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

ناهید رحیمی‌فرد[1*]، الهام باقری[2]، ژینوس عسگرپناه[3]، بابک کبیری بالاجاده[4]، حمیدرضا یزدی[4]

۱- دانشیار، مرکز آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان وآموزش پزشکی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- دکترای داروسازی،گروه فارماکوگنوزی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- استادیار، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
٤- 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: ٦٦٤٠٠٠٨١ (۰۲۱)، نمابر: ٦٦٤٠٤٣٣٠ (۰۲۱)
پست الکترونیک: n.rahimifard@fdo.gov.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۵ **تاریخ تصویب:** ۹۳/٤/۱٤

چکیده

مقدمه: *Heliotropium bacciferum* یکی از گیاهان متعلق به تیره گاوزبان (Boraginaceae) می‌باشد که پراکندگی محدودی در جنوب ایران دارد. اثر آنتی‌باکتریال گونه‌های دیگرجنس *Heliotropium* گزارش شده است ولی گزارشی از این گونه وجود ندارد.

هدف: *هدف از این تحقیق* ارزیابی اثر ضدمیکروبی 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 دایلوشن 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 دایلوشن 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 ۷/٦ تا ۲۵۰ µg/ml و در روش میکروپلیت از ۷/٦ تا ۱۲۵ µg/ml به دست آمد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که عصاره‌های گیاه *H. bacciferum* اثر ضدمیکروبی خوبی علیه سوش‌های ذکر شده دارند و در میان عصاره‌ها، اثر ضدمیکروبی 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

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

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 ابن‌سینا 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 [٤].

Heliotropium bacciferum منبع غنی از آلکالوئیدهای pyrrolizidine می‌باشد، که بعضی از آنها دارای خاصیت ضدتومور، ضدمیکروبی، ضددیابتی 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 پرکولاتور ۲۵۰ سی‌سی قرار داده و روی آن حدود ۱۵۰ سی‌سی متانول ۸۰ درصد ریخته شد. پس از ٤ 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 ۲۰ × ۱۰ 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 ضدمیکروبی از کشت‌های ذخیره میکروبی که فریز شده‌اند، استفاده شد. بدین‌ترتیب که از کشت‌های میکروبی ذخیره شده در لوله‌های حاوی محیط کشت TSB تلقیح و به مدت ٢٤ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده 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 ٢٤ 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 $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/ml باکتری می‌باشد. پس ازتهیه سوسپانسیون میکروبی از هر میکروب، آنها را در سطح پلیت‌های مولر هینتون 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 ۲۰ µl محیط کشت مولر هینتون استریل با دمای ٤۵ درجه سانتی‌گراد پوشانده شد. ٤ میلی‌گرم از هر عصاره و

Archive of SID
www.SID.ir

فراکسیون‌های گیاه *H. bacciferum* را در ویال‌های کوچکی ریخته و با ۲ سی سی DMSO 10% 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 DMSO 10% تهیه شد، سپس درون چاهک‌های ایجاد شده بر روی پلیت، ۱۰۰ µl از هر رقت ریخته شد. از حلال DMSO 10% 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 ۲٤ ساعت قرار داده شدند.

تعیین MIC (Minimum inhibitory Concentration) به وسیله روش Microplate

٤ میلی‌گرم از هر عصاره و فراکسیون‌های گیاه *H. bacciferum* را در ویال‌های کوچکی ریخته و با ۲ سی‌سی DMSO 10% مخلوط، غلظت اولیه PPM یا ۲۰۰۰ µg/ml از عصاره و فراکسیون‌ها ساخته شد. سپس در تمام Well های میکروپلیت ۹٦ خانه، ۵۰ میکرولیتر DMSO 10% ریخته، سپس در Well اول از سمت چپ ۵۰ میکرولیتر از غلظت اولیه عصاره و فراکسیون‌ها در ردیف‌های مختلف اضافه شد. بدین‌ترتیب 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 اول ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی اول 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 باخصازه و فراکسیون‌ها استفاده شد. همچنین هر سوسپانسیون میکروبی به تنهایی با محیط TSB، هر عصاره به تنهایی با محیط TSB، DMSO 10% به تنهایی، محیط TSB به تنهایی و DMSO 10% 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. ۲٤ 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 MIC (Minimum inhibitory Concentration) به وسیله روش Microplate

اثر ضد میکروبی عصاره تام

بررسی نتایج اثر ضد میکروبی عصاره تام نشان داد که این ترکیب در غلظت ۱۵/٦۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروجینوزا و در غلظت ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد اشریشیا کلی، سالمونلا اینتریتیدیس می‌شود (شکل شماره ۱ و نمودار شماره ۱).

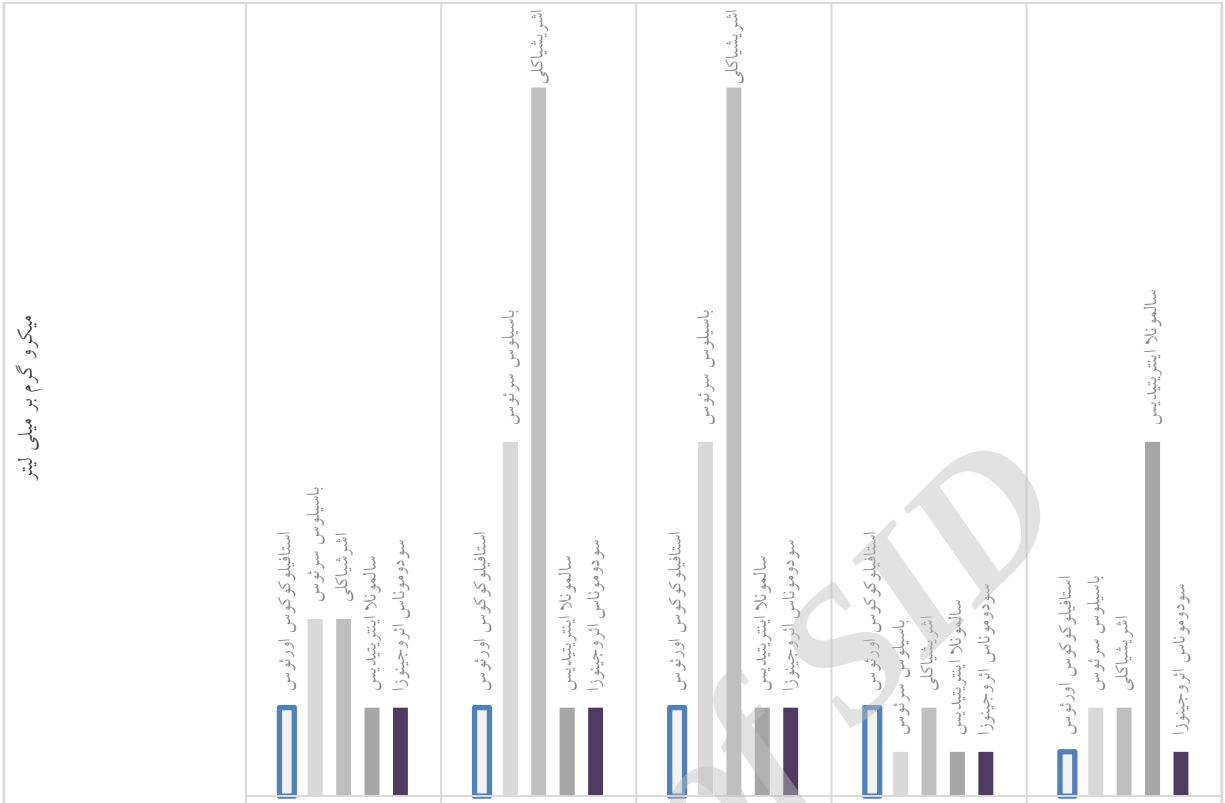
شکل شماره ۱- اثر ضدمیکروبی عصاره تام گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت‌های ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر

	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۷/۸۱۲	۳/۹۰۶	۱/۹۵۳	۰/۹۷۶	۰/۴۸۸	۰/۲۴۴	۰/۱۲۲	۰/۰۶۱	۰/۰۳۵
استافیلوکوکوس اورئوس	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اشریشیا کلی	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سالمونلا اینتریتیدیس	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سودوموناس آئروجینوزا	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
باسیلوس سرئوس	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ رشد – عدم رشد

Archive of SID

www.SID.ir



	عصاره تام	عصاره کلروفرمی	عصاره اتر پترولئومی	عصاره آبی	عصاره متانولی
استافیلوکوکوس آئرئوس	15.625	15.625	15.625	15.625	7.8125
باسیلوس سرئوس	31.25	62.5	62.5	7.8125	15.625
اشریشیا کلی	31.25	125	125	15.625	15.625
سامونلا اینترتیدیس	15.625	15.625	15.625	7.8125	62.5
سودوموناس آئروجینوزا	15.625	15.625	15.625	7.8125	7.8125

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

اثر ضدمیکروبی فراکسیون کلروفرمی

بررسی نتایج اثر ضدمیکروبی فراکسیون کلروفرمی نشان داد که این ترکیب در غلظت ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سودوموموناس آئروجینوزا، در غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد سالمونلا اینتریتیدیس و در غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد اشریشیا کلی می‌شود (شکل شماره ۲ و نمودار شماره ۱).

اثر ضدمیکروبی فراکسیون اتر پترولئوم

بررسی نتایج اثر ضدمیکروبی فراکسیون اتر پترولئوم نشان داد که این ترکیب در غلظت ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروجینوزا، در غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد اشریشیاکلی و در غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد سالمونلااینترتیدیس می‌شود (شکل شماره ۳ و نمودار شماره ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

شکل شماره ۲- اثر ضدمیکروبی فراکسیون کلروفرمی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت‌های ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر

	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۷/۸۱۲	۳/۹۰۶	۱/۹۵۳	۰/۹۷۶	۰/۴۸۸	۰/۲۴۴	۰/۱۲۲	۰/۰۶۱	۰/۰۳۵
استافیلوکوکوس اورئوس	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اشریشیا کلی	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سالمونلا اینتریتیدیس	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سودوموناس آئروجینوزا	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
باسیلوس سرئوس	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ رشد − عدم رشد

شکل شماره ۳- اثر ضدمیکروبی اتر پترولئومی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر

	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۷/۸۱۲	۳/۹۰۶	۱/۹۵۳	۰/۹۷۶	۰/۴۸۸	۰/۲۴۴	۰/۱۲۲	۰/۰۶۱	۰/۰۳۵
استافیلوکوکوس اورئوس	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اشریشیا کلی	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سالمونلا اینتریتیدیس	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سودوموناس آئروجینوزا	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
باسیلوس سرئوس	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ رشد − عدم رشد

اثر ضدمیکروبی فراکسیون آبی

بررسی نتایج اثر ضدمیکروبی فراکسیون آبی نشان داد که این ترکیب در غلظت ۷/۸۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سالمونلا اینترتیدیس و در غلظت ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع رشد اشریشیاکلی و سودوموناس آئروجینوزا می‌شود (شکل شماره ٤ و نمودار ۱).

اثر ضدمیکروبی فراکسیون متانولی

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

Archive of SID

www.SID.ir

شکل شماره ٤- اثر ضدمیکروبی عصاره‌ی آبی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر

	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۷/۸۱۲	۳/۹۰۶	۱/۹۵۳	۰/۹۷۶	۰/۴۸۸	۰/۲۴۴	۰/۱۲۲	۰/۰۶۱	۰/۰۳۵
استافیلوکوکوس اورئوس	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اشریشیا کلی	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سالمونلا اینتریتیدیس	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
سودوموناس آئروجینوزا	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
باسیلوس سرئوس	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

+ رشد - عدم رشد

شکل شماره ۵- اثر ضدمیکروبی فراکسیون متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر

	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۷/۸۱۲	۳/۹۰۶	۱/۹۵۳	۰/۹۷۶	۰/۴۸۸	۰/۲۴۴	۰/۱۲۲	۰/۰۶۱	۰/۰۳۵
استافیلوکوکوس اورئوس	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
اشریشیا کلی	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سالمونلا اینتریتیدیس	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سودوموناس آئروجینوزا	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
باسیلوس سرئوس	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ رشد - عدم رشد

نتایج چاهک پلیت در باکتری های گرم منفی

اشریشیا کلی

نتایج حاصل از جدول شماره ۱ بیانگر آن است که عصاره تام متانولی در غلظت ۰/۰ ± ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value< ۰/۰۰۰۱)، فراکسیون کلروفرمی و اتر پترولئومی در غلظت ۰/۰ ± ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value< ۰/۰۰۰۱)، فراکسیون آبی در غلظت ۵/۲۰۸ ± ۲۰/۸۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value = ۰/۰۴۳۸) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم منفی اشریشیا کلی هستند. عصاره متانولی در غلظت ۲/٦ ± ۱۰/٤۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value = ۰/۱٤۸۱) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم منفی اشریشیا کلی است (جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۲).

سالمونلا اینتریتیدیس

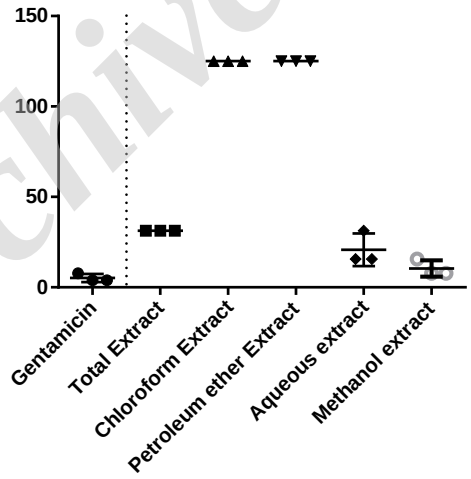
نتایج حاصل از جدول شماره ۲ بیانگر آن است که عصاره تام در غلظت ۰/۰ ± ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value < ۰/۰۰۰۱)، عصاره کلروفرمی در غلظت ۱۰/٤۲ ± ۵۲/۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value = ۰/۰۱۱۱) و عصاره پترولئومی در غلظت ۰/۰ ± ٦۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value < ۰/۰۰۰۱) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم منفی سالمونلا اینترتیدیس هستند. عصاره آبی در

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت ۰/۰ ± ۷/۸۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value = ۰/۱۱۶۱) و عصاره متانولی در غلظت ۲/٦ ± ۱۳/۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value = ۰/۰٦) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم منفی سالمونلا اینترتیدیس اند (جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۳).

جدول شماره ۱- میانگین و انحراف معیار MIC عصاره‌ی تام، فراکسیون‌های کلروفرمی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر و جنتامیسین به روش میکرودایلوشن در باکتری گرم منفی اشریشیاکلی

باکتری گرم منفی	حداقل غلظت عدم رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر) (میانگین ± انحراف از معیار) عصاره و فراکسیون‌ها						ttest p value
	تام	کلروفرمی	اتر پترولئومی	آبی	متانولی	جنتامیسین	
اشریشیا کلی	۳۱/۲۵ ± ۰/۰						< ۰/۰۰۰۱
		۱۲۵ ± ۰/۰					< ۰/۰۰۰۱
			۱۲۵ ± ۰/۰			۵/۲۰۸ ± ۱/۳۰۲	< ۰/۰۰۰۱
				۲۰/۸۳ ± ۵/۲۰۸			۰/۰٤۳۸
					۱۰/٤۲ ± ۲/٦		۰/۱٤۸۱

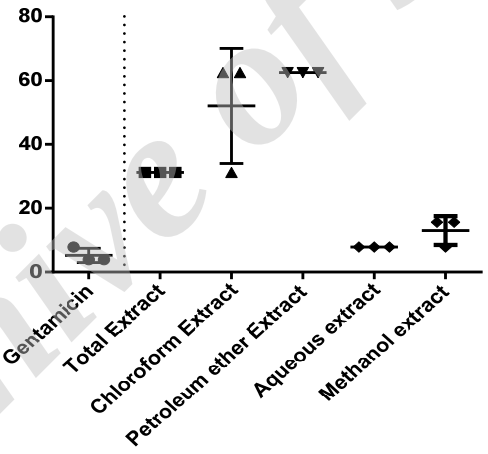


نمودار شماره ۲- میانگین و انحراف از معیار MIC عصاره ی تام، فراکسیون‌های کلروفرمی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و جنتامیسین به روش میکرودایلوشن در باکتری گرم منفی اشریشیاکلی

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۲- 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 جنتامیسین به روش میکرودایلوشن در باکتری گرم منفی سالمونلا اینتریتیدیس

باکتری گرم منفی	حداقل غلظت عدم رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر) (میانگین ± انحراف از معیار) عصاره و فراکسیون‌ها: تام	کلروفرمی	اتر پترولئومی	آبی	متانولی	جنتامیسین	ttest p value
سالمونلا اینتریتیدیس	۳۱/۲۵ ± ۰/۰						< ۰/۰۰۰۱
		۵۲/۰۸ ± ۱۰/۴۲					۰/۰۱۱۱
			۶۲/۵ ± ۰/۰			۵/۲۰۸ ± ۱/۳۰۲	< ۰/۰۰۰۱
				۷/۸۱۳ ± ۰/۰			۰/۱۱۶۱
					۱۳/۰۲ ± ۲/۶		۰/۰۶



نمودار 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 میکرودایلوشن در باکتری گرم منفی سالمونلا اینتریتیدیس

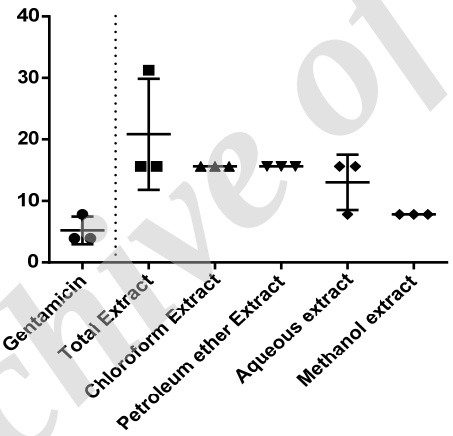
سودوموناس آئروجینوزا

نتایج حاصل از جدول شماره ۳ بیانگر آن است که عصاره تام با غلظت ۵/۲۰۸ ± ۲۰/۸۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value = ۰/۰۴۳۷) و فراکسیون کلروفرمی و اتر پترولئومی با غلظت ۰/۰ ± ۱۵/۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value = ۰/۰۰۱۳) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا هستند. فراکسیون آبی با غلظت ۲/۶۰۴ ± ۱۳/۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value = ۰/۰۶) و فراکسیون متانولی در غلظت ۰/۰ ± ۷/۸۱۳ 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 ٤).

Archive of SID
www.SID.ir

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 میکرودایلوشن در باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا

باکتری گرم منفی	حداقل غلظت عدم رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر) (میانگین ± انحراف از معیار) عصاره و فراکسیون‌ها					جنتامیسین	ttest p value
	تام	کلروفرمی	اتر پترولئومی	آبی	متانولی		
سودوموناس آئروجینوزا	۲۰/۸۳ ± ۵/۲۰۸						۰/۰۴۳۷
		۱۵/۶۳ ± ۰/۰					۰/۰۰۱۳
			۱۵/۶۳ ± ۰/۰			۵/۲۰۸ ± ۱/۳۰۲	۰/۰۰۱۳
				۱۳/۰۲ ± ۲/۶۰۴			۰/۰۶
					۷/۸۱۳ ± ۰/۰		۰/۱۱۶۱



نمودار شماره ٤- 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 میکرودایلوشن در باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا

باکتری‌های گرم مثبت

استافیلوکوکوس اورئوس

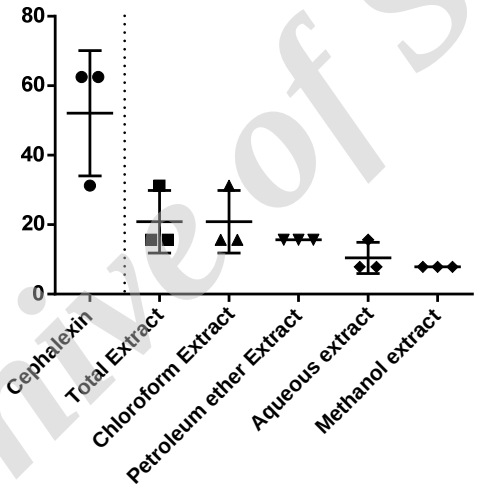
نتایج حاصل از جدول شماره ٤ بیانگر آن است که فراکسیون اتر پترولئومی در غلظت ۰/۰ ± ۱۵/۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value=۰/۰۲٤۹)، فراکسیون آبی در غلظت ۲/۶۰٤ ± ۱۰/٤۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value=۰/۰۱۷۸)، و فراکسیون متانولی در غلظت ۰/۰ ± ۷/۸۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value=۰/۰۱۳۲) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس هستند. عصاره تام و فراکسیون کلروفرمی در غلظت ۵/۲۰۸ ± ۲۰/۸۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ttest p value=۰/۰۶) قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس هستند (جدول شماره ٤ و نمودار شماره ۵).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ٤- 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 میکرودایلوشن در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس

باکتری گرم منفی	حداقل غلظت عدم رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر) (میانگین ± انحراف از معیار) عصاره و فراکسیون‌ها					سفالکسین	ttest p value
	تام	کلروفرمی	اتر پترولئومی	آبی	متانولی		
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۰/۸۳ ± ۵/۲۰۸						۰/۰۶
		۲۰/۸۳ ± ۵/۲۰۸					۰/۰۶
			۱۵/۶۳ ± ۰/۰			۵۲/۰۸ ± ۱۰/۴۲	۰/۰۲۴۹
				۱۰/۴۲ ± ۲/۶۰۴			۰/۰۱۷۸
					۷/۸۱۳ ± ۰/۰		۰/۰۱۳۲



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 میکرودایلوشن در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس

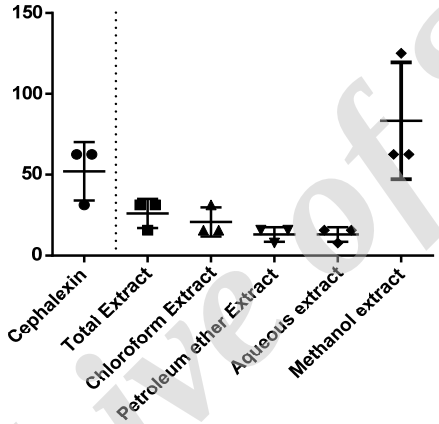
باسیلوس سرئوس

نتایج حاصل از جدول شماره ۵ بیانگر آن است که فراکسیون‌های اتر پترولئومی و آبی در غلظت ۲/۶۰۴ ± ۱۳/۰۲ 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 گرم مثبت باسیلوس سرئوس هستند. عصاره تام در غلظت ۵/۲۰۸ ± ۲۰/۸۳ 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 ٦).

Archive of SID
www.SID.ir

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 میلی‌لیتر و سفالکسین به روش میکرودایلوشن در باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس

باکتری گرم منفی	حداقل غلظت عدم رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر) (میانگین ± انحراف از معیار) عصاره و فراکسیون‌ها					سفالکسین	ttest p value
	تام	کلروفرمی	اتر پترولئومی	آبی	متانولی		
باسیلوس سرئوس	۲۶/۰۴ ± ۵/۲۰۸						۰/۰۸۹۰
		۲۰/۸۳ ± ۵/۲۰۸					۰/۰۶
			۱۳/۰۲ ± ۲/۶۰۴			۵۲/۰۸ ± ۱۰/۴۲	۰/۰۲۲۰
				۱۳/۰۲ ± ۲/۶۰۴			۰/۰۲۲۰
					۸۳/۳۳ ± ۲۰/۸۳		۰/۰۱۳۲



نمودار شماره ٦- مقایسه میانگین و انحراف معیار MIC عصاره ی تام، فراکسیون‌های کلروفرمی، اتر پترولئومی، آبی و متانولی گیاه *Heliotropium bacciferum* در غلظت ۱۰۰۰ تا ۰/۰۳۵۱۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و سفالکسین به روش میکرودایلوشن در باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس

میانگین نتایج در جدول شماره‌های ٦ و ٧ نمایش داده شده‌اند:

جدول شماره ٦- نتایج حاصل از MIC (µg/ml) گیاه *H. bacciferum* به روش میکرودایلوشن در میکروپلیت

	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس	*Ecoli*	سالمونلا انتریتیدیس	پسودوموناس آئروژینوزا
عصاره تام	۱۵/۷۵	۱۵/۷۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۵/۷۵
فراکسیون کلروفرمی	۱۵/۷۵	۱۵/۷۵	۱۲۵	٦۲/۵	۱۵/۷۵
فراکسیون اتردوپترولی	۱۵/۷۵	۱۵/۷۵	۱۲۵	٦۲/۵	۱۵/۷۵
فراکسیون آبی	۷/٦	۷/٦	۱۵/۷۵	۷/٦	۱۵/۷۵
فراکسیون متانولی	۷/٦	٦۲/۵	۱۵/۷۵	۱۵/۷۵	۷/٦

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۷- نتایج MIC (µg/ml) حاصل از چاهک پلیت گیاه *H. bacciferum*

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

همچنین نتیجه MIC جنتامایسین روی سوش اشرشیاکلی ۵ µg/ml و سفالکسین روی سوش استافیلوکوکوس اورئوس ۶۲/۵ µg/ml بود.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که اثر ضدمیکروبی 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 برروی 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 ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشته‌اند. ترکیبات آلکالوئیدی این گیاه اثر ضدالتهابی، بهبوددهنده زخم، ضدعفونی کننده و ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی به دلیل وجود ترکیبات فنولی می‌باشد [۷].

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

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

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

با توجه به تحقیقات انجام شده که درگذشته 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 ضدمیکروبی خوبی علیه سوش‌های باکتری شامل استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا انتریتیدیس، پسودوموناس آئروژینوزا دارد و در میان آنها اثر ضدمیکروبی بخش آبی آن بیشتر از سایر فراکشن‌ها می‌باشد و بعد از آن عصاره متانولی نتایج قابل قبولی داشته است. بیشترین نتایج MIC در غلظت‌های ۷/۶ µg/ml تا ۶۲/۵ بوده است که اثربخشی خوبی می‌باشد.

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

Archive of SID
www.SID.ir

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

امید است در آینده تحقیقات بیشتری در زمینه اثر ضدمیکروبی این گیاه بر گونه‌های مختلف میکروبی انجام گرفته و با یافتن مواد مؤثره ضدمیکروبی 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.

منابع

1. Zehzad B. Protected zone.biosystem protection organization publication. 1996, pp: 70.

2. Davies J and Webb V. The emerging infection. Sandiego: Academic press; 1998, Chapter 8, p: 72 - 229.

3. Mozaffarian V. Encyclopedia of Iranian Plants. 5th Edition. Ghadiani Publication. 2007, pp: 211.

4. Zargari A. Medicinal plants. 7th Edition. Tehran university publication. 2011, pp: 526 – 49.

5. 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.

6. Oluwatoyin SM, leogbulam NG and Joseph A. Phytochemical and antimicrobial studies on the aerial part of *Heliotropium indicum* Linn. *Annal. Biol. Res*. 2001; 2 (2): 129 – 36.

7. Nethaji S and Manokaran C. Phytochemical analysis and antimocrobial activity of *Heliotropium indicum* L. and *Coldenia procumbens* L. *J. Pure and Applied Microbiol.* 2009; 3 (1): 195 - 8.

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.

9. Jain Sc, Singh B and Jain R. Antimicrobial activity of tritopenoids from *Heliotropium ellipticum*. *Fitotrapia* 2001; 72 (6): 666 - 8.

10. Radha1 R, Lata2 T and Rajendran N.N. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of *Heliotropium marifolium* Retz. *J. Natural Remedies* 2003; 3 (2): June, 208 - 11.

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.

12. 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.

13. Rahimifard N, Sabzevari O, Shoeibi Sh, Pakzad SR, Ajdari S, Hajimehdipoor H, Bagheri F and Safaee 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.

14. 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.

15. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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, Beitolahi L and Ahi K. *Helicobacter pylori* and the herbal compound effect. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*. 2012; 7 (2): 647 - 9.

Archive of SID

www.SID.ir