

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره گل‌سنگ‌های *Leptogium saturninum*، *Ramalina peruviana* و

Punctelia borreri

فائزه حمزه خانی^۱، پریسا محمدی^{۱*}، عدرا صبورا^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۶

چکیده

مطالعات نشان داده است که گل‌سنگ‌ها در اکوسیستم‌های مختلف حضور فعالی داشته و متابولیت‌های متنوعی تولید می‌کنند که تاثیرات زیستی مختلفی از جمله اثرات ضدباکتری، ضدقارچی، ضدویروسی، ضدالتهابی، ضدتب، ضد درد و سمیت سلولی دارند. در این مطالعه، اثر ترکیبات ضد میکروبی گل‌سنگ‌ها بررسی شد. برای این منظور، ابتدا چند نمونه از گل‌سنگ‌های مناطق جنگلی اطراف شهر بابل جمع آوری و به کمک مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی، شناسایی شدند. سپس عصاره اتانولی گل‌سنگ‌ها تهیه شد و اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی آن‌ها به طریق انتشار در آگار و تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) علیه پنج باکتری، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Candida glabrata tropicalis*، *Candida albicans*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Bacillus cereus*، *Xanthomonas campestris* و سه مخمر *Candida glabrata tropicalis*، *Candida glabrata tropicalis* بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره گل‌سنگ‌های *Leptogium saturninum*، *Ramalina peruviana*، *Punctelia borreri* و *B. cereus* تنها عصاره گل‌سنگ *R. peruviana* موثر بود و باکتری گرم منفی *P. aeruginosa* نیز نسبت به همه عصاره‌ها مقاومت نشان داد. همچنین اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد و نتایج بدست آمده از MIC نشان داد که عصاره *Leptogium saturninum*، *Ramalina peruviana* و *P. borreri* روی هر سه مخمر موثر بودند. این در حالی است که عصاره گل‌سنگ *P. borreri* تنها بر *C. albicans* موثر بود. با توجه به تولید ترکیبات ضد میکروبی طبیعی در گل‌سنگ‌ها، استفاده از آن‌ها در صنایع دارویی توصیه می‌شود. تحقیقات بیشتری لازم است تا اثر ضد میکروبی این متابولیت‌ها بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و محیطی بررسی گردد.

واژه‌های کلیدی: MIC، ترکیبات ضدقارچی، ترکیبات ضدباکتری، گل‌سنگ

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)

۲- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)

* نویسنده مسئول: p.mohammadi@alzahra.ac.ir

مقدمه

گل‌سنگ‌ها همزیست‌هایی متشکل از حداقل دو موجود زنده، یعنی یک قارچ و یک شریک فتوسنتزی می‌باشند (Bates *et al.* 2011). شریک فتوسنتزی ممکن است جلبک یا سیانوباکتری باشد. گل‌سنگ‌ها قادرند متابولیت‌های مختلفی تولید کنند. تا کنون بیش از ۷۰۰ نوع متابولیت در گل‌سنگ‌ها شناسایی شده است که به ندرت در ارگانیزم‌های دیگر یافت می‌شوند. رشد آرام و زندگی در شرایط سخت، گل‌سنگ‌ها را مجبور به تولید متابولیت‌هایی می‌کند که برای حفظ حیات‌شان در زیستگاه‌های خاص حائز اهمیت است (Mitrovic *et al.* 2011). این متابولیت‌ها ترکیبات خارج سلولی بوده که گاه به صورت کریستال روی سطح هیف‌های قارچی تولید می‌شوند و شامل ترکیبات مختلفی مانند اسیدهای آلیفاتیک، لاکتون‌های ماکروسیکلیکی، دپسیدها، دپسیدون‌ها و غیره هستند (Molnar & Farkas, 2010). این ترکیبات اثرات زیستی مختلفی از جمله اثرات آنتی‌بیوتیکی، آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی، ضد ویروسی، سیتوتوکسیکی و ضد باکتریایی دارند. فعالیت‌های دارویی متابولیت‌های گل‌سنگی اولین بار توسط Zopf در سال ۱۹۰۷ ارائه شد. سپس Hanssen و همکارانش در سال ۱۹۸۸ مجموعه‌ای از اطلاعات کلی در مورد جنبه‌های مختلف دارویی گل‌سنگ‌ها ارائه دادند (Huneck & Yoshimura, 1996). از زمان‌های بسیار قدیم در چین و مصر، گل‌سنگ‌ها مصرف دارویی داشته و از دم کرده‌ی آن‌ها استفاده‌های زیادی می‌شده است (Bown, 2001). گزارش شده است برخی از گل‌سنگ‌ها مانند *Cladonia* و *Lobaria* در درمان سل موثر بوده و استفاده می‌شده است (Vartia, 1973). برخی از اسیدهای گل‌سنگی به ویژه اسید اوسنیک خاصیت آنتی‌بیوتیکی داشته و از گذشته‌های دور از پودر این گل‌سنگ در درمان التهابات سوختگی‌های پوستی نوزادان نیوزیلندی و عشایر ایرانی استفاده می‌شده است. علاوه بر این، گزارش‌هایی مبنی بر استفاده از برخی از متابولیت‌های دیگر گل‌سنگ‌ها در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آگزما، بیماری تنفسی، بیماری‌های ریوی و ورم مفاصل وجود دارد. از ترکیبات موجود در گل‌سنگ‌ها در تهیه لوازم آرایشی و بهداشتی و تهیه پماد ضد سوختگی استفاده می‌شود (Zeybek & John, 1992). همچنین از متابولیت‌های *Cetraria islandica* به عنوان قرص‌های ضدسرفه و از اسید اوسنیک موجود در گل‌سنگ *Sarmentosa alectoria* در درمان زخم‌های پوستی و نیز انعقاد خون استفاده می‌شده است (Haluwyn & Lerond, 1993).

ترکیبات متعددی در گونه‌های مختلف گل‌سنگ‌ها علیه میکروارگانیزم‌هایی مثل باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها شناسایی شده که اثربازدارندگی رشد دارند (Kosanić *et al.* 2012; Manojlović *et al.* 2010). مطالعه روی مواد استخراج شده از گل‌سنگ‌ها با خاصیت آنتی‌بیوتیکی توسط Burkholder و همکارانش در سال ۱۹۴۴ آغاز شد. از آن زمان تا به امروز آنتی‌بیوتیک‌های بسیاری از گل‌سنگ‌ها کشف شده است که روی طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله باکتری‌های گرم مثبت و برخی قارچ‌ها مؤثر بوده است. Adriana و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در مطالعه‌ای عنوان کردند رنگدانه‌های نارنجی

، قرمز رنگی که در گل‌سنگ‌های *Caloplaca* و *Physcia Parmelia Xanthoria parietina* وجود دارند، دارای خاصیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند. Vartia سال ۱۹۷۳ در گزارش خود، فعالیت ضد میکروبی گل‌سنگ‌های فنلاند علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و نیز برخی قارچ‌ها را گزارش کرد.

دانشمندان اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های اتیل الکل، کلروفورم و ان-هگزان گل‌سنگ *Ramalina farinacea* را علیه باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* گزارش کرده‌اند. همچنین عصاره متانولی گل‌سنگ *Usnea ghattensis* دارای خاصیت آنتی‌بیوتیکی قوی علیه *Bacillus megaterium* و *Staphylococcus sp.* بوده و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد را بین ۵ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اعلام نمودند. علاوه بر این، گل‌سنگ *Cladonia rangiformis* دارای متابولیت‌های متعددی می‌باشد که تأثیر زیادی در کنترل جمعیت باکتری‌های خاک دارد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها

سه گل‌سنگ *Leptogium saturninum* و *Ramalina peruviana*, *Punctelia borreri* از روی درختان جنگل‌های اطراف استان مازندران، شهرستان بابل جمع‌آوری شد و بعد از مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، آزمون‌های نقطه‌ای و آزمایش‌های مولکولی شناسایی گردید و عصاره‌های آن‌ها جهت بررسی اثرات ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که شناسایی مورفولوژیکی گل‌سنگ‌ها با کمک کارشناسان هرباریوم گل‌سنگ موسسه جنگل‌ها و مراتع کشور انجام شد و مقاله آن برای چاپ ارائه شده است.

استخراج عصاره

گل‌سنگ‌ها پس از جمع‌آوری در دمای اتاق خشک و پودر شده و سپس به نسبت (W/V) ۱:۵ با اتانول خالص مخلوط گردید. عصاره‌ها به روش سونیکاسیون و با خیساندن به مدت ۲۴ ساعت، تهیه شد. سپس عصاره‌های به دست آمده تغلیظ و در ۵ میلی‌لیتر DMSO حل شدند و پس از عبور از فیلتر میلی‌پور با منافذ ۰/۴۵ میکرومتری استریل شده و در نهایت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

تهیه نمونه‌های میکروبی

۵ سویه مختلف باکتری از بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه الزهراء^(س) و همچنین ۳ جدایه بالینی مخمر از نمونه های واژینال که در مطالعات قبلی استفاده شده بود و در بانک میکروبی دانشگاه الزهراء^(س) نگهداری می شد، تهیه شد. باکتری‌ها و مخمرهای استفاده شده عبارت بودند از:

Escherichia coli (ATCC 23922), *Staphylococcus aureus* (PTCC 1413), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus cereus*, *Xanthomonas campestris*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*

تعیین حساسیت میکروبی به روش انتشار در آگار

حساسیت میکروبی به عصاره‌های اتانولی گل‌سنگ‌ها به روش انتشار در آگار (روش Kirby- Bauer) براساس دستورالعمل CLSI (۲۰۱۸) انجام شد. حجم‌های ۵۰ و ۷۵ و ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌های گل‌سنگی تحت شرایط استریل به دیسک‌های خالی استریل با قطر ۶mm تلقیح شد. این عمل در چند مرحله انجام شد تا عصاره‌ها کاملاً روی دیسک‌ها بارگذاری شود. پس از قراردادن در دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد، حلال آن تبخیر شد و اثر ضد میکروبی عصاره‌ها با استفاده از روش انتشار در آگار بررسی گردید. در این روش از غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند باکتری و مخمرها، کشت یکنواختی روی محیط مولر هینتون آگار تهیه و دیسک‌های آغشته به عصاره با فواصل مناسب روی آن قرار گرفت. پلیت باکتری‌ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت مخمرها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد و قطر هاله عدم رشد، بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شدند.

تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC)

به منظور تعیین MIC عصاره‌های اتانولی گل‌سنگ‌ها علیه باکتری‌ها، از روش رقت‌سازی در پلیت‌های میکروتیتر براساس دستورالعمل CLSI (۲۰۱۲) انجام شد. ابتدا از کشت ۱۸-۲۴ ساعته باکتری‌ها، چند تک‌کلنی به سرم فیزیولوژی منتقل و پس از مخلوط کردن، کدورتی مطابق با کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سوسپانسیون باکتریایی با این کدورت حاوی CFU/ml $10^8 \times (1-2)$ سلول است. سپس رقت‌سازی در پلیت‌های میکروتیتر با استفاده از محیط کشت (TSB) Trypticase Soy Broth انجام شد و در نهایت سوسپانسیون باکتری به همه چاهک‌ها افزوده گردید، بطوری که در هر چاهک سوسپانسیونی با غلظت $10^6 \times (1-0.5)$ CFU/ml به دست آمد. میکروپلیت‌ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و آخرین چاهکی که فاقد رشد قابل مشاهده بود به عنوان حداقل غلظت تعیین شد.

در ادامه به منظور تعیین MIC عصاره‌های اتانولی گل‌سنگ‌ها علیه مخمرها، از روش رقت‌سازی در پلیت‌های میکروتیتر براساس دستورالعمل CLSI (۲۰۱۷) استفاده شد. ابتدا از کشت خالص ۲۴-۴۸ ساعته مخمرها، پنج کلنی برداشته و به ۵ میلی

لیتر سرم فیزیولوژی منتقل شده و کدورتی مطابق با ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید. سپس میزان جذب آن در طول موج ۵۳۰ نانومتر در حد ۰/۸۵ تنظیم شد.

سوسپانسیون قارچی با این مشخصات حاوی 10^6CFU/ml (۵-۱) سلول است. سپس سوسپانسیون به نسبت ۱ به ۱۰۰ با سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد و سوسپانسیونی با 10^4CFU/ml (۵/۲-۰/۵) مخمر بدست آمد.

در مرحله ی بعد رقت سازی در پلیت‌های میکروتیتر با استفاده از محیط کشت RPMI انجام شد و در نهایت سوسپانسیون مخمري به همه چاهک ها افزوده گردید. میکروپلیت ها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و آخرین چاهک فاقد رشد قابل مشاهده تعیین گردید.

به منظور کنترل آزمایش و مقایسه کارآمدی اثر عصاره‌های گل‌سنگی با آنتی‌بیوتیک‌های متداول باکتریایی و قارچی، به ترتیب از آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم و فلوکونازول استفاده شد. تمام آزمایش‌ها با ۳ بار تکرار انجام شد و نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 20) در سطح احتمال $P < 0.01$ و تست ANOVA و Excel (version 2010) تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

اندازه گیری قطر هاله‌ی عدم رشد و نتایج بدست آمده از MIC نشان داد که عصاره *Leptogium saturninum* و *Ramalina peruviana* روی مخمرها موثر بودند. نتایج قطر هاله عدم رشد هر سه گل‌سنگ در حجم‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرولیتر در جدول ۱ آمده است. *C. tropicalis* با ایجاد هاله ۱۵/۹ میلی‌متری حساس‌ترین سویه و *C. glabrata* مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره اتانولی سه گل‌سنگ گزارش شد. حداقل غلظت ممانعت از رشد عصاره *Ramalina peruviana* برای هر دو مخمر *C. tropicalis* و *C. albicans* برابر ۶/۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و علیه *C. glabrata* برابر ۱۸/۸۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین MIC عصاره *Leptogium saturninum* بر *C. albicans*، *C. tropicalis* و *C. glabrata* به ترتیب ۵، ۲/۵ و ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این در حالی است که عصاره گل‌سنگ *Punctelia borreri* تنها بر *C. albicans* موثر بود و حداقل غلظت ممانعت از رشد آن برابر ۷/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید (نمودار ۱).

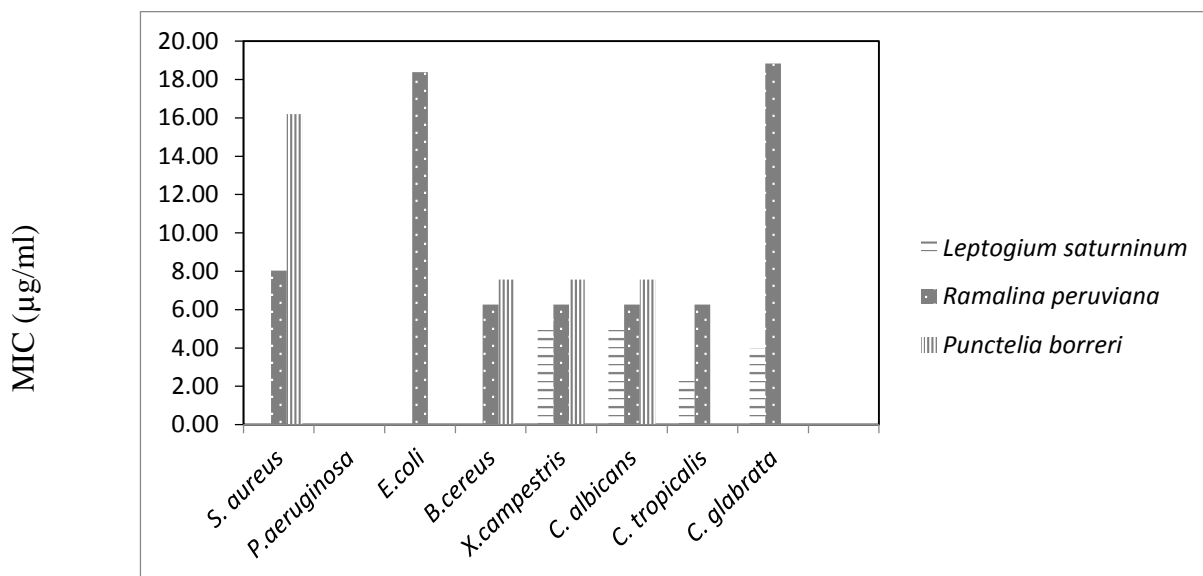
در جدول ۱ همچنین میزان قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها نشان داده شده است. باکتری گرم مثبت *S. aureus* و باکتری گرم منفی *X. campestris* نسبت به هر سه عصاره حساس بودند. این در حالی است که باکتری گرم مثبت *B. cereus* و باکتری گرم منفی *E. coli* تنها نسبت به عصاره گل‌سنگ *R. peruviana* حساسیت نشان دادند و باکتری گرم منفی *P. aeruginosa* نیز نسبت به هیچ یک از عصاره‌ها حساسیت نشان نداد.

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی گل‌سنگ‌ها بر حسب میلی متر علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

مقدار عصاره گل‌سنگ میکروارگانیسم	<i>Punctelia borreri</i>			<i>Ramalina peruviana</i>			<i>Leptogium saturninum</i>		
	۱۰۰ μl	۷۵ μl	۵۰ μl	۱۰۰ μl	۷۵ μl	۵۰ μl	۱۰۰ μl	۷۵ μl	۵۰ μl
<i>S. aureus</i>	۱۱	۹	۷	۲۰	۱۷/۹	۱۵	۱۲	۱۰/۳	۸
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	۲۲	۱۹	۱۷	-	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-	۲۳	۲۰/۸	۱۹	-	-	-
<i>X. campestris</i>	۱۴	۱۲	۱۰	۲۵	۱۷/۷	۱۱	۱۲	۱۰	۸
<i>C. albicans</i>	۱۱/۸	۱۰	۸	۱۴	۱۲	۱۰	۱۱/۸	۹	۷
<i>C. tropicalis</i>	۱۵	۸	-	۱۵/۹	۱۴	۱۱	۱۳	۱۱	۹
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	۱۰/۷	۹	۷

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری به روش میکروتیتر پلیت نشان داد که تقریباً همه باکتری‌ها نسبت به عصاره اتانولی گل‌سنگ *Leptogium saturninum* مقاوم هستند. مطابق نتایج به دست آمده تنها باکتری *X. campestris* نسبت به عصاره *Leptogium saturninum* حساسیت نشان داد و MIC آن برابر با ۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود. عصاره گل‌سنگ *Ramalina peruviana* بیشترین تاثیر را در مهار رشد همه باکتری‌ها داشت و تنها در مورد *P. aeruginosa* حساسیتی مشاهده نشد و MIC آن برای باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* و *B. cereus* و *X. campestris* به ترتیب برابر با ۸/۳۰، ۱۸/۸۳، ۶/۲۷ و ۶/۲۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

عصاره اتانولی گل‌سنگ *P. borreri* مانع رشد باکتری *E. coli* و *P. aeruginosa* نشد و تنها علیه *S. aureus*، *B. cereus* و *X. campestris* موثر بود و MIC آن به ترتیب برابر با ۲۰/۱۶، ۷/۵۶ و ۷/۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد (نمودار ۱). همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی سفنازیدیم علیه باکتری‌های مورد آزمایش در جدول ۲ آمده است. از آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم و فلوکونازول جهت کنترل کیفی کار استفاده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک فلوکونازول بر مخمرهای مورد مطالعه نیز در جدول ۳ آمده است.



نمودار ۱: حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی گل‌سنگ‌ها علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

جدول ۲: حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک سفنازیدیم علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

سفتازیدیم	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۸۰	۱۶۰	۳۲۰
µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>X. campestris</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

علامت (+) و (-) به ترتیب نشان دهنده رشد و عدم رشد باکتری است.

جدول ۳: حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک فلوکونازول بر مخمرهای مورد مطالعه

فلوکونازول	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۸۰۰	۱۶۰۰
µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-

علامت (+) و (-) به ترتیب نشان دهنده رشد و عدم رشد مخمر است.

با وجود پیشرفت‌های فوق العاده در درمان بیماری‌های انسان، هنوز بسیاری از بیماری‌های عفونی، تهدید بزرگی برای

سلامت انسان می‌باشند. مشکلات ناشی از بیماری‌های عفونی در کشورهای در حال توسعه به دلیل عدم وجود کافی دارو و ظهور

مقاومت دارویی گسترده، بیشتر قابل توجه می‌باشد.

علاقه روزافزون در استفاده از متابولیت‌های گل‌سنگی برای درمان بیماری‌های مختلف، به دلیل گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ناکارآمدی برخی از داروهای موجود می‌باشد. از این‌رو در این پژوهش، به بررسی اثرات ضد میکروبی سه گل‌سنگ جداسده از جنگل‌های استان مازندران به نام‌های *Leptogium saturninum*, *Ramalina peruviana*, *Punctelia borreri* پرداخته شد.

با توجه به فعالیت ضد میکروبی عصاره گل‌سنگ‌ها، به نظر می‌رسد که هاله عدم رشد و MIC به دست آمده برای هر یک از عصاره‌های گل‌سنگی بستگی به حلال مورد استفاده برای عصاره‌گیری، روش عصاره‌گیری و میکروارگانیسم مورد بررسی دارد. در این پژوهش با توجه به مطالعات قبلی صورت گرفته، به منظور استخراج بهتر عصاره‌ها از اتانول و روش خیساندن و سونیکاسیون استفاده شد (Ritika & Jayanthi, 2013). خیساندن همراه با تکان دادن و استفاده از امواج فراصوت موجب آزادسازی بهتر متابولیت‌ها و بالابردن بازده عصاره‌گیری از گل‌سنگ‌ها می‌شود. علاوه بر این، قطبیت بالای اتانول موجب حل شدن بهتر متابولیت‌های گل‌سنگی شده و امکان بهتری در استخراج ترکیبات شیمیایی و ضد میکروبی موجود در عصاره‌های گل‌سنگی فراهم می‌آورد.

نتایج روش انتشار در آگار این پژوهش نشان داد که باکتری‌ها بیشتر از قارچ‌ها نسبت به ترکیبات ضد میکروبی حساسیت دارند. همچنین باکتری‌های گرم منفی *X. campestris*, *E. coli*, *P. aeruginosa* در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* و *B. cereus* حساسیت کمتری نسبت به عصاره‌های گل‌سنگی از خود نشان دادند. دلیل تفاوت در میزان حساسیت قارچ‌ها، باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌تواند به تفاوت در نفوذ پذیری دیواره سلولی برگردد. دیواره سلولی قارچ‌ها از پلی ساکاریدهای مختلف چون کیتین و گلوکان تشکیل شده است. در حالی که دیواره ی باکتری‌های گرم مثبت به طور عمده از پپتیدوگلیکان و اسید تیکوئیک و دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی از پپتیدوگلیکان، لیپوپلی ساکارید و لیپوپروتئین تشکیل شده است (Valadbeigi & Shaddel, 2015).

فعالیت ضد میکروبی متابولیت‌های موجود در عصاره‌های گل‌سنگی به اشکال مختلفی دیده می‌شود. تخریب غشای پلاسمایی، ممانعت از پروتئین‌سازی و رونویسی DNA و سایر عوامل منجر به مرگ سلول و یا مهار رشد آن‌ها می‌شود. علاوه بر این، مشخص شد که افزایش غلظت عصاره‌های بارگذاری شده روی دیسک‌ها با قطر هاله عدم رشد نسبت مستقیم داشته و موجب بالابردن اثر ضد میکروبی عصاره گل‌سنگ‌ها می‌شود.

Karagoz و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که عصاره اتانولی *Xanthoria parietina* هیچ اثری روی *P. aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* ندارد، در صورتی که عصاره مذکور در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب مهار رشد *S. aureus* و *S. epidermidis* شد. در این پژوهش نیز نتایج مشابهی مشاهده گردید و مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی‌ها، بهتر مشاهده شد (Aboaba & Efuwape, 2001; Ncube et al., 2008).

نتایج این پژوهش نشان داد که مقدار MIC برای باکتری‌های گرم مثبت کم‌تر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که این موضوع می‌تواند به دلیل تفاوت نفوذپذیری دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و همچنین وجود پمپ‌های ترشحی در باکتری‌های گرم منفی مانند *P. aeruginosa* و *E. coli* باشد که موجب انتقال عوامل ضد میکروبی به خارج از سلول می‌شوند (Rankovic & Mistic, 2008; Kosanic & Rankovic, 2010; Poole et al., 1993).

همچنین دانشمندان دلیل فعالیت آنتی‌بیوتیکی گل‌سنگ‌ها را به خاطر وجود ترکیبات فنلی در متابولیت‌های گل‌سنگی می‌دانند (Ankith et al., 2017). نتایج به دست آمده از شناسایی مورفولوژیکی و همچنین استفاده از کلیدهای شناسایی گل‌سنگ‌ها (Bordo & Sharnoff, 2010) در این مطالعه نشان داد که متابولیت‌های اصلی موجود در گل‌سنگ‌های مورد مطالعه، ترکیبات فنلی می‌باشند. مکانیسم عمل ضد میکروبی مشتقات فنلی بدین شکل است که موجب تغییرات غیر قابل برگشت پروتئین‌ها و حتی القای آپوپتوز در سلول‌های میکروبی می‌شوند (Boustie & Grube, 2005). علاوه بر این، ترکیبات فنلی جزء ترکیبات میکروب‌کش قوی بوده و موجب تخریب غشاهای لیپیدی می‌شوند که می‌تواند علیه مایکوباکتریوم‌ها که دارای دیواره غنی از لیپید دارند موثر باشند (Amozegar, 2008; Cansaran et al., 2007).

Paudel و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی اثر ضد میکروبی پنج ترکیب جدا شده از عصاره اتانولی *Ramalina terebrata* که شامل اسید اوسنیک و مشتقات آن می‌باشد علیه دو باکتری *S. aureus* و *B. subtilis* با روش انتشار در آگار مطالعه کردند. همه ترکیبات بررسی شده علیه *B. subtilis* با غلظت MIC ۱-۲۶ میکروگرم بر میلی لیتر موثر بود در حالی که اسید اوسنیک تنها علیه مانع رشد باکتری *S. aureus* شد. مطالعات نشان داده است که عصاره گل‌سنگ *R. peruviana* دارای فعالیت ضد میکروبی علیه *S. aureus*, *Streptococcus mutans* می‌باشد (Moreira et al., 2015). علاوه بر این، Kambar و همکارانش در سال ۲۰۱۴ اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی چهار گل‌سنگ *Rocella montagnei*, *Ramalina hossei*, *Leptogium burnetiae* و *Heterodermia diademata* را علیه چهار باکتری *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* و *Enterococcus faecalis* مطالعه کردند و مشاهده نمودند که از میان چهار گل‌سنگ بررسی شده گل‌سنگ *R. hossei* بیشترین و *L. burnetiae* کمترین اثر ضد میکروبی را علیه باکتری‌های مورد بررسی نشان دادند.

نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز منطبق بر مطالعات فوق بود و نشان داد که عصاره اتانولی گل‌سنگ *R. peruviana* نسبت به دو گل‌سنگ دیگر دارای اثرات ضد میکروبی قوی‌تری می‌باشد. همچنین مشخص شد که باکتری‌های گرم مثبت بررسی شده در این تحقیق حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی از خود نشان می‌دهند. علاوه بر این مطالعات نشان داده است که عصاره استنی *Evernia prunastri* و *Hypogymnia physodes* اثرات مهارکنندگی بر رشد قارچ‌های پاتوژن گیاهی دارند. همچنین گزارش‌هایی وجود دارد که عصاره متانولی *Usnea subfloridans* می‌تواند رشد *Aspergillus niger* را مهار کند.

در تحقیق حاضر نیز هر سه گل‌سنگ مورد آزمایش روی مخمرهای بیماریزا موثر بودند که برای شناسایی اجزای موثر متابولیت‌های هر یک از این گل‌سنگ‌ها، نیاز به پژوهش‌های بیشتری می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان گفت که شناخت، جداسازی و تخلیص متابولیت‌های موجود در عصاره گل‌سنگ‌هایی چون *L. saturninum*, *R. peruviana*, *P. borrieri* می‌تواند در کنترل رشد عوامل میکروبی مورد توجه قرار گیرد. مطالعات گسترده‌تری باید انجام شود تا امکان استفاده از این متابولیت‌های گل‌سنگی در درمان عفونت‌ها بررسی شود. اگرچه داروهای شیمیایی دارای اثر مهارکنندگی بیشتری می‌باشند، اما با افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و اثرات جانبی داروهای شیمیایی، شناسایی گل‌سنگ‌های محلی و بررسی خواص ضد میکروبی متابولیت‌های آنها نه تنها در درمان عفونت‌ها می‌تواند مورد توجه قرار گیرد بلکه استفاده از این ترکیبات در کنترل جمعیت‌های میکروبی در اکوسیستم‌های مختلف همچون خاک پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

تمامی آزمون‌های مربوط به این پژوهش در آزمایشگاه‌های شایسته سپهر و آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه الزهراء (س) انجام شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از پروفیسور معصومی و همکاران ایشان به دلیل همکاری در بخش شناسایی کلاسیک گل‌سنگ‌ها تشکر نمایند. از کارشناسان محترم آزمایشگاه خصوصاً خانم مریم یوسفی به دلیل کمک‌های تکنیکی‌شان تقدیر می‌گردد. این پژوهش با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه الزهراء (س) انجام گردید.

منابع

- Aboaba, O. O. and Efuwape, B. M., (2001). "Antibacterial properties of some Nigerian spices". *Biolo.Res Commun*, 13,183 – 188.
- Adriana, B., Daniela, R., Stefano L., Annalisa, D. S., Angela, N., Sergio, S., Barbara, C., Luca, P., Francesca, D. R., Anna, M. M., Lucia, A. and Paola B., (2015). "Antiproliferative, Antibacterial and Antifungal Activity of the Lichen *Xanthoria parietina* and Its Secondary Metabolite *Parietin*". *Molecular Sciences*, 16, 7861-7875.
- Amoozgar, D. M. A. (2008). *Microbiology*.
- Ankith, G., Rajesh, M., Karthik, K., Avinash, H., Prashith, K. T., Vinayaka, K., (2017). "Antibacterial and Antifungal Activity of three *Ramalina* Species". *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 7(5):27-32.
- Bates, S. T., Cropsey, G. W., Caporaso, J. G., Knight, R., Fierer, N. (2011). "Bacterial communities associated with the lichen symbiosis". *Applied and Environment Microbiology* 77, 1309–1314.
- Bauer, R. W., Kirby, M. D. K., Sherris, J. C., Truk, M. (1966). "Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method". *American Journal of Clinical Pathology*, 45,493–496.

- Bordo, I. M., Sharnoff, S. D. and Sharnof, S. (2001). *Lichens of North America*, Yale University Press. New Haven and London.
- Boustie, J., Grube, M. (2005). "Lichens-A promising source of bioactive secondary metabolites". *Plant Genet. Resour*, 3, 273–287.
- Bown, D. (2001). "Encyclopedia of Herbs and Their Uses". Dorling Kindersley, London.
- Cansaran, D., Atakol, O., Halici, M. G., Aksoy, A. (2007). "HPLC analysis of usnic acid in some Ramalina species from Anatolia and investigation of their antimicrobial activities". *Pharm. Biol.* 45, 77–81.
- CLSI, Pennsylvania, USA (2012). *Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition*. CLSI document M07-A9.
- CLSI, Pennsylvania, USA (2002). *Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition*. CLSI document M27-A2.
- CLSI, Pennsylvania, USA (2003). *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Proposed Guideline*. CLSI document M44-P.
- Huneck, D. S., Yoshimura, D. I. (1996). *Identification of Lichen Substances*.
- Kambar, Y., Vivek, M. N., Manasa, M., Vinayaka, K. S., Mallikarjun, N., Prashith Kekuda, T. R. (2014). "Antimicrobial Activity of *Leptogium burnetiae*, *Ramalina hossei*, *Roccella montagnei* and *Heterodermia diademata*". Prashith Kekuda T.R. et al / *Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res.* 4 (3): 164-168.
- Karagoz, A., Dogruoz, N., Zeybek, Z., Aslan, A. (2009). "Antibacterial activity of some lichen extracts". *J.Med.plant.Res.* 3 (12), 1034-1039.
- Kosanic, B., Rankovic, B. (2010). "Screening of antimicrobial activity of some lichen species in vitro". *Kragujevac J. Sci*, 32, 65-72.
- Lerond, M., Van Haluwynne, C., Cuny, D. (1996). "Lichen et bioindication". *Ecology* 27(4), 277-283.
- Manojlovic, N. T., Vasiljevic, P. J., Maskovic, P. Z., Juskovic, M. and Bogdanovic, G. (2012). "Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica*". *Evidence-Based Complementary*.
- Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Tomic, S., Stankovic, M., Radojevic, I., Stefanovic, O., Comic, L., Dacic, D., Curcic, M. and Markovic, S. (2011). "Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species". *Molecular Sciences*, 12, 5428-5448.
- Molnar, K., Farkas, E. (2010). *Biological activities of secondary lichen metabolites*.
- Moreira, A. S. N., Braz-Filho, R., Mussi-Dias, V. and Vieira, I. J. C. (2015). "Chemistry and Biological Activity of *Ramalina* Lichenized Fungi". *Molecules*. 20, 8952-8987
- Ncube, N. S., Afolayan, A. J., Okoh, A. I. (2008). "Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends". *Afr J Biotech.* 7,1797-1806.
- Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, H. K., Oh, H., Shin, H. W., Han, J., Yim, J. H. (2010). "Antibacterial activities of ramalin, usnic acid and its tree derivatives isolated from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*". *Z. Naturforschung*, 65, 34–38.
- Poole, K., et al (1993). "Multiple antibiotic resistances in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon". *J. Bacteriol.* 175, 7363 – 7372.

- Rankovic, B., Mistic, M. (2008). "The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspresa*". *Pharm.biotech.* 1013-1016.
- Ritika, C., Jayanthi, A. (2013). "In Vitro Antimicrobial Potential of the Lichen *Parmotrema* sp Extracts against Various Pathogens". *Iran J Basic Med Sci.* 16, 7, 880-885.
- Valadbeigi, T., and Minoos Shaddel, M. (2015). "Antibacterial and Antifungal Activities of Gelatinose and non-Gelatinose Lichen Species". *J Arch Mil Med.* 3(4):e31610.
- Vartia, K. O. (1949). "Antibiotics in lichens". *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 27 (1), 46-54.
- Zeybek, U., John, V., Lumbsch, H. T. (1992) "Türkiye likenlerinden *Hypogymnia* cinsi üzerinde taksonomik araştırma". *Doğa Tr. J. of Bot.* 17, 09-116

Antimicrobial effects of *Leptogium saturninum*, *Ramalina peruviana* and *Punctelia borreri*

F.Hamzekhani¹, P. Mohammadi^{2*}, A. Saboora³

Received: 2019.5.28

Accepted: 2020.12.7

Abstract

Lichens produce high diversity of metabolites and they have different biological activities including antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory and the cytotoxic effects. In this study, the impact of antimicrobial substances of lichens were studied. For this purpose, the lichens of northern forests around Babol city was collected and via the morphological and microscopic characteristics, biochemical and molecular methods were identified. Then, ethanol extracts of lichens were prepared. Antimicrobial effects of extracts was assayed using the diffusion agar method and the determination of minimum inhibitory concentration against five bacteria, *Bacillus cereus*, *Xanthomonas campestris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The studies showed that the extract of *Leptogium saturninum*, *Ramalina peruviana*, *Punctelia borreri* were effective against *X. campestris*· *S. aureus*. However, in the case of *Bacillus cereus* and *E.coli* only the extract of *R. peruviana* was effective. Furthermore, measuring the diameter of zone inhibition and MIC against three clinical *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida glabrata* showed that the extracts of *Leptogium saturninum*, *Ramalina peruviana* were effective on all the strains. However the extract of *Punktelia subroducta* was effective only on *C.albicans*. The substance of lichens, which assayed by biochemical tests showed that due to the presence of phenolic compounds, lichens show high antimicrobial properties. It should be carried out the antimicrobial experiments on a wide range of environmental and pathogenic microorganisms.

Keywords: Antibacterial, Antifungal, Lichen, MIC

1-MSc. Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Al-Zahra University

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Al-Zahra University

*(Corresponding author: mohamadi_p@yahoo.com)

3- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Al-Zahra University