E-ISSN: 2538-2187 | P-ISSN: 2251-7901

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology

https://jab.alzahra.ac.ir/

Vol. 36, No. 4 (2023) 70-79.

Paper Type: Original Article

The Survey on the Antimicrobial Effect of Methanolic Extract of Some Species of Apiaceae Family in Kurdistan Province

Shahla Hosseini[1,*], Naser Abdi[2], Kwestan Mawlood Ahmed[3], Sajjad Atashi[4]

[1]Assistant Professor, Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran; sh.hosseini@uok.ac.ir.

[2] Master's degree in Cell and Molecular Biology, Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

[3] Master's degree in cellular and molecular biology, Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

[4]Master's student in cellular and molecular biology, Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

Citation:

Hosseini, Sh., Abdi, N., Mawlood Ahmed, K., & Atashi, S. (2024). The survey on the antimicrobial effect of methanolic extract of some species of apiaceae family in Kurdistan province. *The quarterly scientific journal of applied biology*, *36*(4), 70-79.

Received: 15/10/2022 Accepted: 17/09/2023

Abstract

Introduction: Nowadays, the prevalence of drug resistance to synthetic drugs is increasing in many countries in the world; therefore, many efforts have been made to find new compounds as an appropriate alternative to antibiotics. In this research, the presence of effective compounds and antibacterial properties of extracts of three species from the Apiaceae family (*Zeravschania membranacea*, *Zeravschania aucheri*, and *Anthriscus nemorosa*) in the protected area of Kosalan in Kurdistan province has been investigated.

Methods: The plant's methanolic extract was prepared in different concentrations in this study. Qualitative assessment for secondary metabolites was performed using qualitative screening tests. The antimicrobial property of the studied plants was evaluated by disk diffusion and dilution methods. Using the dilution method, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of extracts were determined on Staphylococcus aureus, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa.

Results: Based on qualitative test results, the presence of the highest number of secondary metabolites in *Z. aucheri*, including tannin, saponin, phenol, glycoside, flavonoid, and phlobatannin. Although phenol and flavonoid were confirmed in all species, the alkaloid test was detected only in *Z. membranacea*. The results of the antimicrobial tests showed that the most zone of growth inhibition of bacteria was related to the *Z. membranacea* extract at a concentration of 400 mg on *S. aureus* strain (17± 1.02 mm), and different extract concentrations of *Z. aucheri* did not cause sensitivity in reproduction of the studied strains. *Anthriscus nemorosa* inhibited the growth of *S. aureus* only at 400 mg/ml concentration (10 ± 0.02 mm). Also, *Z. membranacea* extract showed the lowest levels of MIC (12.5 $mg.ml^{-1}$) and MBC (25 $mg.ml^{-1}$) on *S. aureus*.

Conclusion: Based on the results, *Z. membranacea* could be used in the pharmaceutical, food, and agricultural industries with the necessity of biological conservation of the plant.

Keywords: Apiaceae, Antimicrobial effect, Disk diffusion, Minimum bactericidal concentration, Minimum inhibitory concentration, Secondary metabolite.

Corresponding Author: sh.hosseini@uok.ac.ir

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۶، شماره (۴)، (۱۴۰۲)، ۷۹-۷۰
https://jab.alzahra.ac.ir

نوع مقاله: پژوهشی

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره متانولی برخی از گونه های خانواده چتریان در استان کردستان

شهلا حسینی [۱،*]، ناصر عبدی [۱]، کویستان مولود احمد [۱]، سجاد آتشی [۱]
[۱] گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
نویسنده مسئول: *sh.hosseini@uok.ac.ir*

چکیده

مقدمه: امروزه شیوع مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به داروهای شیمیایی در بسیاری از کشورهای جهان رو به افزایش است؛ بنابراین، تلاش‌های زیادی برای یافتن ترکیبات جدید به‌عنوان جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها صورت گرفته است. در این تحقیق به بررسی حضور ترکیبات موثر و خاصیت ضد باکتریایی عصاره سه گونه از خانواده چتریان (*Zeravschania membranacea*، *Zeravschania aucheri* و *Anthriscus nemorosa*) پرداخته شده است.

روش‌ها: در این تحقیق عصاره متانولی گیاهان در غلظت‌های مختلف تهیه گردید. سنجش کیفی حضور متابولیت‌های ثانویه با استفاده از تست‌های غربالگری کیفی انجام شد. خاصیت ضد میکروبی گیاهان مذکور نیز به روش انتشار دیسک و رقت لوله‌ای ارزیابی گردید. حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره‌ها بر روی *Staphylococos aureus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* تعیین شدند.

یافته‌ها: بیش‌ترین تعداد حضور متابولیت‌های ثانویه در گونه *Z. aucheri* بود که شامل تانن، ساپونین، فنول، گلیکوزید، فلاونوئید و فلوباتانین بود. اگرچه حضور فنول و فلاونویید در تمام گونه‌ها تایید شد ولی حضور ترکیبات آلکالوییدی، تنها در گونه *Z. membranacea* مثبت بود. نتایج آزمایش‌های ضد میکروبی نشان داد که بیش‌ترین هاله عدم رشد باکتری، مربوط به عصاره گونه *Z. membranacea* در غلظت mg/ml ۴۰۰ و بر روی سویه *S. aureus* (۱۷ ±۱/۰۲ میلی‌متر) میلی‌متر بود و غلظت‌های مختلف عصاره گونه *Z. aucheri* در رشد سویه‌های موردمطالعه حساسیتی ایجاد نکرد. گونه *A. nemorosa* نیز تنها در غلظت ۴۰۰ mg/ml قادر به مهار رشد *S. aureus* (۰±۱۰/۰۲ میلی‌متر) بود. هم‌چنین عصاره *Z. membranacea* کم‌ترین میزان (12.5 mg.ml^{-1}) MIC و (25 mg.ml^{-1}) MBC را روی سویه *S. aureus* نشان داد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج گیاه *Z. membranacea* می‌تواند با لزوم حفاظت زیستی گیاه در صنایع دارویی، غذایی و کشاورزی مورداستفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: انتشار دیسک، حداقل غلظت باکتری کشی، حداقل غلظت مهاری، خاصیت ضدمیکروبی، خانواده چتریان، متابولیت ثانویه.

۱- مقدمه

گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها امروزه ۲۰% تجویزات دارویی در کشورهای صنعتی پیشرفته و ۸۰% در کشورهای درحال‌توسعه را به خود اختصاص داده است. از آن‌جایی که گیاهان مفید دارویی در کشور ما فراوان هستند، بررسی اثرات ضدمیکروبی آن‌ها می‌تواند گامی مثبت در شناسایی و استفاده

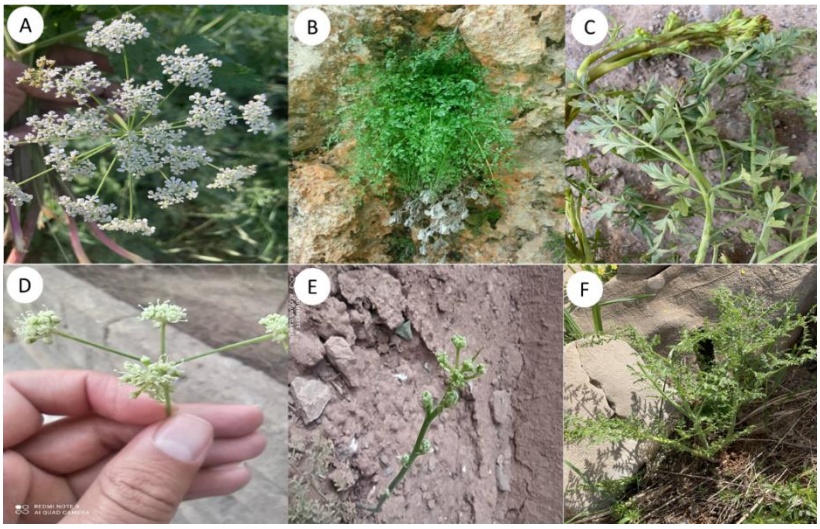
بهینه از این ثروت ملی با ارزش باشد. استفاده از گیاهان در درمان بیماری‌ها در سال‌های اخیر روند رو به رشدی پیدا کرده است. مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان بیماری‌ها منجر به ظهور جدایه‌های مقاوم میکروبی گردیده که هر روز بر تعداد آن‌ها افزوده می‌شود. ظهور سویه‌های مقاوم به داروهای شیمیایی تلاش برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید را ضروری می‌نماید. گیاهان و ترکیبات آن‌ها شامل اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای توانایی بالقوه جهت جایگزینی با داروهای شیمیایی هستند. این در حالی است که عوارض جانبی این ترکیبات در مقایسه با داروهای شیمیایی کم‌تر است [1]. خانواده چتریان با نزدیک به ۴۳۴ جنس و ۳۷۸۰ گونه یکی از بزرگ‌ترین تیره‌های گیاهی جهان است. گیاهان این خانواده بیش‌تر در نیم‌کره شمالی پراکنده شده‌اند و در مناطق گرمسیری و استوایی پراکنش کمی دارند [2]. این خانواده دارای تعدادی از گیاهان زراعی- دارویی می‌باشد که انسان از آن‌ها به‌صورت روزمره به‌عنوان سبزیجات و یا از عصاره آن‌ها به‌عنوان نوشیدنی استفاده می‌کند. این گونه‌ها دارای مواد مغذی فراوان و به‌طور ویژه مواد تنظیم‌کننده فعالیت سیستم ایمنی شامل ویتامین‌های A، C، B2 و E و هم‌چنین مواد معدنی مانند روی، آهن و سلنیوم هستند [3]. رازیانه کوهی غشایی (*Zeravschania membranacea* Boiss) با نام محلی کەرەس، بومی ایران است. این گونه، گیاهی چند ساله علفی با ساقه ۵۰ تا ۸۰ سانتی‌متر است و به‌طور طبیعی در ارتفاع ۲۵۰۰ تا ۳۵۰۰ متری در دامنه‌های صخره‌ای جنوب غرب تا شمال غربی ایران رشد می‌کند. رایحه مطلوب این گیاه آن را از نظر غذایی و دارویی موردتوجه ساکنان منطقه قرار داده است. در سال‌های اخیر پراکنش این گونه در منطقه کوسالان به‌شدت کاهش یافته است و این می‌تواند زنگ خطری برای در معرض انقراض بودن این گونه در کوتاه‌مدت باشد. رازیانه کوهی صخره‌روی (*Zeravschania aucheri* Boiss) با نام محلی برەزا از رستنی‌های کردستان است که در اغلب ارتفاعات این منطقه می‌روید. ارتفاع ساقه یا ساقه‌های آن یک متر و پنجاه سانتی‌متر است این گیاه بسیار معطر و خوش‌بو است و در طب سنتی دم‌کرده و یا جوشانده آن را برای ناراحتی‌های کلیه، دفع کرم و رفع درد شکم و دم‌کرده آن را برای صرع مفید می‌دانند. اسانس این گونه بر روی سویه *Proteus vulgaris* دارای فعالیت مهاری قابل‌توجهی بوده است [4].

جعفری وحشی (*Anthriscus nemorosa* (M. B.) Spreng.) با نام محلی هلامه، از جمله گیاهان خوراکی در منطقه اورامانات است و نوع پخته‌شده آن یکی از غذاهای مطلوب در فصل بهار است. این گیاه تا حدود یک متر ارتفاع پیدا می‌کند و جنس *Anthriscus* با هشت گونه جز گیاهانی است که همانند بیش‌تر گیاهان خانواده چتریان غنی از متابولیت‌های ثانویه و روغن‌های ضروری است. در مطالعه‌ای که توسط هنداوی و همکاران [5] انجام گردید اسانس قسمت‌های هوایی گلدار خشک‌شده *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm و *Anthriscus nemorosa* (M.Bieb.) Spreng با استفاده از GC-MS مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد ترکیباتی شامل کاریوفیلن، سیگما -کادینن، ترانس پینو کارول، اسپاتولنول، ژرماکرن و اکسید کاریوفیلن در گونه‌های موردمطالعه وجود دارد [5]. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی کیفی حضور مواد موثره و بررسی توان ضد میکروبی اکوتیپ‌هایی از گونه‌های خودروی خوراکی خانواده چتریان در منطقه کوهستانی کوسالان از استان کردستان است.

۲- مواد و روش‌ها

منطقه موردمطالعه

منطقه حفاظت‌شده کوسالان و شاهو با مساحت ۵۷۳۳۳ هکتار در حدفاصل شهرستان سروآباد، مریوان و کامیاران واقع شده است. این زیستگاه مهم در بخش شمالی اورامان در موازات شاهو و دالانی قرار گرفته است و این سه کوه، مثلثی را تشکیل می‌دهند که کوسالان ضلع شمالی، شاهو ضلع جنوبی و دالان ضلع غربی آن را می‌سازد. پوشش گیاهی در منطقه کوسالان بسیار گسترده است و شامل انواع گونه‌های گیاهی شامل گونه‌هایی از خانواده چتریان، نرگسیان، چلیپاییان و... می‌باشد که از قدیم‌الایام از آن‌ها برای درمان انواع بیماری‌ها استفاده می‌کردند. از جمله گیاهانی که پراکنش وسیعی در منطقه اورامانات دارد گیاهان تیره چتریان می‌باشد. منطقه کوسالان و شاهو طی مصوبه شماره ۳۳۳ شورای عالی محیط‌زیست در سال ۱۳۸۸ به‌عنوان منطقه حفاظت شده به مناطق تحت مدیریت سازمان حفاظت محیط‌زیست پیوسته است [6]. گونه‌های موردمطالعه در این تحقیق در فصل بهار ۱۴۰۰ از این منطقه جمع‌آوری شدند (**شکل ۱**). بعد از شناسایی، نمونه‌های هرباریومی از این‌گونه‌ها تهیه و در هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه کردستان نگهداری شدند (**جدول ۱**).



شکل ۱- گونه‌های مطالعه شده در زیستگاهشان، کوه‌های کوسالان از منطقه اورامان.

Figure 1- Studied species in their habitats in Kosalan Mountains of Avroman; a. *A. nemorosa*, b,c. *Z. aucheri*, d-f. *Z. membranacea*.

جدول ۱- مشخصات گیاهان موردمطالعه.

Table 1- Specifications of the studied plants.

Plant Family	Scientific Name	Altitude	Latitude	Voucher Specimen
Apiaceae	Z. membranacea	35°14’09”N	46°22’49”E	UOK-145
Apiaceae	Z. aucheri	35°13’23”N	46°40’41”E	UOK-146
Apiaceae	A. nemorosa	35°12’51”N	46°26’21”E	UOK-140

عصاره‌گیری

جهت عصاره‌گیری ۳۰ گرم پودر گیاه خشک‌شده در ۳۰۰ میلی‌لیتر متانول خیسانده شد. این مخلوط ۷۲ ساعت در جای تاریک نگهداری شد و هر ۶ ساعت یک‌بار هم زده شد. سپس عصاره صاف گردید و در دستگاه روتاری قرار داده شد تا حلال از آن جدا شود (تقطیر تحت خلا). عصاره غلیظ و خشک‌شده جهت استفاده‌های بعدی جمع‌آوری گردید و در فریزر نگهداری شد.

غربالگری کیفی ترکیبات شیمیایی گیاهی

برای انجام هرکدام از تست‌های فیتوشیمی یک میلی‌گرم از عصاره را در ۱۰ میلی‌لیتر متانول حل کرده تا محلول ذخیره آماده شود.

تست آلکالوئید

۲ گرم ید و ۶ گرم یدید پتاسیم را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل کرده (معرف واگنر) و قطره قطره از معرف به ۱ یا ۲ میلی‌لیتر از محلول ذخیره عصاره‌ها اضافه شد. رنگ قرمز نشان‌دهنده حضور آلکالوئید است [7].

تست تانن

به ۲ میلی‌لیتر از محلول ذخیره عصاره، قطره قطره کلرید آهن ۱۰% اضافه شد. رنگ سبز مایل به سیاه آبی نشان‌دهنده حضور تانن است [8].

تست ساپونین

به ۲ میلی‌لیتر از محلول ذخیره عصاره، ۵ میلی‌لیتر آب اضافه شد. بعد از اندکی تکان دادن، به مدت نیم ساعت ساکن گذاشته شد. تشکیل کف پایدار در بالای لوله نشان‌دهنده حضور ساپونین است [7].

تست فلاونوئید

به یک میلی‌لیتر از محلول ذخیره عصاره‌ها قطره قطره محلول NaOH یک مولار اضافه شد. رنگ محلول زرد رنگ می‌شود. در مرحله بعد قطره قطره محلول HCL رقیق اضافه شد. اگر تغییر رنگ از زرد به بی‌رنگ داده شد یعنی عصاره واجد ترکیبات فلاونوئیدی است [7].

تست استرول

به یک میلی‌لیتر از محلول ذخیره عصاره، ۲ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد. سپس H_2SO_4 غلیظ به آرامی به دیواره لوله آزمایش اضافه شد. تشکیل رنگ قهوه‌ای در حدفاصل این دو نشان‌دهنده استرول است [7].

تست فنول

به دو میلی‌لیتر از محلول ذخیره عصاره، سه قطره کلرید آهن ۱% و یک میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید اضافه شد. رنگ سبز آبی نشان‌دهنده حضور فنول است [7].

تست گلیکوزید

به دو میلی‌لیتر از عصاره حاصل درون لوله آزمایش، ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال خالص اضافه شد، سپس یک قطره محلول $FeCL_3$ ۵% اضافه شد. در مرحله بعد H_2SO_4 غلیظ اضافه می‌شود. تشکیل رنگ قهوه ای در وسط و رنگ سبز آبی در لایه فوقانی نشان‌دهنده حضور گلیکوزید است [7].

تست فلوباتانین

یک یا دو میلی‌لیتر از عصاره را به یک میلی‌لیتر از HCL 1% اضافه کرده و آن را می‌جوشانیم. تشکیل رسوب قرمز نشان‌دهنده فلوباتانین است [8].

تست‌های ضد باکتریایی

برای انجام تست ضد میکروبی از سه سویه استاندارد باکتری جهت ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی استفاده شد (*Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*). از محیط کشت نوترینت آگار جهت اطمینان از تخلیص باکتری‌ها و از محیط کشت مولر هینتون جهت رشد باکتری‌های مورد آزمون استفاده گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورداستفاده کلرامفنیکل، نیتروفورانتوئین، وانکومایسین، آمیکاسین سیپروفلوکساسین، مروپنم و امی پنم بود. انتخاب دیسک‌های کنترل مثبت بر اساس گزارش‌هایی است که در مقالات برای مهار سویه‌های موردمطالعه استفاده شده‌است. برای انجام تست حساسیت مهار رشد میکروبی در حضور غلظت‌های مختلف عصاره از روش انتشار دیسک استفاده شد. ابتدا کشت‌های باکتریایی هر سویه بر روی محیط مولر هینتون آماده گردید (از هر سویه ۳ کشت). سپس برای هر نمونه از عصاره‌ها، غلظت‌های مختلف ۲۰، ۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در DMSO (10%) آماده شد. مطابق دستورالعمل روش دیسک دفیوژن، دیسک‌های آغشته به غلظت‌های مختلف عصاره روی پلیت‌ها قرار داده شد (هر غلظت ۳ تکرار). از دیسک‌های آنتی بیوتیک به‌عنوان کنترل مثبت و دیسک آغشته به DMSO (10%) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. در ادامه پلیت‌ها در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس در صورت وجود هاله عدم رشد، قطر آن برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی به روش رقت در لوله جهت تعیین MIC، سری‌های رقت ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه‌شده در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی با غلظت ($۱/۵ \times ۱۰^۸$ CFU/ml) به هر یک از رقت‌ها اضافه شد. لوله‌های کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری، بدون عصاره) و لوله‌های کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) نیز تهیه شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، لوله‌ها از نظر کدورت (رشد یا عدم رشد باکتری) بررسی شدند. طبق تعریف، اولین لوله‌ای فاقد کدورت برابر با MIC تنظیم شد. برای تعیین MBC (حداقل غلظت باکتری‌کشی)، ۱۰۰ میکرولیتر از سه لوله قبل از لوله MIC، روی محیط کشت

مولر هینتون آگار به‌طور جداگانه کشت داده شد. کم‌ترین غلظت عصاره‌ای که باکتری در آن رشد نکرده بود به‌عنوان MBC گزارش شد. آنالیز واریانس دوطرفه برای داده‌های به‌دست‌آمده انجام شد و مقایسه میانگین‌ها برای فاکتورهای گیاه، غلظت، سویه باکتری و اثر متقابل آن‌ها در سطح اطمینان ۰/۰۵ با استفاده از نرم‌افزار SPSS بررسی شد.

۳- نتایج

نتایج غربالگری کیفی ترکیبات شیمیایی به‌روش عصاره‌گیری کل گیاه با استفاده از حلال متانول برای گونه‌های موردبررسی در **جدول ۲** آورده شده‌است. بر اساس نتایج، سه گونه موردمطالعه فاقد استرول بودند. یا این‌که اگر دارا بودند، به‌دلیل مقدار بسیار کم آن در این آزمون‌ها قابل‌شناسایی نبود. ترکیبات فنلی در همه گونه‌ها حضور داشته و از این لحاظ بین گونه‌ها اختلافی مشاهده نشد. آزمون ساپونین تنها در گونه‌های *Z. aucheri* و *Z. membranacea* مثبت بود. حضور فلوباتانین، گلیکوزید و تانن نیز به‌استثنای گونه *Z. aucheri* در دو گونه دیگر منفی بود. حضور آلکالوئید نیز تنها در گونه *Z. membranacea* مثبت بود. آزمون فلاونوئید به روش هیدروکسید سدیم حضور این ماده را در همه گونه‌ها تایید کرد. حساسیت و مقاومت تعدادی از سویه‌های مختلف گرم مثبت و منفی باکتری، در حضور چهار غلظت متفاوت از عصاره گونه‌های (*Z. membranacea*، *A. nemorosa* و *Z. aucheri*) در سه تکرار بررسی شد. اندازه قطر هاله عدم رشد که درواقع بیانگر میانگین ± انحراف معیار است در **جدول ۳** آمده‌است. میزان حساسیت باکتری‌ها در حضور آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و هم‌چنین DMSO (10%) به‌عنوان حلال عصاره‌ها در **جدول ۴** آمده‌است.

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که تمام فاکتورهای موردمطالعه در این آزمایش دارای تاثیر معنی‌دار بر روی مهار رشد باکتری‌ها هستند. این فاکتورها شامل تاثیر گونه‌های گیاهی مختلف، غلظت‌های متفاوت عصاره گیاهان و سویه‌های متفاوت باکتری است. البته تاثیر متقابل دو به دوی این فاکتورها نیز در سطح اطمینان ۰/۰۵ معنی‌دار بوده است. همان‌طور که در نمودارهای **شکل ۲** آمده است، میانگین برآورد شده‌ی متغیر وابسته (میزان هاله عدم رشد) در حضور سایر متغیرهای مستقل نشان می‌دهد که بیش‌ترین تاثیر ضد میکروبی مربوط به غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای گونه *Z. membranacea* بوده است و غلظت‌های کم‌تر (۵۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) کاملا بی‌تاثیر بوده‌اند. هم‌چنین از بین گونه‌های مختلف موردمطالعه گونه *Z. membranacea* بیش‌ترین تاثیر را در مهار نسبی رشد سویه *S. aureus* داشته است و گونه *Z. aucheri* بر روی تمام سویه‌ها کاملا بی‌تاثیر بوده است. از بین باکتری‌های موردمطالعه نیز *P. aeroginosa* بیش‌ترین مقاومت را داشته است به‌طوری‌که هیچ‌کدام از آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده قادر به مهار رشد این سویه باکتری نبودند. اثر بازدارندگی رشد باکتری‌ها توسط عصاره گونه *Z. membranacea* می‌تواند به‌دلیل اثر هم‌افزایی وجود آلکالوییدها و ساپونین باشد که در آزمون کیفی حضور هم‌زمان آن‌ها تنها در این‌گونه تایید شده است. مطالعات محققین دیگر نیز هم‌افزایی بین ترکیبات شیمیایی (آلکالوئیدها، ساپونینها و فنول) و فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ها را تایید می‌کنند [9]. مقایسه اثر مهاری غلظت‌های مختلف عصاره گونه *Z. membranacea* بر سویه‌های باکتریایی موردنظر در نمودار **شکل ۳** آمده است. میـــزان حداقل غلظـــت بازدارندگی و حداقـــل غلظت باکتری کشـــی عصاره متانولی گیاهـــان دارویی رازیانه کوهی غشایی، رازیانه کوهی صخره روی و جعفری وحشی بر باکتری‌های موردمطالعه در **جدول ۵** نشـــان داده شده است. عصاره‌های گیاهان موردمطالعه در محیط مایع اثرات مهارکنندگی و کشندگی متفاوتی را نشان دادند. بیش‌ترین اثر مهارکنندگی در کم‌ترین غلظت مربوط به عصاره گیاه *Z. membranacea* بر روی باکتری گرم مثبت *S. aureus* بود. اگرچه گونه *Z. aucheri* (MIC 50 $mg.ml^{-1}$، MBC 100 $mg.ml^{-1}$) و *A. nemorosa* (MIC 50 $mg.ml^{-1}$، MBC 200 $mg.ml^{-1}$) هر دو قادر به مهار رشد *E. coli*[1] بودند ولی اثر کشندگی *Z. aucheri* در غلظت‌های پایین‌تر، بیش‌تر بوده است. لازم به ذکر است که اثر بازدارندگی رشد و کشندگی هر سه گونه گیاهی در مقابل باکتری *P. aeroginosa* ضعیف بوده است (MIC 100، MBC > 100).

جدول ۲- نتایج غربالگری اولیه مواد شیمیایی برای گونه‌های گیاهی موردمطالعه.

Table 2- Results of preliminary screening of phytochemicals for studied plant species.

Chemical Compounds/Taxon	A. Nemorosa	Z. Aucheri	Z. Membranacea
Alkaloids	-	-	+
Tannin	-	+	-
Saponin	-	+	+
Flavonoids	+	+	+
Sterol	-	-	-
Phenol	+	+	+
Glycoside	-	+	-
Phlobatannin	-	+	-

جدول ۳- قطر هاله عدم رشد باکتری (میانگین ± انحراف معیار) (mm) در غلظت‌های متفاوت عصاره گونه‌های موردمطالعه.

Table 3- Diameter of inhibition zones (mean ± SD) (mm) in different concentration of studied plants extract.

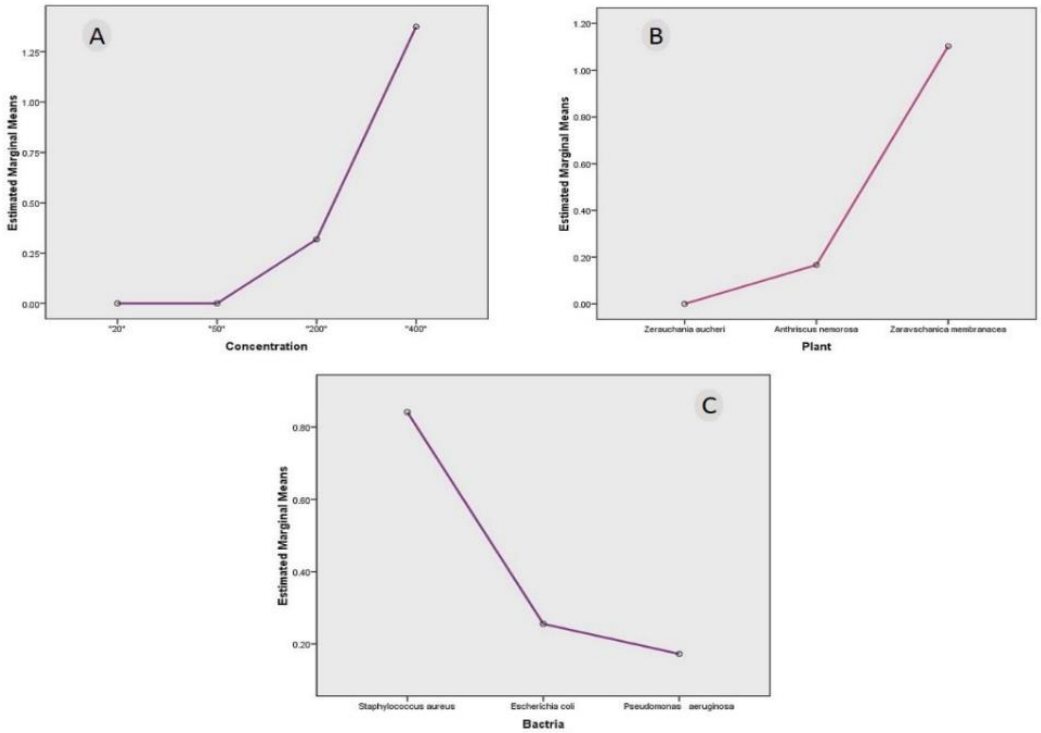
Plant Species	Bacterial Strains	Diameter of Inhibition Zone in Presence of Plant Extract Concentrations			
		400 mg/ml	200 mg/ml	50 mg/ml	20 mg/ml
Z. membranacea	*P. aeruginosa*	8±0.02	4± 1.32	5± 0.21	4± 0.24
	E. coli	10± 0.004	9± 0.01	4± 0.42	4± 1.37
	S. aureus	17± 1.02	12 ±0.32	4±0.04	4± 0.02
A. nemorosa	*P. aeruginosa*	0	0	0	0
	E. coli	0	0	0	0
	S. aureus	10 ±0.02	0	0	0
Z. aucheri	*P. aeruginosa*	0	0	0	0
	E. coli	0	0	0	0
	S. aureus	0	0	0	0

جدول ۴- قطر هاله عدم رشد باکتری (mm) در حضور آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده به‌عنوان کنترل مثبت و DMSO، 10% به‌عنوان کنترل منفی (میانگین ± انحراف معیار).

Table 4- Diameter of growth inhibition zone (mm) in the presence of antibiotics used as a positive control and DMSO, 10% as a negative control (mean ± standard deviation).

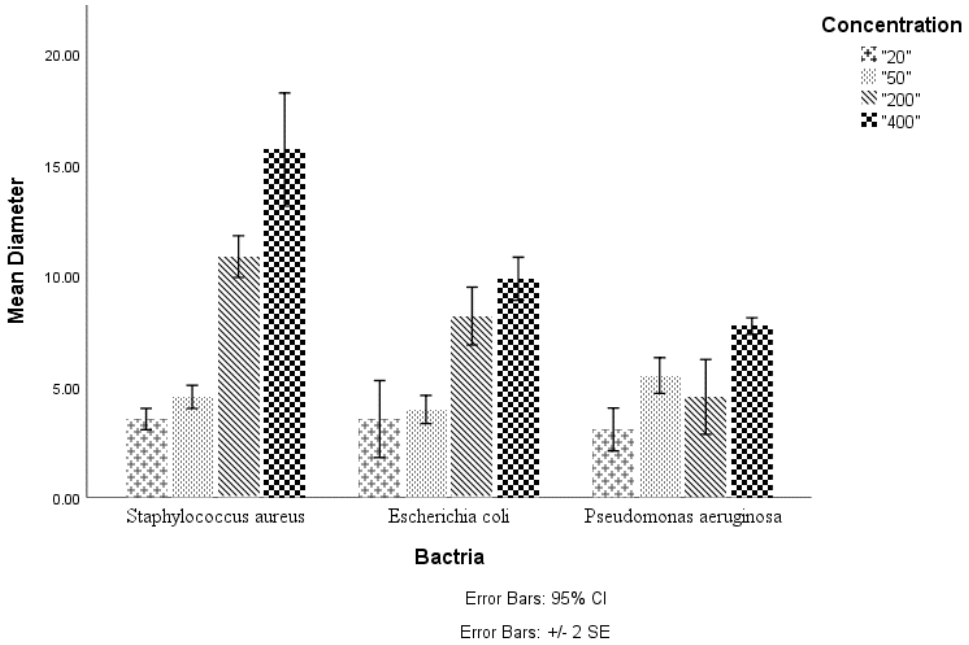
Antibiotic/ Bacteria	CH	NI	AM	VA	CI	ME	IM	DMSO 10%
P. aeruginosa	0	0	0	0	0	0	0	0
E. coli	24 ± 2.32	0	23 ± 1.54	0	0	0	18± 0.19	0
S. aureus	22 ± 1.02	22.6 ± 0.45	0	19 ± 0.52	0	0	0	0

*CH: Chloramphenicol; NI: Nitrofurantoin; AM: Amikacin; VA: Vancomycin; CI: Ciprofloxacin; ME: Meropenem; IM: Imipenem; DMSO: Dimethylsulfoxide.



شکل ۲- نمودار مقایسه عوامل تاثیرگذار؛ A. غلظت، B. گونه گیاه، C. سویه باکتری در آزمایش ضد میکروبی.

Figure 2- Comparative diagram of the influence factors; A. Concentration, B. Plant species, C. bacterial strain in antimicrobial test.



شکل ۳- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) باکتری‌های موردمطالعه در حضور غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گونه *Z. membranacea* (رازیانه کوهی غشایی).

Figure 3- Mean comparison of growth inhibition zone (mm) for studied bacteria in the presence of methanolic extract of *Z. membranacea* (membranous mountain fennel) at different concentrations.

جدول ۵- سطوح مختلف MIC و MBC عصاره‌های گیاهی روی سویه‌های باکتریایی موردمطالعه.

Table 5- Different levels of MIC and MBC of plant extracts on studied bacterial strains.

Bacteria	Plant Species	MBC ($mg.ml^{-1}$)	MIC ($mg.ml^{-1}$)
S. aureus	*Z. membranacea*	25	12.5
	A. nemorosa	100	50
	Z. aucheri	100	50
E. coli	*Z. membranacea*	200	100
	A. nemorosa	200	50
	Z. aucheri	100	50
P. aeruginosa	*Z. membranacea*	200	100
	A. nemorosa	200	100
	Z. aucheri	200	100

۴- بحث

گونه‌های خانواده چتریان منبع خوبی از ترکیبات متابولیت‌های ثانویه با فعالیت‌های زیستی متنوع، مانند القاکننده آپوپتوز، فعالیت‌های ضد باکتری، ضد قارچی، فیتوکسیک و فعالیت مهار سیکلواکسیژناز هستند [10]، [11]. به‌علاوه از گونه‌های این خانواده می‌توان به‌عنوان مهارکننده‌های زیستی در کنترل آفات محصولات کشاورزی نیز استفاده کرد [12]. نتایج آزمون‌های کیفی این مطالعه نیز با وجود حساسیت به نوع و مقدار ترکیب شیمیایی، حضور تعداد زیادی از ترکیبات، از جمله ترکیبات فنولی، فلاونوییدی، گلیکوزیدی، استرول و... را تایید کرد. البته آنالیزهای کمی ترکیبات شیمیایی در اکوتیپ‌های موردمطالعه ضروری است.

اسانس گونه‌های متعددی از خانواده Apiaceae در مقالات متعدد بررسی شده است که بیش از ۷۶۰ جز شیمیایی مختلف برای آن‌ها گزارش شده‌است [2]، [13]. اجزای اسانس‌ها، عمدتا مونوترپنوئیدها و سسکوی‌ترپنوئیدها بوده‌اند که فعالیت‌های ضد میکروبی و دافع آفات را نشان می‌دهند [14]، [15]. ترکیب شیمیایی عصاره و اسانس این گیاهان، با اندام گیاهی مورداستفاده برای استخراج، روش‌های مختلف استخراج، مراحل فنولوژیکی گیاه، فصل برداشت، سن گیاه، ماهیت خاک و شرایط محیطی، متفاوت و متغیر است. این تغییرات در نوع و مقدار ترکیب شیمیایی تاثیر مستقیمی بر فعالیت‌های زیستی آن‌ها دارد [16]، [17]. اکوتیپ‌های مطالعه‌شده از این خانواده در منطقه کوسالان به جهت دارا بودن طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی، واجد پتانسیل مناسب به جهت فواید دارویی آن‌ها و هم‌چنین سایر کاربردهای زیست‌محیطی‌شان هستند.

با توجه به نتایج آزمایش ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی موردمطالعه، مشخص گردید که از میان گونه‌های موردمطالعه رازیانه کوهی غشایی، هاله عدم رشد را برای هر سه سویه‌ی باکتری ایجاد کرد و در بین آن‌ها اثر مهارکنندگی روی *S. aureus* بیش‌تر بود (میلی‌متر ۱/۰۲±۱۷)، اگرچه قطر هاله عدم رشد در قیاس با آنتی‌بیوتیک‌های استفاده‌شده در این مطالعه که باعث مهار رشد *S. aureus* شدند (کلرامفنیکل، وانکومایسین و نیتروفورانتوئین) کم‌تر بود. با این حال استفاده از این گیاه می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. گونه جعفری وحشی نیز در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هاله عدم رشد (میلی‌متر ۰/۰۲±۱۰) را در کشت سویه *S. aureus* نشان داد. تمام عصاره‌ها به‌غیراز عصاره *Z. membranacea* بر روی باکتری‌های گرم منفی این مطالعه بی‌تاثیر بوده‌اند. در قیاس با سایر گونه‌های آزمایش‌شده از خانواده چتریان از جمله گونه *Heptaptera anisoptera* که هیچ‌گونه اثر ضد باکتریایی بر روی سویه های گرم مثبت یا منفی از آن گزارش نشده است [18]، گونه *Z. membranacea* داری عملکرد بهتری بوده است. در مطالعه پیر بلوطی و همکاران [4] بر روی گونه *Z. membranacea* نیز فعالیت بازدارندگی متوسط تا خوب (MICs 32–250 µg/ml) اسانس آن علیه چهار سویه باکتری به‌ویژه سویه *Proteus vulgaris* تایید شده است. با توجه به تمایل مصرف‌کنندگان مخصوصا بیماران، به استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان عفونت‌ها، به‌خاطر عوارض کم‌تر در مقایسه با داروهای شیمیایی، مصرف گونه *Z. membranacea* می‌تواند یکی از راه‌های کم عارضه جهت مقابله با باکتری‌های ایجادکننده عفونت مخصوصا باکتری *S. aureus* باشد. البته در سال‌های اخیر، برداشت زودهنگام گیاه قبل از مرحله گل‌دهی و تولید بذر باعث شده است که پراکنش این گونه به‌شدت کاهش یابد. جعفرنژاد و همکاران [19] نیز با مطالعه‌ای که بر روی دو گونه از خانواده چتریان انجام دادند نشان دادند که خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی گونه‌های *Bupleurium rutundifolium* و *Jurinea sintenisii* تاثیر خوبی بر باکتری‌های گرم مثبت داشته و بهترین تاثیر مربوط به گونه *Jurinea sintenisii* بر باکتری *S. aureus* بوده است. البته در مطالعاتی که از حلال‌های الکلی برای انحلال عصاره استفاده می‌شود باید از عامل الکل به‌عنوان کنترل منفی استفاده شود؛ زیرا در بیش‌تر مواقع عامل الکل خود تاثیر هم‌افزایی در مهار رشد باکتری خواهد داشت. در مطالعه حاضر عصاره‌ها در DMSO، 10% حل شد و همراه تست عصاره‌ها این حلال نیز به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. در تمام کشت‌های انجام‌شده (هرکدام سه تکرار) هیچ حساسیت باکتریایی نسبت به این ماده مشاهده نشد. نتایج بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره متانولی زنیان (*Carum copticum* L.) نیز علیه باکتری‌های گرم مثبت بیش‌تر از باکتری‌های گرم منفی بوده است و بیش‌ترین هاله عدم رشد در سویه *S. aureus* مشاهده شده است [20]. دلیل حساسیت بیش‌تر باکتری‌های گرم مثبت به ترکیب موکوپپتید بیش‌تر در دیواره آن‌ها برمی‌گردد که این لایه در باکتری‌های گرم منفی به‌مراتب نازک‌تر است [21].

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی، بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، عصاره گونه *Z. membranacea* در غلظت‌هایی بهینه می‌تواند نسبت به مصرف دوزهای بالای آنتی‌بیوتیک علیه سویه *S. aureus* ارجحیت داشته باشد؛ چراکه با توجه به ایجاد مقاومت سویه‌های باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مصرفی، لازم است در کنار مصرف دوزهای پایین‌تری از این داروها عصاره این گیاه نیز تجویز شود تا از مقاومت بیش‌تر سویه‌ها به داروهای شیمیایی جلوگیری شود. هم‌چنین با توجه به غلظت بیش‌تر ترکیبات موثره در اسانس گیاه، پیشنهاد می‌شود در صورت اطمینان از وسعت پراکنش این گونه در منطقه موردمطالعه، نمونه کافی جهت استخراج اسانس جمع‌آوری و اثرات ضد میکروبی آن بررسی گردد. با توجه به برداشت بی‌رویه و چرای مفرط دام در کوه‌های منطقه کوسالان، این گیاهان در معرض خطر انقراض زود هنگام قرار دارند. لذا حفاظت زیستی ازاین گونه‌های مفید و پرمصرف به طرق گوناگون حفاظت، در محل یا خارج از محل طبیعی‌شان پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش از گرنت پژوهشی با شماره (11.99.5722) از دانشگاه کردستان حمایت شده است.

تضاد عدم تعارض

هیچ تضاد منافعی در رابطه با این مقاله وجود ندارد.

منابع

[1] Sharifi, A., Seifi, T., Mohammadzadeh, A., Hammoun Navard, S., & Pajohi-Alamoti, M. R. (2015). Antibacterial activity of alcoholic extract of ferulagoangolata. *Journal of ilam university of medical sciences*, *23*(4), 202-208. (**In Persian**). http://sjimu.medilam.ac.ir/article-1-2404-en.html

[2] Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., & Merah, O. (2017). The apiaceae: ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial crops and products*, *109*, 661–671. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669017306258

[3] Bhaskaram, P. (2002). Micronutrient malnutrition, infection, and immunity: an overview. *Nutrition reviews*, *60*(5), 40–45. https://doi.org/10.1301/00296640260130722

[4] Ghasemi Pirbalouti, A., Hossayni, I., & Shirmardi, H.-A. (2013). Essential oil variation, antioxidant and antibacterial activity of mountain fennel (zaravschanica membranacea (Boiss.) M. pimen.). *Industrial crops and products*, *50*, 443–448. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013003907

[5] Fayez Hendawy, S., Hussein, M. S., El-Gohary, A., & Soliman, W. S. (2019). Chemical constituents of essential oil in chervil (anthriscus cerefolium l. hoffm.) cultivated in different locations. *Journal of essential oil bearing plants*, *22*(1), 264–272. https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1587316

[6] Kafash, S. (2013). The study of medicinal plants of oramanate section in the protected area of kosalan and shahu, kurdistan province. *The second national conference on environmental protection and planning* (pp. 1-8). Civilica. (**In Persian**). https://civilica.com/doc/232790

[7] Bhatt, S., & Dhyani, S. (2012). Preliminary phytochemical screening of ailanthus excelsa roxb. *International journal of current pharmaceutical research*, *4*(1), 87–89. https://www.academia.edu/download/90020575/462.pdf

[8] Kujur, R. S., Singh, V., Ram, M., Yadava, H. N., Singh, K. K., Kumari, S., & Roy, B. K. (2010). Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of stevia rebaudiana in alloxan-induced diabetiis rats. *Pharmacognosy journal*, *2*(14), 27–32. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0975357510800689

[9] Foroughi, A. (2022). A review on medicinal plants; an emphasis on antimicrobial effects. *Veterinary research & biological products*, *35*(1), 2-17. (**In Persian**). https://vj.areeo.ac.ir/article_124009.html

[10] Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L., & Loranger-Merciris, G. (2012). Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environmental chemistry letters*, *10*(4), 325–347. https://doi.org/10.1007/s10311-012-0359-1

[11] Duško, B. L., Comiæ, L., & Sukdolak, S. (2006). Antibacterial activity of some plants from family apiaceae in relation to selected phytopathogenic bacteria. *Kragujevac journal of science*, *28*, 65–72. https://scindeks.ceon.rs/article.aspx?artid=1450-96360628065B

[12] Ferrie, A. M. R., & Caswell, K. L. (2016). Chapter 13 - Applications of doubled haploidy for improving industrial oilseeds. *Industrial oil crops* (pp. 359–378). AOCS Press. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781893997981000130

[13] Aćimović, M. (2019). *Nutraceutical potential of Apiaceae*. Springer Science and Business Media BV.

[14] El Karkouri, J., Bouhrim, M., Al Kamaly, O. M., Mechchate, H., Kchibale, A., Adadi, I., … & Zair, T. (2021). Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oil from cistus ladanifer L. *Plants*, *10*(10), 1–16. https://www.mdpi.com/2223-7747/10/10/2068

[15] Gazim, Z. C., Demarchi, I. G., Lonardoni, M. V. C., Amorim, A. C. L., Hovell, A. M. C., Rezende, C. M., … & Cortez, D. A. G. (2011). Acaricidal activity of the essential oil from tetradenia riparia (Lamiaceae) on the cattle tick rhipicephalus (boophilus) microplus (acari; ixodidae). *Experimental parasitology*, *129*(2), 175–178. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489411001986

[16] Petretto, G. L., Fancello, F., Bakhy, K., Faiz, C. A. L., Sibawayh, Z., Chessa, M., … & Pintore, G. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from cuminum cyminum L. collected in different areas of Morocco. *Food bioscience*, *22*, 50–58. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429217304716

[17] Chaubey, M. K. (2012). Biological effects of essential oils against rice weevil sitophilus oryzae L. (coleoptera: curculionidae). *Journal of essential oil bearing plants*, *15*(5), 809–815. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489411001986

[18] Nickavar, B., Mojab, F., & Mojahedi, A. (2009). Composition of the essential oil from Anthriscus nemorosa. *Chemistry of natural compounds*, *45*(3), 443–444. https://doi.org/10.1007/s10600-009-9308-z

[19] Jafaranjad, A., & Firouznia, A. (2018). Evaluation of antibacterial activity and antioxidant properties of methanolic extracts of jurinea sintenisii bornm and bupleurium rotundifolium L. *Journal of north khorasan university of medical sciences*, *10*(1), 65–71. https://elmnet.ir/doc/1838378-2802?elm_num=1

[20] Jafari Sales, A., Rathi Bonab, F., & Sayahi, J. (2018). Investigating the antibacterial effects of methanolic extract of carum copticum L. on pathogenic bacteria Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa in vitro. *Journal of paramedical sciences and military health*, *13*(4), 19–25. https://elmnet.ir/doc/2097810-17128?elm_num=1

[21] Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., … & Cho, M.-H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, *3*(1), 95–101. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963406003467