استفاده از گیاهان دارویی با اثر آنتی بیوتیکی و ضد قارچ قدمتی طولانی دارد (Ahmadi et al., 2016). از مهمترین گونه ها ، گیاه آویشن است که حاوی تیمول، لینالول و کارواکرول با خاصیت ضد باکتری و ضد قارچی مطرح است (Najib Zade et al., 2009). تیمول فعالیت ضدقارچی در تعدادی از گونه‌ها شامل کریپتوکوکوس نیوفورمانز[2]، آسپرژیلوس[3]، اسپرالینا[4] و زیگوروهینچوس[5] دارد. علاوه براین مطالعات مختلف فعالیت ضد باکتریایی این ترکیب را علیه سامونلا تیفیموریوم[6]،

1. *Candida albicans*

2. *Cryptococcus neoformans*
3. *Aspergillus*
4. *Aspiryna*
5. *Zygorhynchus*
6. *Salmonella typhimurium*

استافیلوکوکوس آرئوس[1] و *اشرشیاکلی*[2] تایید می‌کنند (WHO[3], 1999). لینالول نیز به عنوان یک مونوترپن الکلی از خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل توجهی برخوردار است و در صنایع غذایی در کنترل عوامل میکروبی فاسد کننده‌ی مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Pavela et al., 2017; Morshedloo et al., 2021).

همسو با رویکرد جامعه جهانی ، شناخت و مطالعه در زمینه ترکیبات موجود در اسانس گیاهان دارویی و بررسی چگونگی تاثیر این مواد بر قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌تواند کمک شایانی به استفاده صحیح از این ترکیبات و جایگزین کردن داروهای شیمیایی با داروهای با منشا طبیعی، برای درمان عفونت‌های باکتریایی و قارچی ،این پژوهش به منظور بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس دو گونه آویشن دنایی و قره‌باغی (به ترتیب به‌عنوان اسانس‌های غنی از مونوترپن‌های فنولی و مونوترپن‌های الکلی) و مقایسه فعالیت‌های ضدمیکروبی آن‌ها روی باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: برای انجام این پژوهش نمونه‌های گیاهی آویشن دنایی و آویشن قره‌باغی به ترتیب از رویشگاه‌های طبیعی خود در اراک (ارتفاع از سطح دریا: ۲۴۳۰؛ 34°112 N, 48°152 E) و همدان (ارتفاع از سطح دریا: ۱۸۴۰؛ 34° 152 N, 48° 352 E) در مرحله گلدهی کامل جمع‌آوری گردید. نمونه‌های تهیه شده، در هرباریوم پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران شناسایی و تایید گردیدند. شماره هرباریومی ۳۶۶۱۴ و ۳۶۶۲۲ به ترتیب برای آویشن دنایی و آویشن قره‌باغی تعیین گردید.

اسانس‌گیری: سرشاخه‌های گلدار گیاهان در مرحله‌ی گلدهی کامل جمع‌آوری و سپس در شرایط سایه در دمای اتاق خشک گردید. در ادامه میزان ۱۰۰ گرم از گیاه خشک شده توسط روش تقطیر آبی با استفاده از دستگاه کلونجر طبق طرح فارماکوپه بریتانیا به مدت ۳ ساعت اسانس‌گیری شد. اسانس حاصله با استفاده از سولفات سدیم خشک، آب‌گیری شده و در شیشه‌های کاملا دربسته و در محیط تاریک در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به منظور انجام آزمایشات بعدی نگه‌داری شد (Mumivand et al., 2019).

آنالیز و شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس: برای آنالیز کمی اسانس از کروماتوگراف گازی (GC) واریان مدل سی پی ۳۸۰۰ مجهز به ستون از نوع دی بی ۵ به طول ٦٠ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای آون به مدت یک دقیقه در ٦٠ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد و سپس تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و به مدت ۱۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد. دمای قسمت تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۵۰ و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. نشانگر مورد استفاده در دستگاه کروماتوگراف گازی از نوع FID بوده و از گاز نیتروژن با سرعت جریان ۱/۱ میلی‌متر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. برای آنالیز کیفی اسانس نیز از دستگاه گاز کروماتوگراف کوپل شده با طیف سنج جرمی (GC-MS) مشابه با شرایط کروماتوگراف گازی (ذکر شده در بالا) استفاده گردید. از گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ناحیه جرمی از ٤٣ تا ٤٥٦ استفاده گردید.

پس از آماده‌سازی و تزریق اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی شرایط مناسب برای بهترین

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Escherichia coli*
3. *World Health Organization*

جداسازی بدست آمد. سپس با استفاده از روش کوپل شده کروماتوگرافی گازی با طیف سنج جرمی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس مورد شناسایی کیفی قرار گرفتند. شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و شاخص بازداری (RI)، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه جی‌سی‌مس صورت گرفت (Adams, 2007). درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام جی‌سی به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ بدست آمد (Mumivand et al., 2021).

بررسی اثرات ضدمیکروبی: در این مطالعه از سه سویه باکتری گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس آرئوس*، *باسیلوس سرئوس*[1] و *انتروکوکوس فاسیوم*[2]، دو سویه باکتری گرم منفی شامل *اشرشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس*[3] و قارچ *کاندیدا آلبیکنس*[4] استفاده گردید. به منظور تعیین حساسیت عوامل باکتریایی و قارچی نسبت به اسانس دو گونه آویشن از روش دیسک‌دیفیوژن و روش میکرودیلوشن استفاده شد. سویه‌های باکتریایی روی مولر هیلتون آگار و سویه قارچ روی سابورودکستروز آگار رشد داده شدند. شرایط انکوباسیون مورد استفاده ۲۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌ها و ٤٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای قارچ بود. کلرامفنیکل و نیستاتین نیز به عنوان استانداردهای مثبت مورد استفاده قرارگرفتند. حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimal Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی میکروبی (Minimum Microbicidal Concentration) اسانس‌ها علیه باکتری‌ها و قارچ مورد مطالعه بررسی شد. کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد (Hadian et al., 2012).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: در پایان داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS مورد بررسی و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل رسم شد.

نتایج

بازده و ترکیبات شیمیایی اسانس: نتایج آزمایش نشان داد که بازده اسانس آویشن دنایی (۳/٤±۰/۲ درصد حجمی/وزنی) بالاتر از آویشن قره‌باغی (۲/۹±۰/۳ درصد حجمی/وزنی) بود (جدول ۱). نتایج آنالیز اسانس توسط دستگاه GC-MS منجر به شناسایی ۱۸ ترکیب در اسانس آویشن قره‌باغی شد که در مجموع ۹۹/۳ درصد کل ترکیبات اسانس را تشکیل دادند. اجزای اصلی اسانس آویشن قره‌باغی شامل لینالول (۸۳/۱ درصد)، ۱و۸-سینئول (۲/۹ درصد)، ترپینن-٤-اُل (۲/۲ درصد) و آلفا- پینن (۲ درصد) بود (جدول ۱). از طرفی آنالیز GC-MS اسانس آویشن دنایی نیز منجر به شناسایی ۱٦ ترکیب شد که در مجموع ۹۸/٤ درصد کل ترکیبات اسانس را تشکیل دادند و مهم‌ترین ترکیبات آن شامل تیمول (۷۳/۹ درصد)، E-کاریوفیلن (٥/٦ درصد)، گاما- ترپینن (٥/۰ درصد) و پارا- سیمین (۳/۹ درصد) بود. (جدول ۱). با توجه به نتایج ترکیبات اسانس دو گونه، مهم ترین ترکیب ثانویه آویشن قره‌باغی لینالول با ۸۳/۱ درصد بود درحالی که این ترکیب در آویشن دنائی اصلا دیده نشد و مهم ترین ترکیب در آویشن دنائی تیمول با ۷۳/۹ درصد بود که این ترکیب هم در آویشن قره‌باغی مشاهده نشد. همچنین در آویشن دنائی گاما-

1. *Bacillus cereus*
2. *Enterococcus faecium*
3. *Salmonella enteritidis*
4. *Candida albicans*

ترپینن (۲۵ برابر)، E-کاریوفیلن (٤/۳ برابر) و پارا-سیمین (۲/٤ برابر) آویشن قره باغی بود. در آویشن قره‌باغی نیز مشاهده شد که ۱و۸-سینئول (۹ برابر) و آلفا- پینن (۵ برابر) آویشن دنائی بود.

جدول ۱: مقایسه کمیت و کیفیت اسانس *T. daenensis* و *T. fedtschenkoi*

Compounds	RI	*T. fedtschenkoi*	*T. daenensis*
α-Thujene	۹۲٦	-	۰/٤ ±۰/۰۷
α-Pinene	۹۳۲	۲ ±۰/۵	۰/٤ ±۰/۱
Champhene	۹۵۲	۱/٤ ±۰/۳	-
Sabinene	۹۷٤	۰/٦ ±۰/۰٤	۱/۲ ±۰/۱
α-Terpinene	۱۰۱۵	-	۰/۸ ±۰/۰٤
p-Cymene	۱۰۲۵	۱/٦±۰/۰۲	۳/۹±۰/٦
1,8-Cineole	۱۰۳۰	۲/۹±۰/۵	۰/۳ ±۰/۰٤
γ-Terpinene	۱۰۵۸	۰/۲±۰/۰۳	۵/۰ ±۰/٦
Terpinolene	۱۰۸۰	۱/۰±۰/۰۲	۰/۲ ±۰/۰۳
Linalool	۱۰۹۱	۸۳/۱±۳/۳	-
Fenchone	۱۱۰۹	-	۰/۸ ±۰/۲
Borneol	۱۱٦٤	۱/٦±۰/۲۲	۰/۸ ±۰/۱
Terpinen-4-ol	۱۱۷٤	۲/۲±۰/۳	-
α-Terpineol	۱۱۸٦	۱/۰±۰/۰۲	-
Carvacrol methyl ether	۱۲٤٤	-	۲/۹ ±۰/٦
cis Chrysanthenyl acetate	۱۲۸٤	-	-
Thymol	۱۲۹۰	-	۷۳/۹ ±۱/٤
Carvacrol	۱۲۹۸	۰/۱±۰/۰۲	۲/۷ ±۰/٤
Geronyl acetate	۱۳۸۳	-	-
E-caryophyllene	۱٤٤۲	۱/۳ ± ۰/۱	۵/٦ ±۰/٤
α-Humulene	۱٤۵٤	-	-
β-Bisabolene	۱۵۰۷	۰/٤ ± ۰/۱	-
Spathulenol	۱۵۷۷	-	-
Caryophllene oxide	۱۵۸۱	-	-
α-Cadinol	۱٦۵٤	-	-
epi- α-Bisabolol	۱٦٦۷	۰/٤ ± ۰/۱۳	-
Total		۹۹/۳	۹۸/٦
Oil content (v/w %)		۲/۹±۰/۳	۰/۲±۳/٤

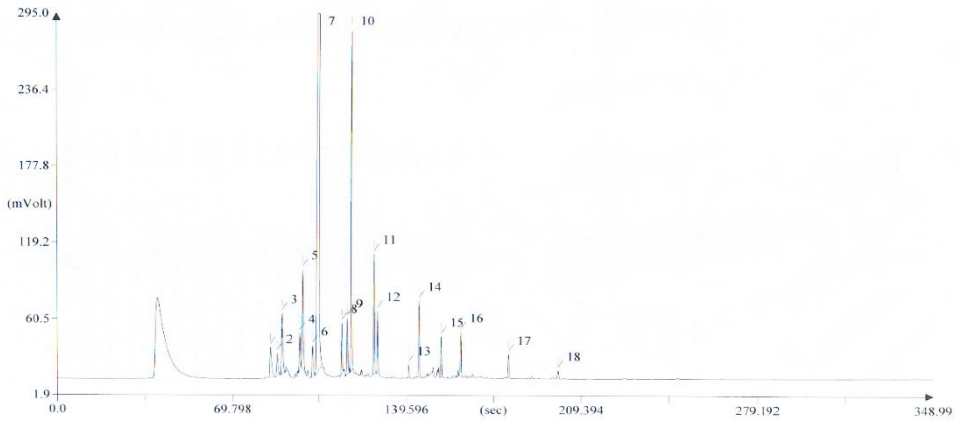
RI: retention indices relative to C_6-C_{24} n-alkanes on the DB-5 column.

نتایج گروه‌بندی ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس نشان داد که مهمترین دسته از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس در هر دو گونه مورد مطالعه مونوترپن‌های اکسیژنه بودند. با توجه به نتایج (جدول ۲) مهمترین گروه‌های تشکیل دهنده‌ی اسانس آویشن دنایی شامل مونوترپن‌های اکسیژنه (۸۱/۱ درصد)، مونوترپن‌های هیدروکربنه (۱۱/۹ درصد) و سسکویی‌ترپن‌های هیدروکربنه (۵/٦ درصد) بود و مهمترین گروه‌های

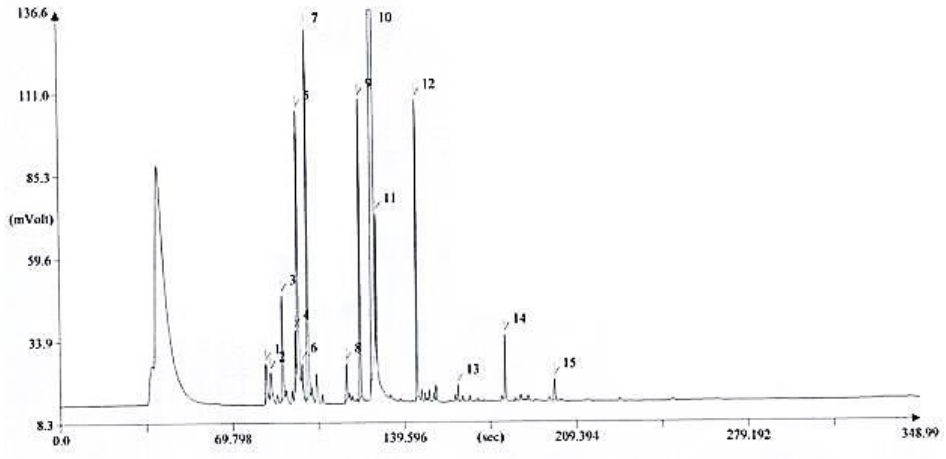
تشکیل دهنده‌ی اسانس آویشن قره‌باغی حاوی مونوترپن‌های اکسیژنه (۹۰/۸ درصد)، مونوترپن‌های هیدروکربنه (۶/۸ درصد)، سسکویی‌ترپن‌های هیدروکربنه (۱/۷ درصد) و سسکویی‌ترپن‌های اکسیژنه (۰/٤ درصد) و بود.

جدول ۲: گروه‌بندی ترکیبات شیمیایی اسانس *T. daenensis* و *T. fedtschenkoi*

Chemical groups	*T. daenensis*	*T. fedtschenkoi*
Monoterpene hydrocarbons	۱۱/۹	٦/۸
Oxygenated monoterpenes	۸۱/۱	۹۰/۸
Sesquiterpene hydrocarbons	٥/٦	۱/۷
Oxygenated sesquiterpenes	-	۰/٤



شکل ۱: کروماتوگرام آنالیز اسانس آویشن قره‌باغی (*T. fedtschenkoi*)



شکل ۲: کروماتوگرام آنالیز اسانس آویشن دنایی (*T. daenensis*)

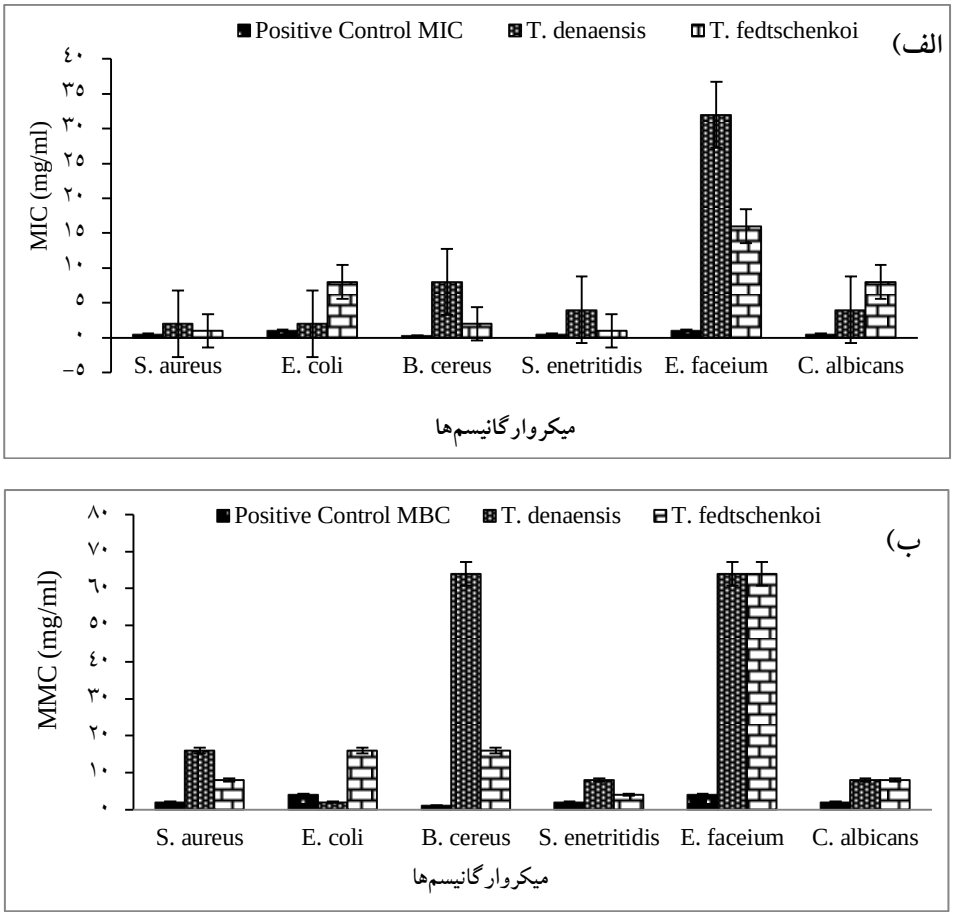
فعالیت ضدمیکروبی اسانس: نتایج بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس گونه‌های آویشن دنایی و آویشن قره‌باغی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و خواص ضدقارچی آن‌ها در شکل (۳) نشان داده شده است. اسانس هر دو گونه آویشن دارای اثرات بازدارندگی مشخصی بر رشد باکتری‌ها و قارچ با

درجات مختلف بود. در بین تمام میکروارگانیسم‌ها و اسانس‌های مورد مطالعه، بالاترین خاصیت ضدمیکروبی را اسانس آویشن قره‌باغی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس آئروس و گرم منفی سالمونلا انتریتیدیس (با MIC برابر با ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MMC به‌ترتیب معادل ۸ و ٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نشان داد. در حالی‌که کمترین خاصیت ضدمیکروبی اسانس آویشن قره‌باغی در باکتری انتروکوکوس فاسیوم (به‌ترتیب با MIC و MBC معادل ١٦ و ٦٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مشاهده گردید. اسانس آویشن قره‌باغی اثر ضدمیکروبی متوسطی بر سایر میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه داشت (شکل ۳). در پژوهش حاضر اسانس آویشن دنایی دارای بالاترین خاصیت ضدمیکروبی بر علیه باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* (با MIC و MMC معادل ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود. کمترین خاصیت ضدمیکروبی اسانس آویشن دنایی هم در دو باکتری انتروکوکوس فاسیوم و باسیلوس سرئوس (به‌ترتیب با MIC معادل ٦٤ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و با MMC بزرگتر از ٦٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد. اسانس آویشن دنایی اثر ضدمیکروبی متوسطی بر سایر میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه داشت (شکل ۳). در بین میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش، انتروکوکوس فاسیوم و باسیلوس سرئوس به عنوان باکتری‌های مقاوم به اسانس هر دو گونه آویشن شناسایی شدند.

همانطور که شکل (۳) نشان می‌دهد در مقایسه بین اسانس دو گونه آویشن مورد مطالعه نیز فعالیت ضدباکتریایی اسانس آویشن قره‌باغی به‌ویژه در مورد باکتری‌های گرم مثبت بالاتر از اسانس آویشن دنایی بود. بر خلاف این فعالیت ضدباکتریای اسانس آویشن دنایی بر *اشرشیاکلی* (گرم منفی) بالاتر از اسانس آویشن قره‌باغی بود. فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی در مقایسه با آویشن قره‌باغی بر علیه قارچ *کاندیدیا آلبیکنس* نیز بیشتر بود (به‌ترتیب با MIC و MBC معادل ٤ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). اگرچه در مقایسه با ضد قارچ شاهد مورد استفاده (نیستاتین) اثرات کمتری داشت.

بحث

در این مطالعه ترکیبات شیمیایی، خواص ضد باکتری و ضد قارچ اسانس دو گونه *T. daenensis* و *T. fedtschenkoi* ارزیابی شد. نتایج نشان داد بازده اسانس آویشن دنائی ۳/٤ حجمی/وزنی و بازده اسانس آویشن قره باغی ۲/۹ درصد حجمی/وزنی بود که با مطالعات انجام شده توسط دیگر محققین متفاوت بود. بطوری که طبق بررسی‌های انجام شده توسط قاسمی پیربلوطی و همکاران (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013) آویشن دنایی بازده اسانس آویشن دنایی ۰/۷۵ درصد وزن خشک گیاه بود. همچنین گلپرور و همکاران (Golparvar et al., 2012) نیز در مطالعه‌ای دیگر درصد اسانس آویشن دنایی در مرحله گلدهی را ۱/٤۱ درصد گزارش کردند. با این وجود نتایج رستایی و همکاران (Rostaee et al., 2011) نشان داد که بازده اسانس آویشن دنایی در مرحله گلدهی حدود ۳/٤ درصد بود. علاوه براین رستایی و همکاران (Rostaee et al., 2011) در مطالعه‌ای دیگر بازده اسانس آویشن قره‌باغی را ۲/۹ درصد گزارش نمودند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت.



شکل ۳: خاصیت ضدمیکروبی و ضدقارچی اسانس دو گونه *T. daenensis* و *T. fedtschenkoi* (الف: MIC و ب: MMC)
(کلرامفنیکل و نیستاتین با غلظت ۳۰ میکروگرم بر دیسک به ترتیب به عنوان کنترل مثبت برای باکتری‌ها و قارچ)

طبق نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر عمده‌ترین ترکیب آویشن دنائی تیمول با ۷۳/۹ درصد بود و همچنین اصلی ترین ترکیب آویشن قره‌باغی را لینالول با ۸۳ درصد به خود اختصاص داد. نتایج بدست آمده با داده‌های سایر محققین از لحاظ نوع ترکیبات اسانس مطابقت داشت، اما درصد ترکیبات متفاوت بود که علت آن را می‌توان به شرایط اقلیمی منطقه رویش نسبت داد بطوری که شرایط اقلیمی منطقه رویش با تاثیر بر فتوسنتز و تنفس و متابولیسم گیاه بر کیفیت و کمیت ترکیبات شیمیایی اسانس موثر است (Dorri et al., 2021). در تحقیقی ۲۷ ترکیب در اسانس آویشن قره باغی شناسایی شد که اجزای غالب اسانس را کارواکرول، تیمول، بورنئول، پاراسیمین، بورنیل‌استات و ۱و۸-سینئول بودند (Ghelichnia, 2016). نتایج مطالعه رستایی و همکاران (Rustaiee et al., 2011) روی اسانس آویشن قره‌باغی در ایران نیز لینالول، *E*-کاریوفیلن و گاماترپینن را به عنوان اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس گیاه نشان داد. نیک آور و همکاران (Nikavar et al., 2005) تیمول (۳۸/٦ درصد)، کارواکرول (۳۳/۹ درصد)، گاماترپینن (۸/۲ درصد)، و پاراسیمین (۷/۳ درصد) را به عنوان مهم‌ترین اجزای اسانس آویشن دنایی (*T. daenensis*) در ایران شناسایی کردند. در پژوهشی دیگر ۲٤ ترکیب در اسانس آویشن دنایی شناسایی شد که اجزای غالب اسانس را تیمول (۷۰/۳-۳۳/۹ درصد)، کارواکرول (۲٤/۸-٤ درصد)، گاماترپینن (۱۰/٤-۹/۳

درصد) و پاراسیمین(۸/٦-٤/۸ درصد) تشکیل دادند (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013). در پژوهش امیری (Amiri, 2012) نیز تیمول (٤۲/٦-١٦/٤ درصد)، کارواکرول (۵۲/۳- ۷/٦ درصد) و گاماترپینن (١١/٤-۳ درصد) ترکیبات اصلی اسانس آویشن دنایی را تشکیل دادند. اگرچه تولید ترکیبات شیمیایی مختلف در اسانس گیاهان دارویی دارای اساس ژنتیکی است اما میزان این ترکیبات در نتیجه منطقه جغرافیایی، شرایط اقلیمی، مرحله نموی، زمان برداشت و روش استخراج تغییر می‌کند (Nejad Ebrahimi et al., 2008; Nooshkam et al., 2017). تجمع متابولیت‌های ثانوی با تنوع عظیم در گیاهان نتیجه تلاش آن‌ها برای افزایش سازگاری با محیط ناپایدار اطراف است. زمانی که گیاه تحت شرایط اکولوژیکی مختلف قرار می‌گیرد کمیت و کیفیت مواد ثانوی خود را در جهت سازگاری به این شرایط تغییر می‌دهد. بنابراین جمعیت‌های یک گونه دارویی که در شرایط اکولوژیک مختلف رویش دارند از نظر کمیت و کیفیت مواد مؤثره تیپ‌های متفاوت و متنوعی را تشکیل می‌دهند که این تنوع منجر به تفاوت در دامنه فعالیت دارویی و بیولوژیک آن‌ها نیز می‌شود (Mumivand et al., 2010).

فعالیت بیولوژیکی اسانس‌ها به ترکیب شیمیایی آن‌ها بستگی دارد که توسط ژنوتیپ تعیین می‌شود و تحت تأثیر شرایط محیطی و زراعی است. اسانس‌های گیاهی منابع خوبی از ترکیبات ضدمیکروبی هستند و اسانس آویشن به عنوان یکی از ارزشمندترین عوامل ضد باکتریایی و ضد قارچی در بین اسانس‌ها شناسایی شده است (Nejad Ebrahimi et al., 2008; Teixeira et al., 2013; Hadipanah et al., 2016). در پژوهشی که بر روی فعالیت آنتی باکتریایی و ترکیب شیمیایی اسانس چندین گونه آویشن انجام شد، مهمترین اجزای اسانس این گونه‌ها شامل تیمول، کارواکرول، پاراسیمن و لینالول بود. در بین گونه‌های مورد مطالعه، به‌ترتیب *T. vulgaris*، *T. kotschyanus* و *T. pubescens* دارای بیشترین خاصیت ضدباکتریایی بودند (Mahboubi et al., 2017). مونوترپن‌های فنولی تیمول و کارواکرول ترکیبات ایزومری هستند که از طریق آروماتیکی شدن گاماترپینن به پاراسیمین و سپس هیدروکسیله شدن پاراسیمین تولید می‌شوند. این مونوترپن‌ها و پیش‌سازهای آن‌ها (گاماترپینن و پاراسیمین)، عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌های فنولی (آویشن، پونه و مرزه) خانواده نعناع هستند (Pavala et al., 2020). وجود ترکیبات فنولی دلیل فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های غنی از این ترکیبات است (Bagamboula et al., 2004). در پژوهش حاضر تیمول عمده‌ترین ترکیب اسانس آویشن دنایی و لینالول ترکیب عمده اسانس آویشن قره‌باغی بود (جدول ۱). تیمول دارای فعالیت ضدباکتریایی بر علیه تعداد زیادی از گونه‌های باکتری است (Ghasemi Pirbalouti et al., 2015). مهم‌ترین خصوصیت تیمول خاصیت آب‌گریزی آن است که باعث نفوذ آن در بافت چربی لیپوپلی‌ساکاریدی دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی شده و ساختار سلولی آن‌ها را بر هم می‌زند، در نتیجه نشت یونی رخ داده و محتویات سلول از آن خارج می‌شوند (Burt, 2004). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که اثر ضدباکتریایی اسانس آویشن دنایی (به‌عنوان اسانسی غنی از تیمول) بر باکتری‌های گرم منفی بالاتر بود.

لینالول به‌عنوان ترکیب اسانس آویشن قره‌باغی با دپلاریزاسیون و آسیب غشایی می‌تواند فعالیت ضدمیکروبی قوی‌تری برعلیه باکتری‌های داشته باشد (Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2016; Guo, et al., 2021). در مطالعه حاضر اسانس آویشن قره‌باغی غنی از لینالول بود و می‌توان وجود مقادیر بالای این

ترکیب را دلیل فعالیت ضدمیکروبی قوی‌تر این گونه نسبت به آویشن دنایی بیان کرد. در پژوهشی که توسط پتنیک و همکاران (Pattnaick et al., 1997). روی فعالیت ضدباکتریایی پنج ترکیب آروماتیک اسانس (سینئول، لینالول، سیترال، ژرانیول و منتول) بر ضد ۱۸ باکتری (شامل باکتری‌های کوکسی و میله‌ای گرم مثبت و میله‌ای گرم منفی) و ۱۲ قارچ (سه مخمر مانند و ۹ عدد میله‌ای) بر حسب فعالیت آنتی باکتریایی انجام شد لینالول بیشترین خاصیت ضدمیکروبی را داشت و مانع از رشد ۱۷ باکتری مورد مطالعه شد. در تحقیق دیگری اسانس آویشن فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی نشان داد و به‌طور موثری رشد *Echerichia coli* را مهار کرد (Anzlovar et al., 2014). همچنین Alsaraf و همکاران (Alsaraf et al., 2019) گزارش دادند که کاربرد اسانس آویشن علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و *E. coli* در غلظت‌های ۵ میکرولیتر و ۱۰ میکرولیتر اثر بازدارندگی را در رشد این باکتری‌ها داشت. مطالعات دیگری نشان داد که اسانس و عصاره *T. daenensis* فعالیت ضد میکروبی علیه کاندیدا آلبیکنس (Ghasemi Pirbalouti et al., 2009) استافیلوکوکوس اورئوس (Ghasemi Pirbalouti et al., 2010a)، اشریشیا کلی (Ghasemi Pirbalouti et al., 2010b) از خود نشان دادند که با داده‌های ما مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری نهایی

آویشن به‌دلیل وجود ترکیبات ثانویه، نقش مهمی در سلامت انسان ایفا می‌کند. مقدار ترکیبات ثانویه گیاهی در آویشن بسته به گونه، شرایط جغرافیایی و اقلیمی، مرحله رشد می‌تواند متفاوت باشد. در مطالعه حاضر، ترکیبات شیمیایی اسانس دو گونه آویشن دنایی و قره‌باغی و مقایسه فعالیت‌های ضدمیکروبی آن‌ها روی باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده بازده اسانس آویشن دنایی نسبت به آویشن قره‌باغی بالاتر بود. همچنین ترکیب اصلی اسانس دو گونه تفاوت داشت. به نحوی که لینالول با بیش از ۸۳ درصد بخش اعظم اسانس آویشن قره باغی را به خود اختصاص داد. درحالی که در آویشن دنایی، تیمول با بیش از ۷۳ درصد جزء اصلی اسانس این گیاه بود. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق اسانس هردو گونه پتانسیل بالایی جهت فعالیت ضد باکتری و قارچی نشان داد. با این حال فعالیت ضدباکتریایی اسانس آویشن قره‌باغی به‌ویژه در مورد باکتری‌های گرم مثبت بالاتر از اسانس آویشن دنایی بود. بر خلاف این فعالیت ضدباکتریای اسانس آویشن دنایی بر *اشرشیاکلی* (گرم منفی) بالاتر از اسانس آویشن قره‌باغی بود. در بین گیاهان مورد آزمایش اسانس آویشن دنایی، فعالیت ضدقارچی علیه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بیشتر داشت. با توجه به اینکه هریک از ترکیبات اسانس با میزان خاصیت میکروبی آن بر علیه برخی باکتری ها یا قارچ‌ها اثرات قابل توجهی نشان می‌دهد جداسازی و خالص سازی هر یک از این ترکیبات و استفاده از آن‌ها جهت از بین بردن عوامل بیماری‌زای خاص می تواند مثمر ثمر باشد.

References

Al-Fattani, M.A. and Douglas, L.J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol. 55, 999-1008.

Alsaraf, S., Hadi, Z., Al-Lawati, W.M., Al-Lawati, A.A. and Khan, S.A. (2019). Chemical composition, *in vitro* antibacterial and antioxidant potential of Omani *Thyme* essential Oil

along with in silico studies of its major constituent. Journal of King Saud University – Science. doi: https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.09.006

Ahmadi, E., Abdollahi, A., Najafipour, S., Meshkibaf, M.H., Fasihi Ramandi, M. and Namdar, N. (2016). Surveying the effect of the phenol compounds on antibacterial activity of herbal extracts: In vitro assessment of herbal extracts in Fasa-Fars province. J Fasa Univ Med Sci. 6, 210-20.

Afonso, A.F., Pereira, O.R., Valega, M., Silva, A.M.S, and Cardoso, S.M. (2018). Metabolites and biological activities of *Thymus zygis*, *Thymus pulegioides*, and *Thymus fragrantissimus* grown under organic cultivation. Molecules. 23, 1–15.

Adams, R.P. (2007). Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, 4th ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA. p. 804.

Alves, M., Gonçalves, M.J., Zuzarte, M., Alves-Silva, J.M., Cavaleiro, C., Cruz, M.T. and Salgueiro, L. (2019). Unveiling the antifungal potential of two Iberian thyme essential oils: effect on *C. albicans* germ tube and preformed biofilms. Front. Pharmacol. 10:446. doi: 10.3389/fphar.2019.00446

Anzlovar, S., Baricevic, D., Avgustin, J.A. and Koce, J.D. (2014). Essential oil of common Thyme as a natural antimicrobial. Food Additive. Food Technol. Biotechnol. 52, 263–268

Amiri, H. (2012). Essential oil composition and antioxidant properties of three *Thymus* species. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-8.

Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and Basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food Microbiology. 21, 33–42.

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology. 94, 223–253.

Bhavaniramya, S., Vanajothi, R., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., & Baskaran, D. (2019). Computational characterization of deleterious SNPs in Toll-like receptor gene that potentially cause mastitis in dairy cattle. Biocatalysis & Agricultural Biotechnology. 19, 101-151

Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A. and Ricke, S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems –A review. Food Control. 54,111–119.

Dorri, M.A., Mirza, M. and Sharifi Ashoorabadi, E. (2021). Phytochemical study of essential oil in different extensions of *Thymus daenensis* Celak. cultivated in lowland lands: A case study in Golestan province. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants. 9th Year, Volume One. 90-99.

El-Mohamedy, R.S.R. (2017). Plant essential oils for controlling plant pathogenic fungi. 171-198. In: Volatiles and Food Security: Role of Volatiles in Agro-ecosystems. Choudhary D.K. (eds.). Springer Singapore, 373 p.

Ghasemi Pirbalouti, A., Neshat, S.H., Rahimi, E., Hamedi, B. and F, Malekpoor. (2013). Chemical composition and antibacterial activity of essentials oils of Iranian herbs against *Staphylococus aureus* isolated from milk. International Journal of Food Properties. 17:9, 2063-2071.

Ghasemi Pirbalouti, A., Bahmani, M. and Avijgan, M. 2009. Anti- *Candida* activity of Iranian medicinal plants. Electronic Journal of Biology. 5, 85-88

Ghasemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F., Enteshari, S., Yousefi, M., Momtaz, H. and Hamedi, B. 2010a. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by Bakhtiari tribal in Southwest Iran. International Journal of Biology, 2, 55-63.

Ghasemi Pirbalouti, A., Jahanbazi, P., Enteshari, S., Malekpoor, F. and Hamedi, B. 2010b. Antimicrobial activity of some of the Iranian medicinal plants. Archives of Biological Science Belgrade. 62, 633- 642.

Ghasemi Pirbalouti, A., Emami Bistghani1, Z. and Malekpoor, F. 2015. An overview on genus *Thymus*. Journal of Herbal Drugs. Vol. 6, 93-100.

Ghelichnia, H. 2016. Essential oil composition of tree species of *Thymus* growing wild in mazandaran, iran. Cercetări Agronomice în Moldova Vol. XLIX , No. 2 , 107-113.

Golparvar, A., Ghasemi Pirbalouti, A., Zinali, H. and Hadipanah, A. (2012). Effect of harvest times on quality (morphological) and quality characteristics of *Thymus daenensis* celak in Isfahan. Journal of Herbal Drugs. Vol. 2, 245-254,

Gualco, L., Debbia, E.A., Bandettini, R., Pescetto, L., Cavallero, A. and Ossi, M.C. (2007). Antifungal resistance in *Candida* spp. isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. International Journal of Antimicrobial Agents. 29,179-84.

Guo, F., Liang, Q., Zhang, M., Chen, W., Chen, H., Yun, Y., Zhong, Q. and Chen, W. (2021). Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Shewanella putrefaciens*. Molecules. 26, 245.

Hadian, J., Akramian, M., Heydari, H., Mumivand, H. and Asghari, B. (2012). Composition and in vitro antibacterial activity of essential oils from four *Satureja* species growing in Iran. Natural Product Research. 26, 98-108.

Hadipanah, A. and Khorami, M. (2016). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from two *Thymus* species. Journal of Herbal Drugs. Vol. 6, 211-217

Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A. (2013). Medizinische Mikrobiologie. Berlin: Springer-Verlag

Han, X., Parker, T.L. (2017). Antiinflammatory activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil in a human skin disease model. Phytother Res. 31, 1034–8.

Hadian, J., Farzaneh, M., Fakhr Tabatabaei, S.M., Mirjalili, M.H., Ranjbar, H. and Haji Eghrari, B. (2008). A study of the composition, and antifungal activity of the essential oils of *Artemisia scopari* and *A. aucheri* from south of Khorasan on some soil-borne phytopathogen. Iranian Journal of Agriculture Science. 38, 421-429.

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.

Khoshsokhan, F., Babalar, M., Pourmeidani, A. and Fatahi, M. (2015). Antioxidant activity, total phenolics and oil content of some *Thymus kotschyanus* and *Thymus daenensis* populations. Plant Production Technology. 15, 153-162.

Khorshidi, J., Rasouli, M., Rustaiee, A.R. and Mohamadparast, B. (2014).Chemical composition of the essential oil of *Thymus fedtschenkoi* growing wild in Iran, Journal of Essential Oil Bearing Plants. 17, 173-175.

Mahboubi, M., Heidarytabar, R., Mahdizadeh, E. and Hossein, H. (2017). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus* species and *Zataria multiflora* essential oils. Agriculture and Natural Resources. 51, 395-401.

Morshedloo, M. R., Amani Machiani, M., Mohammadi, A., Maggi, F., Aghdam, M. S., Mumivand, H., & Javanmard, A. (2021). Comparison of drying methods for the extraction of essential oil from dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L., Lamiaceae). Journal of Essential Oil Research, 33(2), 162-170.

Mumivand, H., Ebrahimi, A., Morshedloo, M.R. and Shayganfar, A. (2021). Water deficit stress changes in drug yield, antioxidant enzymes activity and essential oil quality and quantity of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). Industrial Crops and Products. 164, 113-381.

Mumivand, H., Aghemiri, A., Aghemiri, A., Morshedloo, M. R. and Nikoumanesh, K. (2019). *Ferulago angulata* and *Tetrataenium lasiopetalum*: essential oils composition and antibacterial activity of the oils and extracts. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 22, 101-407.

Mumivand, H., Babalar, M., Hadian, J. and Tabatabaei, S.M.F. (2010). Influence of nitrogen and calcium carbonate application rates on the minerals content of summer savory (*Satureja hortensis* L.) leaves. Horticulture, Environment, and Biotechnology. 51, 173-177.

Najib Zade, T., Yadegari, M.H. and Naghdi Badi, H. (2009). Evaluation antifungal effects of essential oils *Satureja khuzestanica* and *Myrtus communis*. Presented for the M.Sc, Tarbiat Modares university, Tehran.

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

Nooshkam, A., Mumivand, H., Hadian, J., Alemardan, A. and Morshedloo, M.R. (2017). Drug yield and essential oil and carvacrol contents of two species of *Satureja* (*Satureja khuzistanica* Jamzad and *Satureja rechingeri* Jamzad) cultivated in two different locations. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 6, 126-130.

Nagoor Meeran MF, Javed H, Al Taee H, Azimullah Sh, Ojha SK. (2019). Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: Prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. Frontiers in Pharmacology. 8, 380

Nickavar, B., Mojab, F. and Dolat-Abadi., R. (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. Food Chem. 90, 609–611.

Pattnaick, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M. and Kole, C.R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. Microbios. 89, 39–46.

Pavela, R., Maggi, F., Kamte, S.N., Rakotosaona, R., Rasoanaivo, P., Nicoletti, M. and Benelli, G. (2017). Chemical composition of *Cinnamosma madagascariensis* (Cannelaceae) essential oil and its larvicidal potential against the filariasis vector Culex quinquefasciatus Say. South African Journal of Botany. 108, 359-363.

Pavela, R., Morshedloo, M.R., Mumivand, H., Khorsand, G.J., Karami, A., Maggi, F. and Benelli, G. (2020). Phenolic monoterpene-rich essential oils from Apiaceae and Lamiaceae species: insecticidal activity and safety evaluation on non-target earthworms. Entomologia Generalis. 421-435.

Perumal, P., Mekala, S. and Chaffin, W.L. (2007). Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 51, 2454–63.

Pandey, A.K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N.N. and Bajpai, V.K. 2017. Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. Frontiers in microbiology. 7, 21-61.

Rahmati, P., Noorbakhsh, F., Pazoki ., A. (2020). Effect of *Zataria Multiflora* and *Cinnamomum Verum* essential oils on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. Applied Biology. Volume 10, Issue 39, P 37-54

Rustaiee, A., Mirahmadi, S., Sefidkon, F., Fakhr Tabatabaei, M. and Omidbaigi, R. (2011). Essential oil content and composition of *Thymus fedtschenkoi* Ronniger at different phenological stages. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 14, 625-629.

Ranjbar, H., Farzaneh, M., Hadian, J., Mirjalili, M.H. and Sharifii, R. (2008). Antifungal effect of several herbal essential oils on post-harvest disease of fruit strawberry. Pajouhesh & Sazandegi. 21, 54-60

Safaei, L., Sharifi Ashoorabadi, E. and Afuni, D. (2017). Effect of application of chemical fertilizers, livestock and their integration on the performance of compounds phytochemical essential oil of medicinal herbs *Thymus daenensis* Celak. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants. 5, 13-24.

Seneviratne, C.J., Jin, L.J., Samaranayake, Y.H. and Samaranayake, L.P. (2008). Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob agents chemother. 52, 3259-66.

Sengupta. S., Chattopadhyay, M.K. and Grossart, H.P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Front Microbiol. 4, 47-52.

Taftian, m. Lotfali, e. Farhadi, s. and Jolehar, j. (2020). Evaluation of antifungal effects of aqueous extract of *Mentha Longifolia* using 0.2% chlorhexidine on clinical isolates of *Candida Albicans* from Oral Cavity of Patients with Leukemia. The Quarterly journal of School of medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences. 44, No.3

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R. and Nogueira. J.M.F. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. Industrial Crops and Products. 43, 587– 595.

Wright, G.D. (2014). Something new: Revisiting natural products in antibiotic drug discovery. Can J Microbiol. 60, 147-54.

Xiao, s., Cui, p., Shi, w and Zhang, y. (2020). Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. BMC Complementary Medicine and Therapies. P 1-10. https://doi.org/10.1186/s12906-020-02898-4

Zhang, L.L., Zhang, L.F., Hu, Q.P., Hao, D.L. and Xu, J.G. (2017). Chemical composition, antibacterial activity of *Cyperus rotundus* rhizomes essential oil against *Staphylococcus aureus* via membrane disruption and apoptosis pathway. Food Control. 80, 290–296.

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P. and Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Food Control. 59, 282–289.

Zhu, y., Li, c., Cui, h., Lin, l. (2021). Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system. A Review. Food Control. 123, 107-856.