

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره تام و فراکسیون‌های اتردپترولی، کلروفرمی، اتیل استاتی و آبی بخش هوایی *Heliotropium bacciferum* Forssk

ناهد رحیمی فرد^{۱*}، الهام باقری^۲، ژینوس عسگرپناه^۳، بابک کبیری بالاجاده^۴، حمیدرضا یزدی^۴

- ۱- دانشیار، مرکز آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 - ۲- دکترای داروسازی، گروه فارماکولوژی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 - ۳- استادیار، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 - ۴- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
- *آدرس مکاتبه: تهران، خیابان امام خمینی، پلاک ۱۱، مرکز آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو
تلفن: ۶۶۴۰۰۸۱ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۴۰۴۳۳۰ (۰۲۱)
پست الکترونیک: n.rahimifard@fdo.gov.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۵

تاریخ تصویب: ۹۳/۴/۱۴

چکیده

مقدمه: *Heliotropium bacciferum* یکی از گیاهان متعلق به تیره گاوزبان (Boraginaceae) می‌باشد که پراکندگی محدودی در جنوب ایران دارد. اثر آنتی‌باکتریال گونه‌های دیگر جنس *Heliotropium* گزارش شده است ولی گزارشی از این گونه وجود ندارد. هدف: هدف از این تحقیق ارزیابی اثر ضد میکروبی گونه *bacciferum* علیه ۵ سوش باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538)، باسیلوس سرئوس (ATCC 12826)، اشرشیاکلی (ATCC 8739)، سالمونلا انتریتیدیس (ATCC 13311) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 9027) به روش چاهک پلیت و بروث دایلوژن در میکروپلیت می‌باشد. روش بررسی: بعد از جمع‌آوری گیاه از استان هرمزگان واقع در جنوب ایران، بخش هوایی آن در سایه خشک و پودر شده و عصاره تام متانولی آن به روش خیساندن (masseration) تهیه شد. فراکسیون‌های اتردپترولی، کلروفرمی، اتیل استاتی، متانولی و آبی آن به ترتیب به روش Liquid - Liquid fractionation از عصاره تام تهیه شد. جهت بررسی اثر ضدباکتریایی علیه سوش‌های مذکور برای تعیین MIC به روش میکرو دایلوژن متد در میکروپلیت (Microplate) و چاهک پلیت (Cap plate method)، در ظروف تمیز، تیره و در جای خنک نگهداری شدند. نتایج: MIC عصاره و فراکسیون‌های به دست آمده بر روی سویه‌های میکروبی استفاده شده در روش چاهک پلیت از ۷/۶ تا ۲۵۰ µg/ml و در روش میکروپلیت از ۷/۶ تا ۱۲۵ µg/ml به دست آمد. نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که عصاره‌های گیاه *H. bacciferum* اثر ضد میکروبی خوبی علیه سوش‌های ذکر شده دارند و در میان عصاره‌ها، اثر ضد میکروبی بخش آبی آن از سایر فراکشن‌های دیگر بیشتر می‌باشد و پس از بخش آبی، عصاره متانولی بیشترین اثر را دارد.

گل‌واژگان: *Heliotropium bacciferum*، اثر ضد میکروبی، حداقل غلظت مهارکنندگی، چاهک پلیت، میکروپلیت



مقدمه

پرکولاتور ۲۵۰ سی سی قرار داده و روی آن حدود ۱۵۰ سی سی متانول ۸۰ درصد ریخته شد. پس از ۴ روز عصاره به دست آمده تخلیه و دوبار هر بار با ۱۵۰ سی سی متانول گیاه شستشو داده شد. عصاره به دست آمده در دمای محیط تغلیظ شد. وزن ۲۵ گرم عصاره به دست آمد که این عصاره با حلال‌های اتردوپترول، اتیل استات و کلرفرمی به میزان 10×20 سی سی از هر کدام استخراج شد، عصاره‌ها و فراکسیون‌های استخراج شده در ظروف تیره پس از خشک شدن کامل، در یخچال نگهداری شدند.

برای انجام آزمایش‌های ضد میکروبی از کشت‌های ذخیره میکروبی که فریز شده‌اند، استفاده شد. بدین ترتیب که از کشت‌های میکروبی ذخیره شده در لوله‌های حاوی محیط کشت TSB تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا میکروارگانیسم‌ها رشد کرده و فعال شوند، سپس از سوسپانسیون باکتری‌های رشد یافته بر روی پلیت حاوی محیط کشت TSA کشت و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا میکروارگانیسم‌ها رشد یابند. سپس از این پلیت‌های حاوی کشت تازه (یک روزه) میکروارگانیسم‌ها برای انجام آزمایش‌های ضد میکروبی استفاده شد.

بررسی اثر ضد میکروبی به روش Cap plate method

سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل با استاندارد ۰/۵ مک فارلند (۰/۵ میلی‌لیتر کلرید باریم ۱/۱۷۵ درصد + ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱ درصد) تهیه شد. این سوسپانسیون میکروبی دارای $10^8 \times 1/5$ cfu/ml باکتری می‌باشد. پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی از هر میکروب، آنها را در سطح پلیت‌های مولر هیتون تازه ساخته شده به طور یکنواخت با سواب پنبه‌ای استریل کاملاً پخش کرده تا جذب شود. سپس بر روی محیط کشت هر پلیت ۷ چاهک با کمک پیپت پاستور استریل ایجاد شد. سطح تحتانی هر چاهک توسط $20 \mu\text{l}$ محیط کشت مولر هیتون استریل با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد پوشانده شد. ۴ میلی‌گرم از هر عصاره و

امروزه گیاهان دارویی در عرصه پزشکی جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده‌اند. اگرچه ارزش دارویی گیاهان آن گونه که شایسته است، شناخته شده نیست ولی همین مقدار اندک مطالعاتی که صورت گرفته ارزش حیاتی گیاهان را به عنوان پایه‌ای برای دانش داروسازی نشان می‌دهد [۱].

در طب سنتی ایران، معمولاً ترکیبی از عصاره‌های گیاهی توصیه می‌شود و غالباً این ترکیب در مورد هر فرد بیمار و با توجه به شرایط وی تعیین می‌شود. درمان با گیاهان دارویی در ایران سابقه طولانی دارد به طوری که در منابع پزشکی قدیمی ایران مانند نوشته‌های ابن سینا بخش‌های مفصلی به این موضوع اختصاص داده شده است [۲].

H. bacciferum یکی از گیاهان متعلق به تیره گاوزبان Boraginaceae می‌باشد، که پراکندگی محدودی در جنوب ایران خصوصاً استان هرمزگان دارد. این گیاه آفتاب‌پرست ساحلی نامیده می‌شود. در طب سنتی جنوب ایران برای رفع تب وزخم معده کاربرد دارد [۳]. گیاهان این گونه خاصیت کاهندگی فشارخون و ضد میکروبی دارند.

آلکالوئید Heliotrine، سبب افت فشار خون گذرا در سگ و کاهش قابل توجه نیکوتین به علت پاسخ اسپاسموژنیک وازوپرسور می‌شود [۴].

Heliotropium bacciferum منبع غنی از آلکالوئیدهای pyrrolizidine می‌باشد، که بعضی از آنها دارای خاصیت ضدتومور، ضد میکروبی، ضد دیابتی و خواص antihyperlipedemic می‌باشند [۵].

مواد و روش‌ها

ساقه و برگ گیاه در مهرماه ۱۳۹۱ از استان هرمزگان واقع در جنوب ایران جمع‌آوری توسط گیاه‌شناس آقای مهندس رحمان اسدپور شناسایی شد، شماره هرباریومی آن BHc1012 ثبت شد. سپس در سایه خشک شد. به منظور استخراج بهتر، نمونه خشک شده از گیاه شامل برگ‌ها و ساقه‌ها به وسیله دستگاه آسیاب خرد شدند. ۵۰۰ گرم از سرشاخه برداشته و در



اول ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی اولیه تهیه شده در محیط TSB، اضافه شد. این عملیات در ردیف‌های بعدی، برای سوش‌های دیگر تکرار شد. به عنوان شاهد مثبت از دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و سفالکسین مشابه باخساره و فراکسیون‌ها استفاده شد. همچنین هر سوسپانسیون میکروبی به تنهایی با محیط TSB، هر عصاره به تنهایی با محیط TSB، 10% DMSO به تنهایی، محیط TSB به تنهایی و 10% DMSO به همراه هر یک از سوسپانسیون‌های میکروبی در هر خانه‌ی میکروپلیت به صورت جداگانه به عنوان شاهد و کنترل کیفی روش کار ریخته شد. در انتها تمام Well ها حاوی ۱۰۰ μl محلول می‌باشند. میکروپلیت در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ۲۴ ساعت بعد نتایج خوانده می‌شود و Well هایی که در آن کدورت ایجاد شده، یادداشت می‌شود، غلظت آخرین Well شفاف از سمت چپ به عنوان MIC گزارش شد.

نتایج

نتایج (Minimum inhibitory Concentration) MIC

به وسیله روش Microplate

اثر ضد میکروبی عصاره تام

بررسی نتایج اثر ضد میکروبی عصاره تام نشان داد که این ترکیب در غلظت ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروجینوزا و در غلظت ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد اشیریشیا کلی، سالمونلا اینتریتیدیس می‌شود (شکل شماره ۱) و نمودار شماره ۱).

فراکسیون‌های گیاه *H. bacciferum* را در ویال‌های کوچکی ریخته و با ۲ سی سی 10% DMSO مخلوط، غلظت PPM یا ۲۰۰۰ μg/ml از عصاره و فراکسیون‌ها ساخته شد. سپس رقت‌های مختلف از عصاره و فراکسیون‌های به دست آمده از گیاه مورد نظر به وسیله حلال 10% DMSO تهیه شد، سپس درون چاهک‌های ایجاد شده بر روی پلیت، ۱۰۰ μl از هر رقت ریخته شد. از حلال 10% DMSO نیز به عنوان شاهد منفی استفاده شد. جنتامایسین و سفالکسین نیز به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. بعد از پر شدن چاهک‌ها در پلیت‌ها را گذاشته و اطلاعات مورد نیاز روی آنها نوشته و در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت قرار داده شدند.

تعیین MIC (Minimum inhibitory Concentration)

به وسیله روش Microplate

۴ میلی‌گرم از هر عصاره و فراکسیون‌های گیاه *H. bacciferum* را در ویال‌های کوچکی ریخته و با ۲ سی سی 10% DMSO مخلوط، غلظت اولیه PPM یا ۲۰۰۰ μg/ml از عصاره و فراکسیون‌ها ساخته شد. سپس در تمام Well های میکروپلیت ۹۶ خانه، ۵۰ میکرولیتر 10% DMSO ریخته، سپس در Well اول از سمت چپ ۵۰ میکرولیتر از غلظت اولیه عصاره و فراکسیون‌ها در ردیف‌های مختلف اضافه شد. بدین ترتیب غلظت در اولین چاهک به ۱۰۰۰ μg/ml رسید. پس از آن، از محتویات چاهک اول ۵۰ میکرولیتر برداشته به چاهک دوم اضافه و پس از مخلوط کردن از محتویات چاهک دوم ۵۰ میکرولیتر برداشته به چاهک سوم و الی آخر. در نهایت به هر کدام از چاهک‌های ردیف

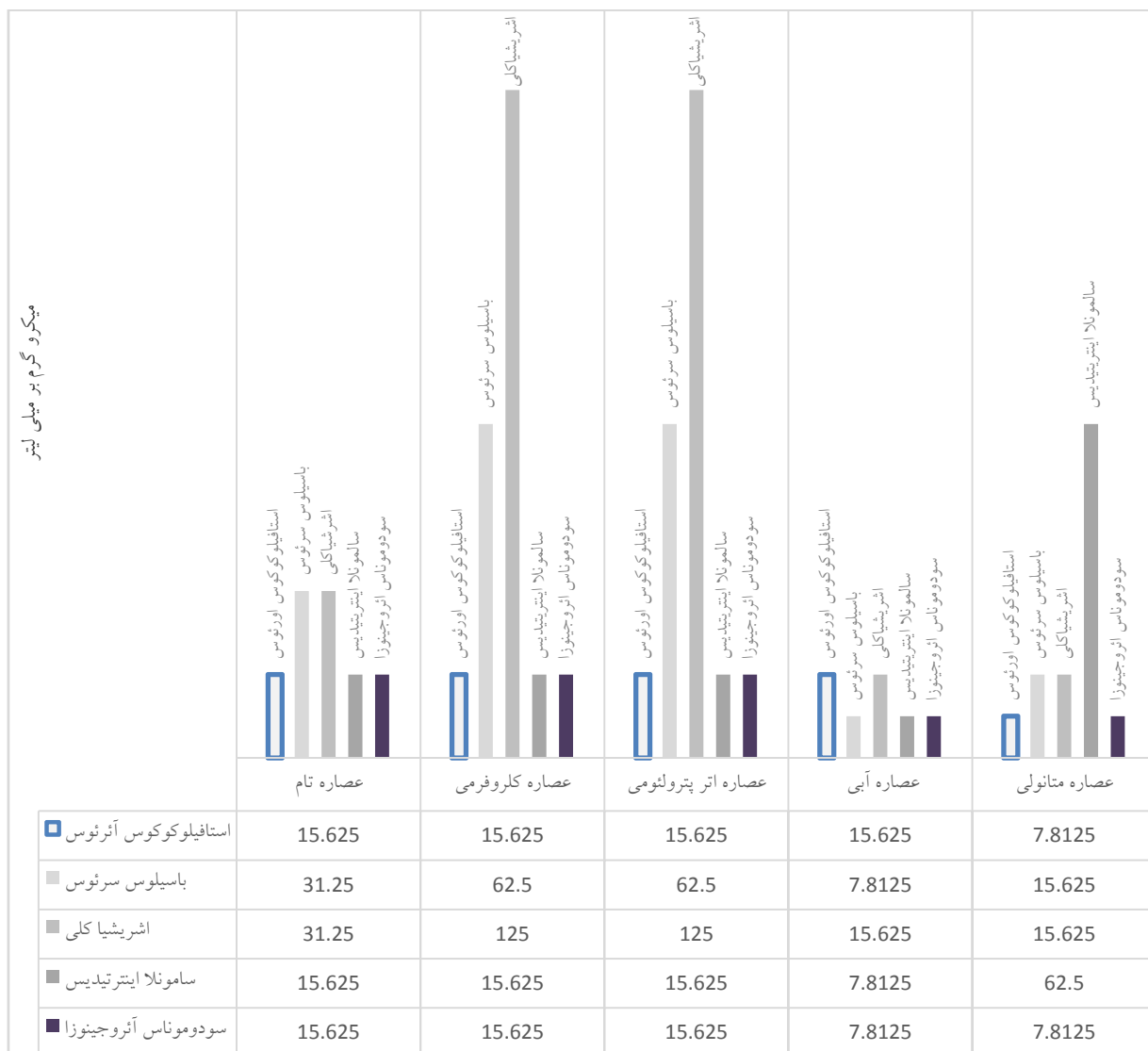
شکل شماره ۱- اثر ضد میکروبی عصاره تام گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت‌های ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر

غلظت (میکروگرم/میلی‌لیتر)	۵۰/۰	۱۰/۰	۲۰/۰	۳۳/۰	۷۷/۰	۱۵۰/۰	۳۰۰/۰	۶۰۰/۰	۱۲۰۰/۰	۲۴۰۰/۰	۴۸۰۰/۰	۹۶۰۰/۰	۱۹۲۰۰/۰	۳۸۴۰۰/۰	۷۶۸۰۰/۰	۱۵۳۶۰۰/۰	۳۰۷۲۰۰/۰	۶۱۴۴۰۰/۰	۱۲۲۸۸۰۰/۰
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اشیریشیا کلی	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سالمونلا اینتریتیدیس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سودوموناس آئروجینوزا	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
باسیلوس سرئوس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- عدم رشد

+ رشد





نمودار شماره ۱- نتایج MIC عصاره‌ی تام، کلروفرمی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* بر روی پنج باکتری

اثر ضد میکروبی فراکسیون کلروفرمی

بررسی نتایج اثر ضد میکروبی فراکسیون کلروفرمی نشان داد که این ترکیب در غلظت ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آتروچینوزا، در غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد سالمونلا اینترتیدیس و در غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد اشرشیا کلی می شود (شکل شماره ۲ و نمودار شماره ۱).

اثر ضد میکروبی فراکسیون اتر پترولئوم

بررسی نتایج اثر ضد میکروبی فراکسیون اتر پترولئوم نشان داد که این ترکیب در غلظت ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آتروچینوزا، در غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد اشرشیا کلی و در غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد سالمونلا اینترتیدیس می شود (شکل شماره ۳ و نمودار شماره ۱).



شکل شماره ۲- اثر ضد میکروبی فراکسیون کلروفومی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت های ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی لیتر

۰/۰۳۵/۰	۱/۰/۰	۸۸۱/۰	۳۳۸/۰	۷۷۳/۰	۱۵۴/۰	۳۵۶/۱	۱۰۹/۲	۱۱۷/۸	۱۶/۵/۱	۵۸/۲۵	۷/۲۶	۵۱	۲۵۰	۰۰	۰۰۱	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	استافیلوکوکوس اورئوس
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	اشریشیا کلی
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	سالمونلا اینترتیدیس
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	سودوموناس آئروجینوزا
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	باسیلوس سرئوس

+ رشد - عدم رشد

شکل شماره ۳- اثر ضد میکروبی فراکسیون اتر پترولومی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی لیتر

۰/۰۳۵/۰	۱/۰/۰	۸۸۱/۰	۳۳۸/۰	۷۷۳/۰	۱۵۴/۰	۳۵۶/۱	۱۰۹/۲	۱۱۷/۸	۱۶/۵/۱	۵۸/۲۵	۷/۲۶	۵۱	۲۵۰	۰۰	۰۰۱	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	استافیلوکوکوس اورئوس
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	اشریشیا کلی
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	سالمونلا اینترتیدیس
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	سودوموناس آئروجینوزا
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	باسیلوس سرئوس

+ رشد - عدم رشد

اثر ضد میکروبی فراکسیون آبی

بررسی نتایج اثر ضد میکروبی فراکسیون آبی نشان داد که این ترکیب در غلظت ۷/۸۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سالمونلا اینترتیدیس و در غلظت ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد اشریشیاکلی و سودوموناس آئروجینوزا می شود (شکل شماره ۴ و نمودار ۱).

اثر ضد میکروبی فراکسیون متانولی

بررسی نتایج اثر ضد میکروبی فراکسیون آبی نشان داد که این ترکیب در غلظت ۷/۸۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا، در غلظت ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد اشریشیاکلی و سالمونلا اینترتیدیس و در غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد باسیلوس سرئوس می شود (شکل شماره ۵ و نمودار شماره ۱).



شکل شماره ۴- اثر ضد میکروبی عصاره‌ی آبی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی لیتر

۰/۰۳۵	۱/۱۰	۱/۱۰	۳۳/۱۰	۷۳/۱۰	۱۸۵/۱۰	۴۵۶/۱	۱۰۶۰/۴	۱۱۷/۸	۱۵/۵۱	۳۱/۲۵	۵/۲۰	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+ رشد - عدم رشد

شکل شماره ۵- اثر ضد میکروبی فراکسیون متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی لیتر

۰/۰۳۵	۱/۱۰	۱/۱۰	۳۳/۱۰	۷۳/۱۰	۱۸۵/۱۰	۴۵۶/۱	۱۰۶۰/۴	۱۱۷/۸	۱۵/۵۱	۳۱/۲۵	۵/۲۰	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

+ رشد - عدم رشد

باکتری گرم منفی اشیریشیا کلی است (جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۲).

سالمونلا اینترتیدیس

نتایج حاصل از جدول شماره ۲ بیانگر آن است که عصاره تام در غلظت ۰/۰ ± ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر (ttest p value < ۰/۰۰۰۱)، عصاره کلروفرمی در غلظت ۱۰/۴۲ ± ۵۲/۰۸ میکروگرم بر میلی لیتر (ttest p value = ۰/۰۱۱۱) و عصاره پترولئومی در غلظت ۰/۰ ± ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر (ttest p value < ۰/۰۰۰۱) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم منفی سالمونلا اینترتیدیس هستند. عصاره آبی در

نتایج چاهک پلیت در باکتری های گرم منفی اشیریشیا کلی

نتایج حاصل از جدول شماره ۱ بیانگر آن است که عصاره تام متانولی در غلظت ۰/۰ ± ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر (ttest p value < ۰/۰۰۰۱)، فراکسیون کلروفرمی و اتر پترولئومی در غلظت ۰/۰ ± ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر (ttest p value < ۰/۰۰۰۱)، فراکسیون آبی در غلظت ۵/۲۰۸ ± ۲۰/۸۳ میکروگرم بر میلی لیتر (ttest p value = ۰/۰۴۳۸) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم منفی اشیریشیا کلی هستند. عصاره متانولی در غلظت ۲/۶ ± ۱۰/۴۲ میکروگرم بر میلی لیتر (ttest p value = ۰/۱۴۸۱) قادر به جلوگیری از رشد

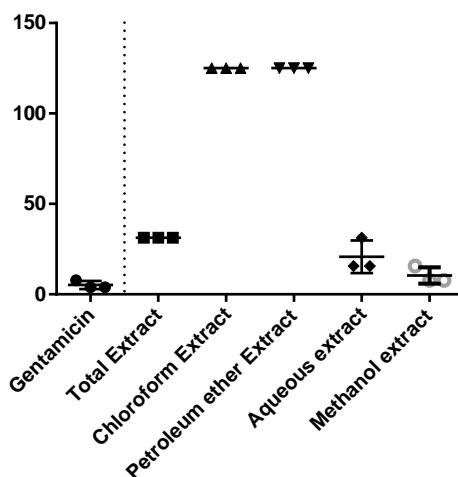


غلظت $7/813 \pm 0/0$ میکروگرم بر میلی لیتر (ttest p value = $0/1161$) گرم منفی سالمونلا اینترتیدیس اند (جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۳).
 و عصاره متانولی در غلظت $13/02 \pm 2/6$ میکروگرم بر میلی لیتر (ttest p value = $0/06$) قادر به جلوگیری از رشد باکتری

جدول شماره ۱- میانگین و انحراف معیار MIC عصاره‌ی تام، فراکسیون‌های کلروفومی، اتر پترولنومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا $0/35175$ میکرو گرم در میلی لیتر و جنتامیسین به روش میکرودايلوشن در باکتری گرم منفی اشريشیاکلی

حداقل غلظت عدم رشد (میکروگرم بر میلی لیتر)
(میانگین \pm انحراف از معیار)

ttest p value	عصاره و فراکسیون‌ها					باکتری گرم منفی
	جنتامیسین	متانولی	آبی	اتر پترولنومی	کلروفومی	
$< 0/0001$						$31/25 \pm 0/0$
$< 0/0001$					$125 \pm 0/0$	
$< 0/0001$	$5/208 \pm 1/302$			$125 \pm 0/0$		اشريشیاکلی
$0/0438$			$20/83 \pm 5/208$			
$0/1481$		$10/42 \pm 2/6$				



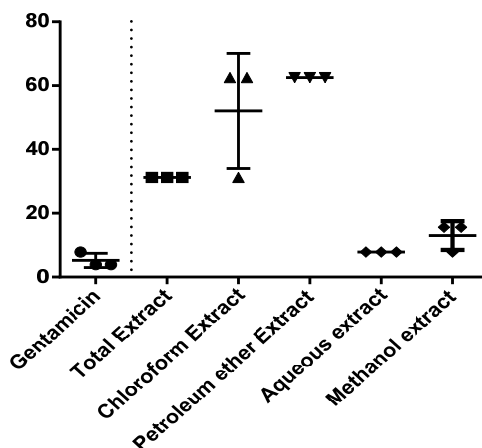
نمودار شماره ۲- میانگین و انحراف از معیار MIC عصاره‌ی تام، فراکسیون‌های کلروفومی، اتر پترولنومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا $0/35175$ میکروگرم در میلی لیتر و جنتامیسین به روش میکرودايلوشن در باکتری گرم منفی اشريشیاکلی



جدول شماره ۲- میانگین و انحراف معیار MIC عصاره‌ی تام، فراکسیون‌های کلروفومی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و جنتامیسین به روش میکرودايلوشن در باکتری گرم منفی سالمونلا اینترتیدیس

حداقل غلظت عدم رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
(میانگین ± انحراف از معیار)

ttest p value	جنتامیسین	عصاره و فراکسیون‌ها					باکتری گرم منفی
		متانولی	آبی	اتر پترولئومی	کلروفومی	تام	
< ۰/۰۰۰۱						۳۱/۲۵ ± ۰/۰	سالمونلا اینترتیدیس
۰/۰۱۱۱					۵۲/۰۸ ± ۱۰/۴۲		
< ۰/۰۰۰۱	۵/۲۰۸ ± ۱/۳۰۲			۶۲/۵ ± ۰/۰			
۰/۱۱۶۱			۷/۸۱۳ ± ۰/۰				
۰/۰۶		۱۳/۰۲ ± ۲/۶					



نمودار شماره ۳- میانگین و انحراف معیار MIC عصاره‌ی تام، فراکسیون‌های کلروفومی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت سریال ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و جنتامیسین به روش میکرودايلوشن در باکتری گرم منفی سالمونلا اینترتیدیس

گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا هستند. فراکسیون آبی با غلظت $۱۳/۰۲ \pm ۲/۶۰۴$ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($ttest p value = ۰/۰۶$) و فراکسیون متانولی در غلظت $۷/۸۱۳ \pm ۰/۰$ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($ttest p value = ۰/۱۱۶۱$) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا هستند (جدول شماره ۳ و نمودار شماره ۴).

سودوموناس آئروجینوزا

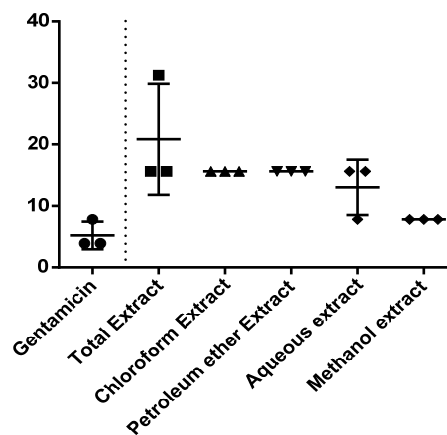
نتایج حاصل از جدول شماره ۳ بیانگر آن است که عصاره تام با غلظت $۲۰/۸۳ \pm ۵/۲۰۸$ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($ttest p value = ۰/۰۴۳۷$) و فراکسیون کلروفومی و اتر پترولئومی با غلظت $۱۵/۶۳ \pm ۰/۰$ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($ttest p value = ۰/۰۱۳$) قادر به جلوگیری از رشد باکتری



جدول شماره ۳- میانگین و انحراف معیار MIC عصاره‌ی تام، فراکسیون‌های کلروفرمی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت سریال ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و جنتامیسین به روش میکروداپلوشن در باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا

ttest p value	جنتامیسین	عصاره و فراکسیون‌ها				باکتری گرم منفی
		متانولی	آبی	اتر پترولئومی	کلروفرمی	
۰/۰۴۳۷					تام	۲۰/۸۳ ± ۵/۲۰۸
۰/۰۰۱۳					کلروفرمی	۱۵/۶۳ ± ۰/۰
۰/۰۰۱۳	۵/۲۰۸ ± ۱/۳۰۲				اتر پترولئومی	۱۵/۶۳ ± ۰/۰
۰/۰۰۶			۱۳/۰۲ ± ۲/۶۰۴			
۰/۱۱۶۱		۷/۸۱۳ ± ۰/۰				

سودوموناس آئروجینوزا



نمودار شماره ۴- میانگین و انحراف معیار MIC عصاره‌ی تام، فراکسیون‌های کلروفرمی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت سریال ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و جنتامیسین به روش میکروداپلوشن در باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا

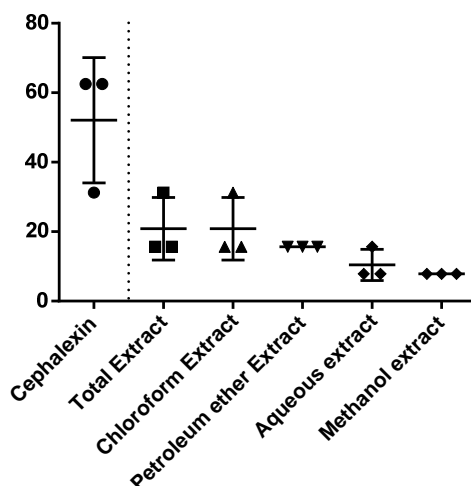
میلی‌لیتر (ttest p value=۰/۰۱۳۲) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس هستند. عصاره تام و فراکسیون کلروفرمی در غلظت $۲۰/۸۳ \pm ۵/۲۰۸$ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value=۰/۰۰۶) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس هستند (جدول شماره ۴ و نمودار شماره ۵).

باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نتایج حاصل از جدول شماره ۴ بیانگر آن است که فراکسیون اتر پترولئومی در غلظت $۱۵/۶۳ \pm ۰/۰$ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value=۰/۰۲۴۹)، فراکسیون آبی در غلظت $۱۰/۴۲ \pm ۲/۶۰۴$ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value=۰/۰۱۷۸)، و فراکسیون متانولی در غلظت $۷/۸۱۳ \pm ۰/۰$ میکروگرم بر



جدول شماره ۴- میانگین و انحراف معیار MIC عصاره‌ی تام، فراکسیون‌های کلروفرمی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و سفالکسین به روش میکرودايلوشن در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس

ttest p value	سفالکسین	عصاره و فراکسیون‌ها				باکتری گرم منفی
		متانولی	آبی	اتر پترولئومی	کلروفرمی	
۰/۰۶					۲۰/۸۳ ± ۵/۲۰۸	استافیلوکوکوس اورئوس
۰/۰۶				۲۰/۸۳ ± ۵/۲۰۸		
۰/۰۲۴۹	۵۲/۰۸ ± ۱۰/۴۲			۱۵/۶۳ ± ۰/۰		
۰/۰۱۷۸			۱۰/۴۲ ± ۲/۶۰۴			
۰/۰۱۳۲		۷/۸۱۳ ± ۰/۰				



نمودار شماره ۵- میانگین و انحراف معیار MIC عصاره‌ی تام، فراکسیون‌های کلروفرمی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و سفالکسین به روش میکرودايلوشن در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس

گرم مثبت باسیلوس سرئوس هستند. عصاره تام در غلظت ۲۰/۸۳ ± ۵/۲۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value=۰/۰۶) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس است (جدول شماره ۵ و نمودار شماره ۶).

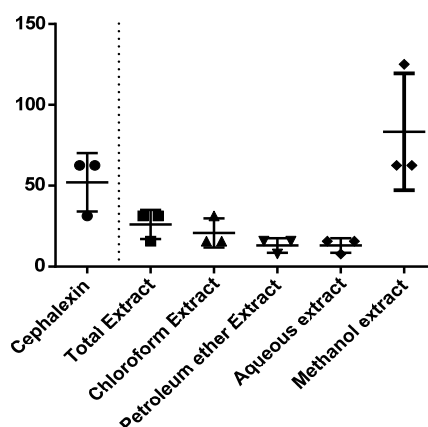
باسیلوس سرئوس

نتایج حاصل از جدول شماره ۵ بیانگر آن است که فراکسیون‌های اتر پترولئومی و آبی در غلظت ۱۳/۰۲ ± ۲/۶۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value=۰/۰۲۲۰) و فراکسیون متانولی در غلظت ۲۰/۸۳ ± ۸۳/۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value=۰/۰۱۳۲) قادر به جلوگیری از رشد باکتری



جدول شماره ۵- میانگین و انحراف معیار MIC عصاره‌ی تام، فراکسیون‌های کلروفرمی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی لیتر و سفالکسین به روش میکرودايلوشن در باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس حداقل غلظت عدم رشد (میکروگرم بر میلی لیتر) (میانگین ± انحراف از معیار)

ttest p value	عصاره و فراکسیون‌ها					باکتری گرم منفی
	سفالکسین	متانولی	آبی	اتر پترولئومی	کلروفرمی	
۰/۰۸۹۰						۲۶/۰۴ ± ۵/۲۰۸
۰/۰۶					۲۰/۸۳ ± ۵/۲۰۸	باسیلوس سرئوس
۰/۰۲۲۰	۵۲/۰۸ ± ۱۰/۴۲			۱۳/۰۲ ± ۲/۶۰۴		
۰/۰۲۲۰			۱۳/۰۲ ± ۲/۶۰۴			
۰/۰۱۳۲		۸۳/۳۳ ± ۲۰/۸۳				



نمودار شماره ۶- مقایسه میانگین و انحراف معیار MIC عصاره‌ی تام، فراکسیون‌های کلروفرمی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی لیتر و سفالکسین به روش میکرودايلوشن در باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس

میانگین نتایج در جدول شماره‌های ۶ و ۷ نمایش داده شده‌اند:

جدول شماره ۶- نتایج حاصل از MIC (μg/ml) گیاه *H. bacciferum* به روش میکرودايلوشن در میکروپلیت

استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس	<i>E. coli</i>	سالمونلا انتریتیدیس	پسودوموناس آئروژینوزا	عصاره تام
۱۵/۷۵	۱۵/۷۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۵/۷۵	عصاره تام
۱۵/۷۵	۱۵/۷۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۵/۷۵	فراکسیون کلروفرمی
۱۵/۷۵	۱۵/۷۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۵/۷۵	فراکسیون اتر و پترولی
۷/۶	۷/۶	۱۵/۷۵	۷/۶	۱۵/۷۵	فراکسیون آبی
۷/۶	۶۲/۵	۱۵/۷۵	۱۵/۷۵	۷/۶	فراکسیون متانولی



جدول شماره ۷- نتایج MIC ($\mu\text{g/ml}$) حاصل از چاهک پلیت گیاه *H. bacciferum*

پسودوموناس آئروژینوزا	سالمونلا انتریتیدیس	<i>Ecoli</i>	باسیلوس سرئوس	استافیلوکوکوس اورئوس	عصاره تام متانولی
۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	عصاره کلروفرمی
۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۷/۶	۳۱/۲۵	عصاره اترودپترولی
۳۱/۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	عصاره آبی
۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۵/۷۵	۷/۶	۱۵/۷۵	عصاره متانولی
۱۵/۷۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۲۵	۱۵/۷۵	

اثر ضدباکتری عصاره گیاه *H. sinuatum* را با ترکیبات بلند زنجیره الکلی و کتونی مرتبط دانسته‌اند [۸]. همچنین اثر ضد میکروبی *H. ellipticum* را به اترونها و تری‌ترپنوئیدهای موجود در این گیاه مرتبط دانسته‌اند [۹].

عصاره‌های کلروفرمی، اتیل استاتی، متانولی و آبی *Heliotropium marifolium* بررسی شده و نتایج خاصیت ضد میکروبی را نشان داده‌اند [۱۰].

چهار آلکالوئید pyrrolizidine از *Heliotropium bacciferum* جدا شده و به عنوان theleurine، supinine و europine مشخص شده‌اند [۱۱].

با توجه به تحقیقات انجام شده که در گذشته بر روی اثرات متنوع عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان مختلف انجام شده [۱۸-۱۲] و تحقیقاتی که بر روی این گیاه صورت گرفته است اثر ضدباکتریایی این گیاه قابل توجه و مشخص بوده و در مقایسه با گیاهان دیگر نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره و فراکسیون‌های گیاه *Heliotropium bacciferum* اثر ضد میکروبی خوبی علیه سوش‌های باکتری شامل استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا انتریتیدیس، پسودوموناس آئروژینوزا دارد و در میان آنها اثر ضد میکروبی بخش آبی آن بیشتر از سایر فراکشن‌ها می‌باشد و بعد از آن عصاره متانولی نتایج قابل قبولی داشته است. بیشترین نتایج MIC در غلظت‌های $7/6 \mu\text{g/ml}$ تا $62/5 \mu\text{g/ml}$ بوده است که اثربخشی خوبی می‌باشد.

با توجه به بررسی‌های انجام شده بر روی این گیاه انتظار می‌رود این گیاه اثر ضد میکروبی مناسبی داشته باشد و در غلظت کم، دارای اثر ضد میکروبی حتی بهتری نسبت به

همچنین نتیجه MIC جتتامایسین روی سوش اشرشیاکلی $5 \mu\text{g/ml}$ و سفالکسین روی سوش استافیلوکوکوس اورئوس $62/5 \mu\text{g/ml}$ بود.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که اثر ضد میکروبی فراکسیون آبی گیاه *Heliotropium bacciferum* به مراتب بیشتر از اثر عصاره و فراکسیون‌های دیگر این گیاه است و بخش متانولی پس از آن قرار دارد.

با توجه به گزارش‌های از گونه‌های دیگر این گیاه و اثر ضدباکتریایی مشاهده شده، اثر ضدباکتریایی این گونه گیاه (*Heliotropium bacciferum*) نیز بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، *Ecoli* باسیلوس سرئوس، سالمونلا انتریتیدیس و پسودوموناس آئروژینوزا در این تحقیق مشخص شد.

بحث

در تحقیقات انجام شده بر روی دیگر گونه‌های *Heliotropium* مانند *H. indicum* اثر ضدباکتری از این گونه‌ها گزارش شده بود که نتایج قابل توجه ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشته‌اند. ترکیبات آلکالوئیدی این گیاه اثر ضدالتهاپی، بهبوددهنده زخم، ضد عفونی کننده و ضد میکروبی را نشان داده‌اند.

Eicosapentenoic acid که یک omega-3 fatty acid است، در این گیاه وجود دارد که در استریل کردن زخم‌ها و محافظت از زخم در برابر میکروب‌ها مناسب می‌باشد [۶]. در آنالیز فیتوشیمی‌کال همه عصاره‌ها و فراکسیون‌های این گیاه مشخص شده که فعالیت ضد میکروبی به دلیل وجود ترکیبات فنولی می‌باشد [۷].



امید است در آینده تحقیقات بیشتری در زمینه اثر ضد میکروبی این گیاه بر گونه‌های مختلف میکروبی انجام گرفته و با یافتن مواد مؤثره ضد میکروبی این گیاه و فرمولاسیون آن و تهیه اشکال دارویی مختلف از آن، قدم ارزنده‌ای جهت بیماری‌هایی که به وسیله گونه‌های مختلف میکروبی ایجاد می‌شوند، برداشته شود.

سفالکسین نشان داده است. لذا پیشنهاد می‌شود جداسازی و خالص‌سازی ترکیبات ضد میکروبی موجود در عصاره گیاه انجام شود و عامل اصلی ایجاد کننده اثر ضد میکروبی را شناسایی کرده تا شاید بتوان با تعیین ساختمان مولکولی این ترکیبات، فرآورده‌های ضد میکروب مؤثری را معرفی نمود، همچنین پیشنهاد می‌شود اثر ضد میکروبی سایر فراکشن‌های این گیاه بررسی شود.

منابع

- Zehzad B. Protected zone biosystem protection organization publication. 1996, pp: 70.
- Davies J and Webb V. The emerging infection. Sandiego: Academic press; 1998, Chapter 8, p: 72 - 229.
- Mozaffarian V. Encyclopedia of Iranian Plants. 5th Edition. Ghadiani Publication. 2007, pp: 211.
- Zargari A. Medicinal plants. 7th Edition. Tehran university publication. 2011, pp: 526 - 49.
- Khasawneh M, Hamza A and Fawzi N. Antioxidant activity and phenolic content of some emirates medicinal plants. *Advances in Food Sci.* 2010; 32: 62 - 6.
- Oluwatoyin SM, Ieogbulam NG and Joseph A. Phytochemical and antimicrobial studies on the aerial part of *Heliotropium indicum* Linn. *Annal. Biol. Res.* 2001; 2 (2): 129 - 36.
- Nethaji S and Manokaran C. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Heliotropium indicum* L. and *Coldenia procumbens* L. *J. Pure and Applied Microbiol.* 2009; 3 (1): 195 - 8.
- Modak B, Torres R, Wilkens M and Urzua A. Antimicrobial activity of compounds isolated of the resinous exudate from *Heliotropium sinuatum* on phytopathogenic bacterial. *J. Chil. Chem. Soc.* 2003; 49 (1): 717 - 20.
- Jain Sc, Singh B and Jain R. Antimicrobial activity of tritopenoids from *Heliotropium ellipticum*. *Fitotrapia* 2001; 72 (6): 666 - 8.
- Radhal R, Lata T and Rajendran N.N. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of *Heliotropium marifolium* Retz. *J. Natural Remedies* 2003; 3 (2): June, 208 - 11.
- Farrag N M, Abdel-Aziz E M, El-Shafae AM, Ateya A M and Domiaty M M El. Pyrrolizidine Alkaloids of *Heliotropium bacciferum* Forssk from Egypt. *Pharmaceutical Biol.* 1996; 34 (5): 374 - 7.
- Larypoor M, Akhavansepahy A, Rahimifard N and Rashedi H. Antidermatophyte activity of the essential oil of *Hypericum perforatum* of North of Iran. *J. Med. Plants* 2009; 8 (31): 110 - 7.
- Rahimifard N, Sabzevari O, Shoeibi Sh, Pakzad SR, Ajdari S, Hajimehdipoor H, Bagheri F and Safae M. Antifungal activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* on *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. *Biomed. Pharmacol. J.* 2008; 1 (1): 43 - 6.
- Rahimifard N, Sabzevari O, Shoeibi Sh, Pakzad SR, Ajdari S, Hajimehdipoor, H, Bagheri F and Bagheri A. Antifungal activity of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* on *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. *Biomed. Pharmacol. J.* 2008; 1 (1): 85 - 8.
- Rahimifard N. Antifungal activity of native essential oil of *Zataria multiflora* on *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* from Iran. *Biomed. Pharmacol. J.* 2008; 1 (2): 289 - 92.



- 16.** Rahimifard N. Antifungal activity of native essential oil of *Thymus vulgaris* on *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* from Iran. *J. Pure Applied Microbiol.* 2008; 2 (2): 343 – 6.
- 17.** Shoeibi Sh, Hajimehdipoor H, Rahimifard N, Rezazadeh Sh, Hasanloo T, Bagheri F and Amini A. Comparative study on anti-*Helicobacter pylori*

effects of licorice roots collected from different regions of Iran. *J. Med. Plants* 2010; 9 (36): 43 – 47, 214.

- 18.** Rahimifard N, Rabiei M, Beitollahi L and Ahi K. *Helicobacter pylori* and the herbal compound effect. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia.* 2012; 7 (2): 647 - 9.

