بررسی اثر مهارکنندگی عصاره‌های متانولی و آبی گیاه گون بر باکتری‌های اشرشیاکلی استاندارد و *هلیکوباکتر پیلوری*

هانیه احمدپور کچو[1]، *مجتبی معصومی[1]، فاطمه توحیدی[2]

[1] گروه مهندسی شیمی – بیوتکنولوژی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران، [2] گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/٤/۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/٥/۱۹

*مسئول مکاتبه: Mojtabamasoumi93@yahoo.com

چکیده

عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* با گاستریت، زخم دوازدهه، زخم معده و شکل اپیدمی سرطان معده مرتبط بوده و ثابت گردید که ریشه‌کن سازی این عفونت، دشوار می‌باشد. اخیراً ترکیبی از داروهای ضدمیکروبی به بازار عرضه شد که می‌تواند تنها ۵۰ درصد عفونت را از بین ببرد. البته نتایج حاصله، متغیر است و عوامل مؤثر بر کارایی درمان، هنوز نامشخص می‌باشد. افزایش روزافزون مقاومت دارویی *هلیکوباکتر پیلوری* به آنتی بیوتیک‌های رایج، مشکلی است که نیاز به توجه جدی دارد؛ از این رو هدف مطالعه حاضر بررسی اثر ضدباکتریایی گیاه گون بر سویه *هلیکوباکتر پیلوری* و اشرشیاکلی بود. در این بررسی ابتدا عصاره‌های متانولی و آبی گون به روش ماسراسیون تهیه گردید. سپس اثر آنها با روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بر روی باکتری استاندارد اشرشیاکلی و *هلیکوباکتر پیلوری‌های* جدا شده از بیماران مورد بررسی قرار گرفت. جهت شناسایی گروه‌های عاملی متصل به ترکیبات شیمیایی که سبب خاصیت ضدباکتریایی عصاره متانولی گون می‌شوند، از تست FT-IR استفاده گردید. نتایج نشان داد که اثر بازدارندگی عصاره‌ی آبی گون بر روی هر دو باکتری اشرشیاکلی و *هلیکوباکتر پیلوری* بیشتر از عصاره‌ی متانولی آن بوده است. همچنین حداقل علظت ممانعت کننده از رشد عصاره آبی گون برای *هلیکوباکتر پیلوری* ۱/٥٦ mg/ml و برای عصاره‌ی متانولی ۳/۱۲۵ mg/ml به دست آمد، در حالی که حداقل غلظت ممانعت کننده از عصاره‌ی آبی برای اشریشاکلی ۱۲۵ mg/ml و عصاره متانولی ۲۵۰ mg/ml تعیین شد. نتایج آنالیز FT-IR نیز نشانگر وجود مشتقاتی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در عصاره گون بوده است.

واژه‌های کلیدی: عصاره گون، حداقل غلظت بازدارندگی، *هلیکوباکتر پیلوری*، *اشرشیاکلی*.

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی، خمیده، مارپیچی، S شکل، میکروآئروفیل با طول و عرض ٤-۲ و ۱-۰/۵ میکرومتر می‌باشد. این باکتری فاقد اسپور، متحرک، دارای چهار تا شش عدد تاژک غلاف‌دار تک قطبی است. *هلیکوباکتر*

پیلوری دارای حرکت چرخشی می‌باشد که در محیط‌های ویسکوز مثل مخاط معده این حرکت، بهتر و سریع‌تر می‌گردد. این باکتری داری دو شکل است. در شکل تیپیک، باسیل خمیده گرم منفی دارای چهار تا شش تاژک که قدرت تکثیر دارد اما در بعضی موارد، پس از یک دوره انکوباسیون طولانی، اشکال کوکوئیدی نیز در کشت‌های آن دیده می‌شود. این اشکال، غیرقابل رشد هستند اما زنده بودن آنها تا حدود زیادی به اثبات رسیده است. اشکال کوکوئیدی *هلیکوباکتر پیلوری* نقش اسپور را برای باکتری دارند و تاکنون هیچ مدرکی مبنی بر قابلیت انتقال آن وجود ندارد (ایسکنار و همکاران، ۲۰۱۲؛ یانگ ژو و همکاران، ۲۰۰۹؛ مک جی و همکاران، ۲۰۰۲). عمده‌ترین بیماری‌های ایجاد شده توسط *هلیکوباکتر پیلوری* مربوط به معده می‌باشد که رایج‌ترین آنها زخم معده است. این بیماری سبب تخریب بافت پوششی معده و تغییر در تولید اسید معده می‌شود که در بسیاری از افراد متعاقباً به سرطان معده می‌انجامد. مطالعات نشان داده است که ۷۰ تا ۱۰۰ درصد از بیماران مبتلا به گاستروانتریت، زخم معده و زخم‌های دئودنوم به *هلیکوباکتر پیلوری* آلوده بوده‌اند (عظیمی و همکاران، ۱۳۸۹). گون با نام علمی *Astragalus gummifer* از خانواده‌ی *Leguminosae* (خانواده‌ی نخود) است. این گیاه، چند ساله، بوته مانند و دارای ساقه‌ی چوبی با برگ‌هایی مرکب از برگچه‌های متعدد می‌باشد. گونه‌های مختلف گون که تولیدکننده کتیرا هستند، دارای گل‌هایی به رنگ‌های صورتی، قرمز، آبی، بنفش، زرد و یا سفید می‌باشند که به صورت مجتمع، خوشه یا سنبله‌مانند در محور ساقه قرار دارند. از ۲۰۰۰ سال پیش تاکنون، در کشورهای آسیایی از این گیاه به عنوان تقویت کننده سیستم ایمنی بدن و عامل پیشگیری از آنفلوانزا و سرماخوردگی استفاده می‌گردد (یان و همکاران، ۲۰۰۹). گیاه گون با تحریک تولید موادی به نام اینترفرون (ماده‌ی افزایش دهنده‌ی قدرت دفاعی بدن) با عفونت‌ها مقابله می‌کند. در واقع این گیاه دارای خواص ضدالتهابی، ضدباکتریایی و ضداکسیدکنندگی بوده و منجر به تقویت سیستم ایمنی بدن می‌شود (آدیگوزل و همکاران، ۲۰۰۹). طیب و همکاران (۲۰۱۲) در یک مطالعه آزمایشگاهی اثر عصاره‌های اتری و متانولی گیاه گون بر روی باکتری‌های مختلفی از جمله اشرشیاکلی را بررسی و اعلام نمودند که در غلظت ۵۰ mg/ml از عصاره‌ی اتری و متانولی به ترتیب ۱۲ و ۱۳ میلی‌متر هاله عدم رشد باکتری مشاهده گردید.. همچنین آدیگوزل و همکاران (۲۰۰۹) اثر عصاره‌ی متانولی گیاه گون بر باکتری اشرشیاکلی را مورد بررسی قرار دادند. طی این مطالعه، قطر هاله عدم رشد باکتری در غلظت ۳۰۰ mg/ml برابر با ۲۰ میلی‌متر بوده و در غلظت ۱۲۵ mg/ml دارای حداقل غلظت بازدارندگی گردید. گیاه گون علاوه بر تقویت سیستم ایمنی بدن، فعالیت ضدویروسی، مسمومیت‌زدایی کبدی، تقویت عملکرد ریه‌ها و بهبود هاضمه، جهت درمان عفونت‌های باکتریایی

نیز بسیار مفید است؛ از این رو در پژوهش حاضر، اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی و آبی گیاه گون بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی استاندارد و *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از بافت بیمار مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طرز تهیه عصاره: گیاه گون به صورت تازه از کوه‌های اطراف (بابل، ایران) تهیه شد و پس از شستشو با آب مقطر استریل، در محیطی تمیز و به دور از نور خورشید خشک گردید. جهت عصاره‌گیری گیاه، از دو حلال آبی و متانولی به روش خیساندن استفاده شد. در این روش ابتدا دو نمونه ۵۰ گرمی از پودر گیاه به صورت جداگانه با مقدار ۵۰۰ سی‌سی از حلال متانول ۹۹٪ (مرک، آلمان) و آب مقطر استریل مخلوط گردیدند و در دمای محیط به مدت ۷۲ ساعت درون شیکر انکوباتور (مدل 211DS، Labnetl، آمریکا) با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. در ادامه، ترکیبات حاصل پس از صاف شدن و تغلیظ توسط روتاری (Streoglass strike 202، ایتالیا) به پلیت‌های شیشه‌ای انتقال یافتند و جهت خشک شدن در آون (Memmert uf30plus، آلمان) قرار داده شدند. در نهایت، عصاره‌های به دست آمده در دمای یخچال نگهداری گردیدند (بهبهانی، ۲۰۱۳؛ احمد، ۲۰۰۱).

روش ماکرودایلوشن[1] برای باکتری اشرشیاکلی

تهیه محیط کشت: در این روش از محیط کشت مولرهینتون آگار[2] (مرک، آلمان) و مولرهینتون براث[3] (مرک، آلمان) استفاده شد. ۲۱ گرم از پودر مولرهینتون براث با ۱۰۰۰ سی‌سی آب مقطر مخلوط و بر روی شعله حل گردید. سپس محلول حاصل، در لوله‌ها به میزان ۱ سی‌سی و ۲ سی‌سی تقسیم شدند. جهت تهیه محیط کشت مولرهینتون آگار نیز ۳۸ گرم از پودر آن در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر مخلوط و بر روی شعله حل گردید. محیط کشت‌ها جهت استریل شدن، به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو (SH-Scientific، کره جنوبی) با دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. آن‌گاه پس از خنک شدن، محیط کشت مولرهینتون آگار در پلیت‌های ۸ سانتی‌متری تقسیم گردید و نگهداری آن‌ها تا هنگام استفاده، در یخچال صورت پذیرفت (یزدی و همکاران، ۲۰۱٦؛ مرند و همکاران، ۲۰۱۵).

تهیه سوسپانسیون میکروبی: سویه استاندارد اشرشیاکلی از آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی (بابل، ایران) تهیه گردید. ابتدا توسط لوپ یک کلنی از باکتری اشرشیاکلی تازه کشت داده شده، برداشته شد و در سرم فیزیولوژی یا محیط کشت پایه براث حل گردید. سپس ترکیب حاصل، از نظر کدورت، به طور

[1]- Macrodilution
[2]- Mueller-Hinton agar
[3]- Mueller-Hinton broth

چشمی با محلول نیم مک‌فارلند استاندارد مقایسه شد (یزدی و همکاران، ۲۰۱٦).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی (اشرشیاکلی): جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی از روش ماکرودایلوشن (لوله‌ای) استفاده شد. در این روش از ۱۳ لوله استفاده گردید که لوله اول شامل ۲ سی‌سی محیط کشت براث و باقی لوله‌ها ۱ سی‌سی از محیط کشت براث را دارا بودند. لوله‌های ۱۲ و ۱۳ نیز به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی تلقی شدند. کنترل مثبت شامل باکتری و محیط کشت و کنترل منفی شامل عصاره و محیط کشت بوده است. در واقع مقدار ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره در لوله اول ریخته شد و بعد از پیپتینگ ۱ سی‌سی از آن، به ترتیب در سایر لوله‌ها اضافه گردید. در ادامه کار، ۱ سی‌سی از سوسپانسیون میکروبی به هر کدام از لوله‌ها اضافه شده و ۲٤ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس در کنار شعله، توسط لوپ، از هر لوله برداشته و در محیط‌های مولرهینتون آگار عمل کشت انجام شد. با گذشت ۲٤ ساعت از قرار گرفتن پلیت‌ها در انکوباتور، رشد باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. باید توجه داشت که به تعداد کمتر از ۵ کلنی باکتری، حداقل غلظت کشندگی و کمتر از ۵۰۰ کلنی، حداقل غلظت بازدارندگی گفته می‌شود (ویمپفنی و همکاران، ۱۹۷۷).

روش آگار دایلوشن برای باکتری *هلیکوباکتر پیلوری*

تهیه محیط کشت: برای تهیه محیط کشت از پودر پایه بروسلا آگار[4] (مرک، آلمان) استفاده شد. در این روش ابتدا مقدار ٤۱ گرم از پودر در ۱۰۰۰ سی‌سی آب مقطر بر روی شعله حل شده و سپس در اتوکلاو استریل گردید. آنگاه پس از خنک شدن، ۷۰ سی‌سی خون گوسفندی دفیبرینه و آنتی‌بیوتیک‌های تریمتوپریم، ونکومایسین و پلی میکسین B (سیگما آلدریچ) به ترتیب در مقادیر ۰/۰۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۲۵ گرم به محلول اضافه گردید. سپس ترکیب حاصل به ترتیب در پلیت‌های حاوی ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ٦۲/۵ و ۳۱/۲۵ میلی‌گرم پودر عصاره‌های متانولی و آبی و نیز پلیت‌های فاقد عصاره (شاهد) ریخته شد و محیط‌های کشت حاصل، پس از ژله‌ای شدن در یخچال نگهداری گردیدند (موبلی و همکاران، ۲۰۰۱).

تهیه محیط ترنسپورت (انتقالی): جهت انتقال نمونه از بیمارستان به آزمایشگاه، محیط ترنسپورت[5] (انتقالی) موردنیاز است. برای تهیه این محیط از ۱۰۰ سی‌سی نرمال سالین به همراه ۰/۱٦ درصد آگار استفاده شد که در لوله‌های درب‌پیچ‌دار تقسیم و اتوکلاو گردیدند.

نمونه‌برداری از بافت بیمار: جهت دریافت بافت‌های حاوی *هلیکوباکتر پیلوری*، در بیمارستان آیت ا... روحانی (بابل، ایران) با توجه به

4- Brucella agar
5- Transport

تشخیص پزشک از بیمارانی که التهاب و زخم معده داشتند، نمونه‌برداری انجام پذیرفت، به طوری که ۳ الی ٤ نمونه از بافت بیمار برداشته شد. ۱ نمونه از بافت‌ها برای بررسی سریع هلیکوباکتر در کیت‌های اوره‌آز قرار گرفت و سایر آنها به محیط ترنسپورت انتقال یافتند. برای تعیین مثبت بودن تست *هلیکوباکتر پیلوری* استخراجی بافت، از کیت اوره‌آز استفاده شد، به طوری که تغییر رنگ کیت به صورتی پررنگ نشانگر فراوانی هلیکوباکتر در بافت بیمار بود.

شرایط کشت بافت و انکوباسیون: بافت‌های بیمار توسط محیط ترنسپورت به آزمایشگاه میکروب‌شناسی (دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران) منتقل شدند. سپس با استفاده از لوپ بر روی پلیت‌های حاوی محیط کنترل (شاهد) و عصاره، کشت یافته و با توجه به بی‌هوازی بودن *هلیکوباکتر پیلوری*، در جار شیشه‌ای که محیط آن توسط شمع و گازپک نوع C برای رشد باکتری فراهم شده بود، قرار یافتند. آن‌گاه جارها به مدت ۳ الی ۵ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد جای گرفتند و پس از طی ۵ روز، جهت اطمینان از تکمیل رشد باکتری و مشاهده تأثیر عصاره بر رشد هلیکوباکتر، از انکوباتور و جار شیشه‌ای خارج گردیدند.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی (*هلیکوباکتر پیلوری*): در این مطالعه از روش آگار دایلوشن استفاده شد، بدین شکل که مقادیر مدنظر از عصاره‌هایی که با روش ماکرودایلوشن (لوله‌ای) تهیه گردید، در پلیت‌های استریل ریخته شد و به اندازه ۲۰ سی‌سی از محیط کشت بروسلا آگار که در بخش قبلی به آن اشاره شد، اضافه گردید.

تعیین گروه‌های عاملی ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره گون توسط آنالیز تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)

با توجه به عدم قابلیت استخراج اسانس از گون و ناممکن بودن آنالیز عصاره توسط دستگاه GC-MS، برای شناسایی کیفی نوع پیوندها و شیمی عصاره‌های تولید شده در این پژوهش، از روش آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز و دستگاه مربوطه (Raylegh، آمریکا) در محدوده عدد موجی ٦۰۰ تا ۳۹۰۰ cm^{-1} استفاده شد. آماده‌سازی نمونه جهت آنالیز تبدیل فوریه مادون قرمز برای نمونه‌های مایع، جامد و گاز متفاوت است. با توجه به اینکه نمونه مورد استفاده در این پژوهش به صورت پودری بود، از روش تهیه قرص KBr بهره گرفته شد؛ از این رو نمونه جامد را با حلال خود که آب مقطر بود حل کرده و با برمید پتاسیم پودری مخلوط شد و تحت فشار به صورت قرص‌های کوچک درآمد. سرانجام، نمونه در مقابل تابش اشعه قرار گرفته و طیف حاصل از تبدیل فوریه به دست آمد. علت استفاده از برمید پتاسیم آن است که هیچ قله‌ای در ناحیه ٦۵۰ تا ۳۹۰۰cm^{-1} ایجاد نمی‌نماید.

نتایج و بحث

سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی بر باکتری اشرشیاکلی: نتایج بدست

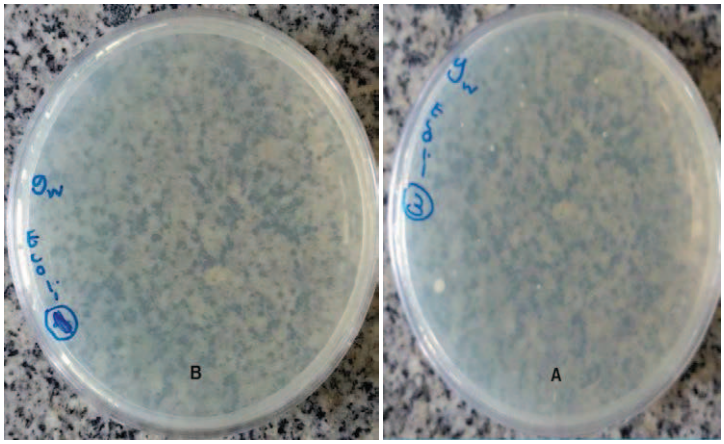
آمده نشان می‌دهد که عصاره‌های آبی و متانولی گیاه گون می‌توانند از رشد باکتری‌های اشرشیاکلی و *هلیکوباکتر پیلوری* جلوگیری کنند. عصاره‌ی آبی گون در غلظت‌های ۱۲۵ mg/ml و ۵۰۰ mg/ml به ترتیب دارای حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر باکتری اشرشیاکلی بود (جدول ۱). عصاره‌ی متانولی گون نیز توانایی مهار رشد باکتری اشرشیاکلی در غلظت ۲۵۰ mg/ml و کشندگی این باکتری در ۵۰۰ mg/ml را دارد (جدول ۲). مطابق شکل (۱-A) در حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌ی آبی گون یعنی ۱۲۵mg/ml، حداقل رشد باکتری مشاهده گردید که بر روی آن آلودگی‌هایی نیز وجود دارد اما در غلظت ۵۰۰ mg/ml علاوه بر عدم وجود اشرشیاکلی، هیچ گونه آلودگی نیز رشد نکرد (۱-B)، درحالی‌که طبق شکل (۲-A) عصاره‌ی متانولی گون در غلظت ۲۵۰ mg/ml حداقل رشد باکتری اشرشیاکلی را ایجاد نموده و تعداد کلنی-های کمتر از ۵۰۰ دیده می‌شود اما در غلظت ۵۰۰ mg/ml تعداد کلنی‌های رشد یافته اشرشیاکلی به کمتر از ۵ رسید (شکل ۲-B).

جدول ۱- حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌ی آبی گیاه گون بر باکتری‌های موردنظر

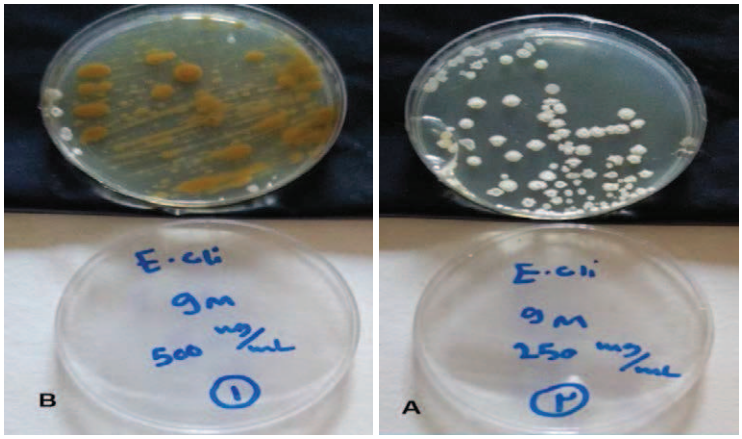
باکتری / غلظت	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
هلیکوباکتر پیلوری	۱/۵۶	۳/۱۲۵
اشرشیاکلی	۱۲۵	۵۰۰

جدول ۲- حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌ی متانولی گیاه گون بر باکتری‌های موردنظر

باکتری / غلظت	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
هلیکوباکتر پیلوری	۳/۱۲۵	۲۵
اشرشیاکلی	۲۵۰	۵۰۰



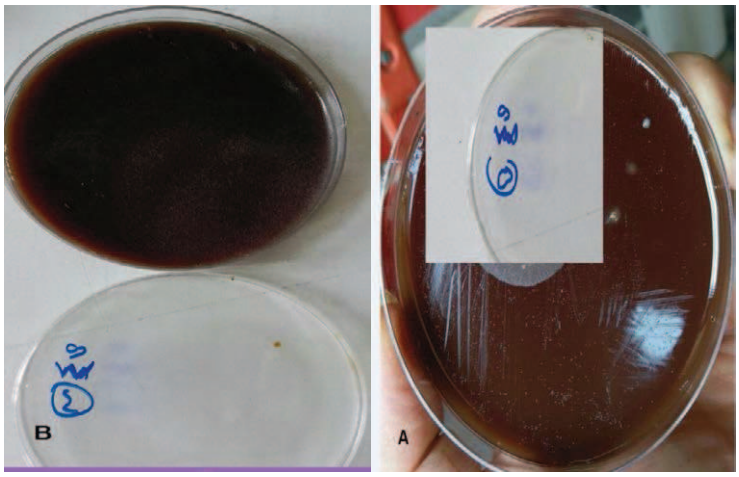
شکل ۱- A) حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌ی آبی گون بر باکتری اشرشیاکلی B) حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ی آبی گون بر باکتری اشرشیاکلی



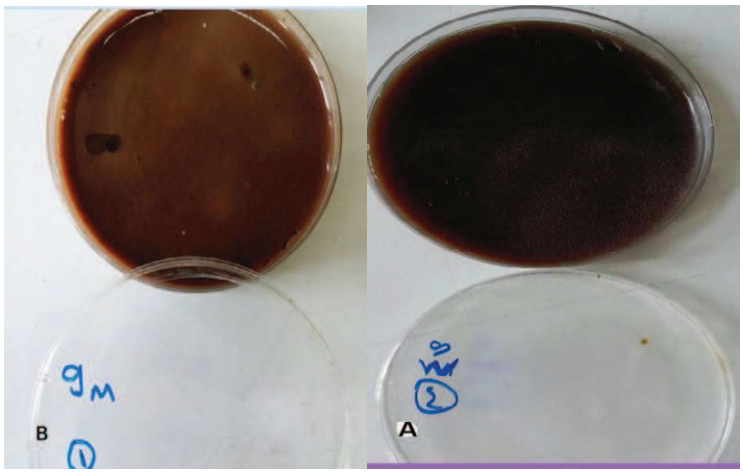
شکل ۲- A) حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌ی متانولی گون بر باکتری اشرشیاکلی B) حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ی متانولی گون بر باکتری اشرشیاکلی

میزان حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی برای باکتری *هلیکوباکتر پیلوری*: نتایج حاصله حاکی از آن است که عصاره‌های آبی و متانولی گیاه گون می‌توانند از رشد باکتری‌های *هلیکوباکتر پیلوری* نیز جلوگیری کنند، بدین‌صورت‌که عصاره‌ی آبی گیاه گون با غلظت ۱/۵٦ mg/ml دارای حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بوده و در غلظت ۳/۱۲۵ mg/ml، حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* را داشته است (جدول ۱). همچنین عصاره‌ی متانولی گون توانایی مهار این باکتری در غلظت ۳/۱۲۵ mg/ml و کشندگی آن در mg/ml ۲۵ را دارا می‌باشد (جدول ۲). با توجه به شکل (A-۳) در حداقل غلظت بازدارندگی (mg/ml ۱/۵٦) عصاره آبی گون سبب رشد حداقل کلنی‌های باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* گردید اما عدم رشد کامل این باکتری در حداقل غلظت کشندگی آن (۳/۱۲۵ mg/ml) می‌باشد (B-۳). همچنین طبق شکل (A-٤) در پلیت‌های حاوی عصاره‌های متانولی در حداقل غلظت بازدارندگی یعنی ۳/۱۲۵ mg/ml، حداقل رشد *هلیکوباکتر پیلوری* مشاهده می‌شود اما در غلظت ۲۵ mg/ml هیچ‌گونه رشد باکتری به چشم نمی‌خورد (B-٤). با توجه به نتایج حاصله، تأثیر عصاره آبی گیاه گون چشمگیرتر از عصاره متانولی آن بوده است؛ زیرا در کمترین غلظت توانست تأثیر بهتری بر جلوگیری از رشد باکتری‌های اشرشیاکلی و *هلیکوباکتر پیلوری* داشته باشد. همچنین از مقایسه تأثیر عصاره‌های متانولی و آبی بر باکتری‌های اشرشیاکلی و *هلیکوباکتر پیلوری* مشاهده شد که هر دو عصاره‌ی این گیاه، بر رشد *هلیکوباکتر پیلوری* نسبت به اشرشیاکلی تأثیر بیشتری گذاشتند. *هلیکوباکتر پیلوری* یکی از عوامل مهم در ایجاد زخم پپتیک و سرطان معده می‌باشد که انتشار وسیعی در جهان دارد. عود بیماری و مقاومت به درمان یکی از جدیدترین

مشکلات در روند درمان بیماران می‌باشد و بسیاری از متخصصین به دلیل اهمیت گیاهان در درمان بیماری‌ها، راه مناسب درمان را استفاده از گیاهان دارویی می‌دانند (موبلی و همکاران، ۲۰۰۱؛ کاتو، ۲۰۰۱). عبادی و همکاران (۲۰۱٤) اثر گیاه گون بر اشرشیاکلی، سودوموناس، *باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس* را بررسی و اعلام نمودند که حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌ی اتانولی آن‌ها mg/ml ۱۵۰ و حداقل غلظت کشندگی mg/ml ۱۲۰۰ بوده است. یوا و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر عصاره‌ی نانوذره‌ای گون بر باکتری اشرشیاکلی را مورد آزمایش قرار دادند و نتایج آنها برای حداقل غلظت بازدارندگی بین ۰/۰۳۲ و mg/ml ۰/۰٦۳ بدست آمد. وانگ و همکاران (۲۰۰۸) نیز اثر عصاره‌ی گون بر روی اشرشیاکلی، انتروکوکوس، سالمونلا و استرپتوکوکوس را در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه بررسی اثر ضدباکتریایی گون را نشان داد که منطبق بر یافته‌های مطالعه‌ی حاضر می‌باشد. شیرازی (۱۳۸۲) اثر ۱۰ گیاه دارویی بر باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* را بررسی کرد. او دریافت که تمامی سویه‌های جدا شده این باکتری، به جنتامایسین، تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین حساس بودند. صادقیان و همکاران (۱۳۸۳) اثر ضدباکتریایی ٤ عصاره گیاهی دارچین، زیره سیاه، رازیانه و شوید را بر روی *هلیکوباکتر پیلوری* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این آزمایشات حاکی از آن بود که ۱۰۰ درصد سویه‌های این باکتری به تتراسایکلین حساسیت نشان دادند.

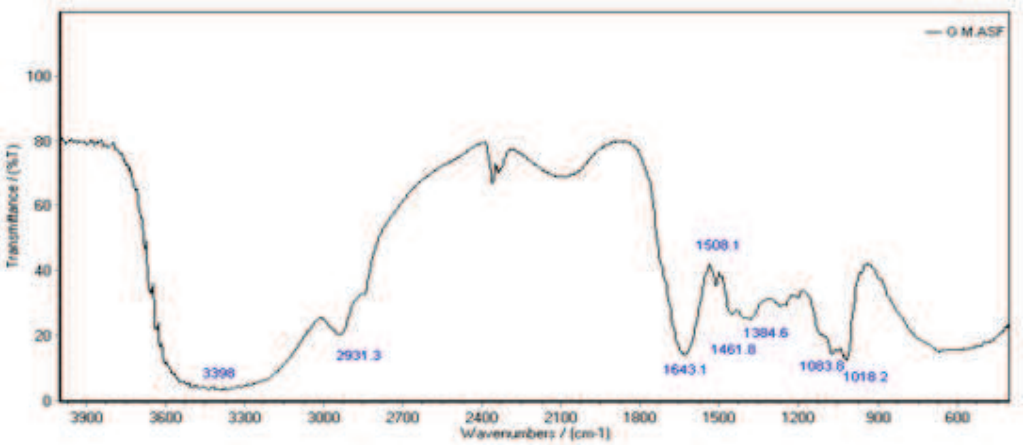


شکل ۳- A) حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌ی آبی گون بر *هلیکوباکتر پیلوری* B) حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی گون بر *هلیکوباکتر پیلوری*



شکل ٤- A) حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌ی متانولی گون بر *هلیکوباکتر پیلوری* B) حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ی متانولی گون بر *هلیکوباکتر پیلوری*

شناسایی گروه‌های عاملی موجود در عصاره متانولی گیاه گون توسط تست FT-IR: با توجه به آنالیز FT-IR عصاره متانولی گیاه گون می‌توان گفت که از طول موج ٦٠٠ تا ٣٩٠٠ cm^{-1} پیک‌هایی حاصل شدند که نشان از وجود گروه‌های عاملی و عنصرهای متصل به ترکیبات شیمیایی این عصاره دارد. تحلیل پیک-های موجود در شکل (٥) نشانگر وجود گروه-های عاملی کربوکسیلیک اسیدی، ساختار C-O و OH در طول موج‌های ١٠١٨، ٢٩٣١ و ٣٣٩٨ است که متصل به ترکیبات الکلی (نوع اول) و فنلی می‌باشند (مک دونالد، ١٩٩٦)؛ از این رو می‌توان ثابت کرد که این عامل‌ها نشان از وجود ترکیبات ضدباکتریایی همانند فنل‌ها و فلاونوئیدها دارد (جیلی و همکاران، ٢٠٠٧). همچنین پیک ١٦٦٢ وجود گروه آلکنی (خمشی) را نشان می‌دهد که متصل به ترکیبات ترپنی مولد عطروبوی گیاه هستند. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد در صورتی که بیماران، هر یک از ترکیبات آنتی بیوتیکی را به دلیل بروز عوارض جانبی یا بروز آلرژی نسبت به آنها تحمل نکنند، می‌توان از فراورده‌های گیاهی مانند عصاره‌ی متانولی گیاه گون به عنوان مکمل دارو در رژیم درمانی و همچنین به عنوان یک ماده ضدباکتریایی در عفونت‌های گوارشی ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* استفاده کرد. باید توجه داشت که بررسی آزمایشگاهی الزاماً منعکس کننده اثرات دارو در شرایط بروز عفونت در مخاط معده نمی‌باشد. به عنوان مثال، لایه محافظ خارجی غنی از کربوهیدرات یا گلیکوکالیکس باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* در محیط کشت، بسیار نازکتر از آن است که در شرایط طبیعی مشاهده می‌گردد و این امر احتمالاً میزان نفوذ داروهای ضدباکتریایی به داخل ارگانیسم را تحت تأثیر قرار می‌دهد ؛ از این رو نیاز به تحقیقات پیشرفته‌تری در این زمینه می-باشد.



شکل۵- منحنی حاصل از تست FT-IR عصاره‌ی متانولی گون

نتیجه‌گیری کلی

در تحقیق حاضر اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گون بر باکتری بیماری‌زای اشرشیاکلی و *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از بافت بیمار بررسی گردید. طبق نتایج، اثر ضدباکتریایی عصاره آبی گون نسبت به عصاره متانولی آن، بیشتر بوده است. با توجه به اینکه تاکنون در ایران تحقیق مشابهی در زمینه استفاده از عصاره‌های آبی و متانولی گیاه گون جهت مهار رشد *هلیکوباکتر پیلوری* مولد عفونت‌های معده انجام نگرفت؛ لذا این تحقیق می‌تواند نقطه آغازی برای شروع پژوهش در این راستا و نویددهنده روش‌های درمانی جدید برپایه استفاده از این عصاره به عنوان جایگزین داروهای شیمیایی پرضرر باشد.

منابع

۱. زرگری، ع. ۱۳۷٤. *گیاهان دارویی*. جلد ٤، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۱۳۱-۱۳۰.

۲. شیرازی، م.ح. ۱۳۸۲. بررسی اثر ضدمیکروبی ۱۰ عصاره گیاهی بر روی هلیکوباکتر پیلوری و مقایسه آن با آنتی بیوتیک‌های مؤثر انتخابی. *گیاهان دارویی*، دوره ۲، شماره ۷، ٦۰-۵۳.

۳. صادقیان، س. ۱۳۸۳. مطالعه اثر ضدباکتریایی ٤ عصاره گیاهی دارچین، زیر سیاه، رازیانه و شوید بر روی هلیکوباکتر پیلوری به روش دیسک دیفیوژن و فلوسیتومتری. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان، دوره ۳، شماره ۱۵، ۷۹-۷۵.

٤. عظیمی، ۱۳۸۹. *میکروبیولوژی پزشکی مورای*. ویرایش اول. انتشارات خسروی با همکاری نشر دیباج، تهران، ص ۲۷٤-۲۷۰.

۵. میرحیدر، ح.۱۳۸۲. *معارف گیاهی*. جلد ٤، چاپ ۵، نشر فرهنگ اسلامی، تهران، ٤۱۸ ص.

6. Adigüzel, A., Sökmen, M., Özkan, H., Ağar, G., Güllüce, M. and Şahin, F. 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of methanol and hexane extract of Astragalus species growing in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 33(1), 65-71.

7. Ayala, G., Torres-Mena, J. and Lopez-Carrillo, L. 2008. Association between Helicobacter pylori VacA antigens and gastric cancer depends on the detection method used: immunoblot versus neutralization of the vacuolating activity of VacA. *Medical Microbiology*, 57(1), 9-14.
8. Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Shahidi, F., Mortazavi, S.A. and Mohebbi, M. 2017. Principle component analysis (PCA) for investigation of relationship between population dynamics of microbial pathogenesis, chemical and sensory characteristics in beef slices containing Tarragon essential oil. *Microbial Pathogenesis*, 105, 37-50.
9. Brown, L.M. 2000. Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic Reviews*, 22(2), 283-297.
10. Dülger, B., Kirmizi, S., Arslan, H. and Güleryüz, G. 2002. Antimicrobial activity of three endemic Verbascum species. *Pharmaceutical Biology*, 40(8): 587-589.
11. Ebadi, A.R., Monadi, A., Pashazadeh, M. and Zakhireh, S. 2014. Antibacterial effects alcholic extracts of (Astragalus Hamosus) on gram positive and gram negative bacteria. *Comparative Pathobiology Iran*, 4(43), 1071-1076.
12. Doig, P., Exner, M.M. and Hancock, R.E. 1995. Isolation and characterization of a conserved porin protein from Helicobacter pylori. *Bacteriology*, 177(19), 5447-5452.
13. Fuccio, L., Laterza, L., Zagari, R.M., Cennamo, V., Grilli, D. and Bazzoli, F. 2008. Treatment of Helicobacter pylori infection. *British Medical Journal*, 337, a1454.
14. Jang, T.J. 2010. The number of Foxp3-positive regulatory T cells is increased in Helicobacter pylori gastritis and gastric cancer. Pathology-Research and Practice, 206(1), 34-38.
15. Jilie, K. and Shaoning, Y.U. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8): 549-559.
16. Kato, S. 2001. Epidemiology and clinical role of childhood H.pylori infection. *Nippon Rinsho,* 59: 337-41.
17. Marand, S.K., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A. and Babaei, A.B. 2016. Inhibitory and Bactericidal Effects of Artichoke (Cynara scolymus) on Pathogenic Strains and Their Comparison with Antibiotics In Vitro. *Qom University Medical Science*, 10(2), 31-42.
18. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. and Hazell, S.L, 2001. *Helicobacter pylori*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp: 481-85.
19. McGEE, D.J., Coker, C., Testerman, T.L., Harro, J.M., Gibson, S.V. and Mobley, H.L. 2002. The Helicobacter pylori flbA flagellar biosynthesis and regulatory gene is required for motility and virulence and modulates urease of H. pylori and Proteus mirabilis. *Medical Microbiology*, 51(11), 958-970.
20. Macdonald, I.D.G. and Smith, W.E. 1996. Orientation of cytochrome c adsorbed on a citrate-reduced silver colloid surface. *Langmuir*, 12(3), 706-713.
21. Sener, A. and Dulger, B. 2009. Antimicrobial activity of the leaves of Verbascum sinuatum L. on microorganisms isolated from urinary tract infection. *African Journal of Microbiology Research*, 3(11), 778-781.
22. Teyeb, H., Houta, O., Najjaa, H., Lamari, A., Neffati, M., Douki, W. and Najjar, M.F., 2012. Biological and chemical study of Astragalus gombiformis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 67(7-8), 367-374.
23. Wimpenny, J.W. and Lewis, M.W. 1977. The growth and respiration of bacterial colonies. *Microbiology*, 103(1), 9-18.
24. Yan, R., Yang, Y., Zeng, Y. and Zou, G. 2009. Cytotoxicity and antibacterial activity of Lindera strychnifolia essential oils and extracts. *Ethnopharmacology*, 121(3), 451-455.
25. Yazdi, F.T., Behbahani, B.A., Vasiee, A. and Alghooneh, A. 2015. Exploration of antibacterial activity extracts of Ribes rubrum against Bacillus cereus, Bacillus subtilis,

Listeria innocua and Enterobacter aeruginosa "in vitro". *Infectious Diseases and Tropical Medicine*, 20(69), 31-40 [In Persian].
26. Zhou, Y., Taylor, B., Smith, T.J., Liu, Z.P., Clench, M., Davies, N.W. and Rainsford, K.D. 2009. A novel compound from celery seed with a bactericidal effect against Helicobacter pylori. *Pharmacy and Pharmacology*, 61(8), 1067-1077.
27. Ma, Y., Liu, C., Qu, D., Chen, Y., Huang, M. and Liu, Y. 2017. Antibacterial evaluation of sliver nanoparticles synthesized by polysaccharides from Astragalus membranaceus roots. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 351-357.

Antibacterial effect of Astragalusplant extract on standard strain of *E. coli* and *H. pylori*

H. Ahmadpour Kachou[1], *M. Masoumi[1], F. Tohidi[2]
[1] Department of Chemical Engineering - Biotechnology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran, [2] Department of Microbiology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
Received: 29-6-2017; Accepted: 10-8-2017

Abstract
Helicobacter pylori infection has been associated with gastritis, duodenal ulcer, gastric ulcer, and the epidemic form of gastric carcinoma. Eradication of *H. pylori* infection has proven to be difficult. Recently, a combination of antimicrobial drugs has been released, which can only eliminate 50% of the infection. Of course, the results are variable and the factors affecting the therapeutic efficacy are still unclear. The increasing rise of the drug resistance to common antibiotics is a problem that needs to be taken seriously; hence the goal The present study was conducted to investigate the antibacterial effect of herbivorous on Helicobacter pylori and *E. coli* strains. In this study, methanolic and aqueous extracts were prepared by massage.Then, their effect was determined by determining the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration on the standard bacteria of *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* isolated from the patients. An FT-IR test was used to identify functional groups attached to chemical compounds that produced antibacterial properties of methanolic extracts. The results showed that the inhibitory effect of the aqueous extracts on both *E. coli* and *H. pylori* bacteria was higher than that of methanolic extracts. Also, the least inhibitory effect on the growth of of *Helicobacter pylori* by the aqueous extract was found to be 56.1 mg / ml and 3.25 mg / ml for methanol extracts, while the minimum inhibitory concentration of the aqueous extract was detected for *E. coli* 125 mg / ml and methanol extract 250 mg / ml. The results of FT-IR analysis also indicate the derivatives of phenolic and flavonoid compounds in the extract.

Keywords: Extraction, Astragalus, The minimum inhibitory, *Helicobacter pylori*, *E.coli*

*Corresponding author: Mojtabamasoumi93@yahoo.com