فصلنامه علمی - پژوهشی زیست شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۳ ، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹

بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره گلسنگ‌های *Leptogium saturninum*، *Ramalina peruviana* و *Punctelia borreri*

فائزه حمزه خانی[۱]،پریسا محمدی*[۱] ، عذرا 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، ضددرد 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، آزمون های 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, Xanthomonas campestris, Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa, و سه مخمر Candida albicans, Candida glabrata tropicalis بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره گلسنگ‌های Leptogium saturninum, Ramalina peruviana, Punctelia borreri علیه X. campestris و S. aureus موثر بودند. این در حالی است که در مورد E. coli 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 و Ramalina peruviana 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 ضدمیکروبی طبیعی در گلسنگ‌ها، استفاده از آن‌ها در صنایع دارویی توصیه می‌شود. تحقیقات بیشتری لازم است تا اثر ضدمیکروبی این متابولیت ها 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 الزهرا (س)
۲- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)
*(نویسنده مسئول: p.mohammadi@alzahra.ac.ir)

مقدمه

گلسنگ‌ها همزیست هایی متشکل از حداقل دو موجود زنده، یعنی یک قارچ و یک شریک فتوسنتزی می باشند (Bates *et al.* 2011). شریک فتوسنتزی ممکن است جلبک یا سیانوباکتری باشد. گلسنگ‌ها قادرند متابولیت های مختلفی تولید کنند. تا کنون بیش از ۷۰۰ نوع متابولیت در گلسنگ‌ها شناسایی شده است که به ندرت در ارگانیسم های دیگر یافت می شوند. رشد آرام و زندگی در شرایط سخت، گلسنگ ها را مجبور به تولید متابولیت هایی می کند که برای حفظ حیات شان در زیستگاه های خاص حائز اهمیت است (Mitrovic *et al*. 2011). این متابولیت ها ترکیبات خارج سلولی بوده که گاه به صورت کریستال روی سطح هیف های قارچی تولید می شوند و شامل ترکیبات مختلفی مانند اسیدهای آلیفاتیک، لاکتون های ماکروسیکلیکی، دپسیدها، دپسیدون ها و غیره هستند (Molnar & Farkas, 2010). این ترکیبات اثرات زیستی مختلفی از جمله اثرات آنتی بیوتیکی، آنتی اکسیدانی، ضد قارچی، ضد ویروسی، سیتوتوکسیکی و ضد باکتریایی دارند. فعالیت‌های دارویی متابولیت‌های گلسنگی اولین بار توسط Zopfs 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 کرده ی آن‌ها استفاده‌های زیادی می‌شده است (Bown, 2001). گزارش شده است برخی از گلسنگ‌ها مانند *Cladonia* و *Lobaria* در درمان سل موثر بوده و استفاده می شده است (Vartia, 1973). برخی از اسیدهای گلسنگی به ویژه اسید اوسنیک خاصیت آنتی بیوتیکی داشته و از گذشته‌های دور از پودر این گلسنگ در درمان التهابات سوختگی های پوستی نوزادان نیوزیلندی و عشایر ایرانی استفاده می‌شده است. علاوه بر این، گزارش هایی مبنی بر استفاده از برخی از متابولیت‌های دیگر گلسنگ‌ها در درمان بیماری‌های مختلفی مانند اگزما، 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 اسیداوسنیک 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 میکروارگانیسم‌هایی مثل باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها شناسایی شده که اثربازدارندگی رشد دارند (Kosani´c *et al*. 2012; Manojlovi´c *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 بیماری زای 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 *Xanthoria parietina*، *Parmelia*، *Physcia* و *Caloplaca* وجود دارند، دارای خاصیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند. Vartia سال ۱۹۷۳ در گزارش خود، فعالیت ضدمیکروبی گلسنگ‌های فنلاند علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و نیز برخی قارچ‌ها را گزارش کرد.

دانشمندان اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های اتیل الکل، کلروفرم و ان-هگزان گلسنگ *Ramalina farinacea* را علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Salmonella typhi*، *Pseudomonas aeruginosa* گزارش کرده اند. همچنین عصاره متانولی گلسنگ *Usnea ghattensis* دارای خاصیت آنتی‌بیوتیکی قوی علیه *Bacillus megaterium*، *Staphylococcus sp.* و *B. subtilis* 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 می باشدکه تأثیر زیادی در کنترل جمعیت باکتری‌های خاک دارد.

مواد و روش ها

جمع آوری و شناسایی نمونه ها

سه گلسنگ *Punctelia borreri*, *Ramalina peruviana* و *Leptogium saturninum* از روی درختان جنگل های اطراف استان مازندران، شهرستان بابل جمع آوری شد و بعد از مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، آزمون‌های نقطه‌ای و آزمایش های مولکولی شناسایی گردید و عصاره های آن ها جهت بررسی اثرات ضدمیکروبی مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که شناسایی مورفولوژیکی گلسنگ ها با کمک کارشناسان هرباریوم گلسنگ موسسه جنگل ها و مراتع کشور انجام شد و مقاله آن برای چاپ ارائه شده است.

استخراج عصاره

گلسنگ ها پس از جمع آوری در دمای اتاق خشک و پودر شده و سپس به نسبت (w/v) ۱:۵ با اتانول خالص مخلوط گردید. عصاره ها به روش سونیکاسیون و با خیساندن به مدت ۲۴ ساعت، تهیه شد. سپس عصاره های به دست آمده تغلیظ و در ۵ میلی لیتر DMSO حل شدند و پس از عبور از فیلتر میلی پور با منافذ ۰/۴۵ میکرومتری استریل شده و در نهایت در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند.

تهیه نمونه‌های میکروبی

۵ سویه مختلف باکتری از بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه الزهرا(س) و همچنین ۳ جدایه بالینی مخمر از نمونه های واژینال که در مطالعات قبلی استفاده شده بود و در بانک میکروبی دانشگاه الزهرا (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 عصاره ها کاملاً روی دیسک ها بارگذاری شود. پس از قراردادن در دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی گراد، حلال آن تبخیر شد و اثر ضدمیکروبی عصاره ها 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 دیسک های آغشته به عصاره با فواصل مناسب روی آن قرار گرفت. پلیت باکتری ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و پلیت مخمرها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد و قطر هاله عدم رشد، بر حسب میلی متر اندازه گیری گردید. آزمایش ها با سه تکرار انجام شدند.

تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC)

به منظور تعیین MIC عصاره‌های اتانولی گلسنگ‌ها علیه باکتری ها، از روش رقت سازی در پلیت‌های میکروتیتر براساس دستورالعمل CLSI (۲۰۱۲) انجام شد. ابتدا از کشت ۲۴-۱۸ ساعته باکتری‌ها، چند تک کلنی 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 $۱۰^{۸}$×(۲-۱) سلول است. سپس رقت سازی در پلیت‌های میکروتیتر با استفاده از محیط کشت Trypticase Soy Broth (TSB) انجام شد و در نهایت سوسپانسیون باکتری به همه چاهک ها افزوده گردید، بطوری که در هر چاهک سوسپانسیونی با غلظت CFU/ml $۱۰^{۶}$×(۱-۰/۵) به دست آمد. میکروپلیت ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 رقت سازی در پلیت‌های میکروتیتر براساس دستورالعمل CLSI (۲۰۱۷) استفاده شد. ابتدا از کشت خالص ۴۸-۲۴ 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 $۱۰^{۶}$CFU/ml× (۵-۱) سلول است. سپس سوسپانسیون به نسبت ۱ به ۱۰۰ با سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد و سوسپانسیونی با CFU/ml $۱۰^{۴}$×(۲/۵-۰/۵) مخمر بدست آمد.

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

به منظور کنترل آزمایش و مقایسه کارآمدی اثر عصاره‌های گلسنگی با آنتی بیوتیک‌های متداول باکتریایی و قارچی، به ترتیب از آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و فلوکونازول استفاده شد. تمام آزمایش‌ها با ۳بار 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 حجم های ۵۰،۷۵ و ۱۰۰ میکرولیتر در جدول ۱ آمده است. *C. tropicalis* با ایجاد هاله ۱۵/۹ میلی‌متری حساس ترین سویه و *C. glabrata* مقاوم ترین سویه نسبت به عصاره اتانولی سه گلسنگ گزارش شد. حداقل غلظت ممانعت از رشد عصاره *Ramalina peruviana* برای هر دو مخمر *C. albicans* و *C. tropicalis* برابر ۶/۲۷ میکروگرم بر میلی لیتر و علیه *C. glabrata* برابر ۱۸/۸۳ میکروگرم بر میلی لیتر بود. همچنین MIC عصاره *Leptogium saturninum* بر *C. albicans*، *C. tropicalis* و *C. glabrata* به ترتیب ۵ ، ۲/۵ و ۴ میکروگرم بر میلی لیتر 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).

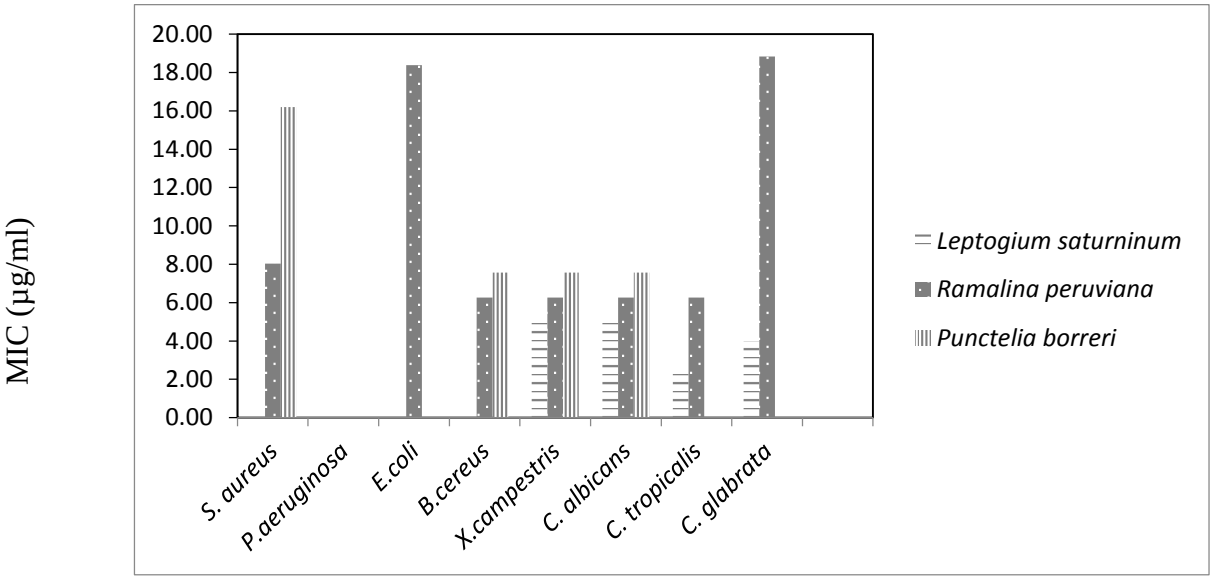
در جدول ۱ همچنین میزان قطر هاله عدم رشد باکتری ها نشان داده شده است. باکتری گرم مثبت *S. aureus* و باکتری گرم منفی *X. campestris* نسبت به هر سه عصاره حساس بودند. این در حالی است که باکتری گرم مثبت *B. cereus* و باکتری گرم منفی *E.coli* تنها نسبت به عصاره گلسنگ *R. peruviana* حساسیت نشان دادند و باکتری 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	*Punctelia borreri*			*Ramalina peruviana*			*Leptogium saturninum*		
	۱۰۰µl	۷۵µl	۵۰µl	۱۰۰µl	۷۵µl	۵۰µl	۱۰۰µl	۷۵µl	۵۰µl
S. aureus	۱۱	۹	۷	۲۰	۱۷/۹	۱۵	۱۲	۱۰/۳	۸
P. aeruginosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	۲۲	۱۹	۱۷	-	-	-
B. cereus	-	-	-	۲۳	۲۰/۸	۱۹	-	-	-
X. campestris	۱۴	۱۲	۱۰	۲۵	۱۷/۷	۱۱	۱۲	۱۰	۸
C. albicans	۱۱/۸	۱۰	۸	۱۴	۱۲	۱۰	۱۱/۸	۹	۷
C. tropicalis	۱۵	۸	-	۱۵/۹	۱۴	۱۱	۱۳	۱۱	۹
C. glabrata	-	-	-	-	-	-	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 به‌دست‌آمده تنها باکتری *X. campestris* نسبت به عصاره *Leptogium saturninum* حساسیت نشان داد و MIC آن برابر با ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر به دست آمد (نمودار ۱). همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی سفتازیدیم علیه باکتری‌های مورد آزمایش در جدول ۲ آمده است. از آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و فلوکونازول جهت کنترل کیفی کار استفاده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک فلوکونازول بر مخمرهای مورد مطالعه نیز در جدول ۳ آمده است.



نمودار۱: حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی گلسنگ‌ها علیه میکروارگانیسم های مورد مطالعه

جدول۲: حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی بیوتیک سفتازیدیم علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

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

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

جدول۳: حداقل غلظت مهار کنندگی آنتی بیوتیک فلوکونازول بر مخمرهای مورد مطالعه

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

علائم (+) 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 جداشده از جنگل‌های استان مازندران به نام‌های *Leptogium saturninum, Ramalina peruviana ,Punctelia borreri* پرداخته شد.

با توجه به فعالیت ضدمیکروبی عصاره گلسنگ ها، به نظر می‌رسد که هاله عدم رشد و MIC به دست آمده برای هریک 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 حل‌شدن بهتر متابولیت‌های گلسنگی شده و امکان بهتری در استخراج ترکیبات شیمیایی و ضدمیکروبی موجود در عصاره‌های گلسنگی فراهم می آورد.

نتایج روش انتشار در آگار این پژوهش نشان داد که باکتری‌ها بیشتر از قارچ ها نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی حساسیت دارند. همچنین باکتری های گرم منفی *X. campestris, E. coli, P. aeruginosa* در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت *B. cereus* و*S. aureus* حساسیت کمتری نسبت به عصاره‌های گلسنگی از خود نشان دادند. دلیل تفاوت در میزان حساسیت قارچ ها، باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌تواند به تفاوت در نفوذ پذیری دیواره سلولی برگردد. دیواره سلولی قارچ ها 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، لیپوپلی‌ساکارید و لیپوپروتئین تشکیل شده است (Valadbeigi & Shaddel, 2015).

فعالیت ضدمیکروبی متابولیت‌های موجود در عصاره‌های گلسنگی به اشکال مختلفی دیده می شود. 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 ضدمیکروبی عصاره گلسنگ ها می شود.

Karagoz و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که عصاره اتانولی *Xanthoria parietina* هیچ اثری روی *P. aeruginosa E. coli,* و *Klebsiella pneumonia* ندارد، در صورتی‌که 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 ضدمیکروبی به خارج از سلول می‌شوند (Rankovic & Misic, 2008; Kosanic & Rankovic, 2010; Poole *et al*., 1993).

همچنین دانشمندان دلیل فعالیت آنتی‌بیوتیکی گلسنگ‌ها را به خاطر وجود ترکیات 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 ضدمیکروبی 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 دیواره‌ی غنی از لیپید دارند موثر باشند (Amozegar, 2008; Cansaran *et al*., 2007).

Paudel و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی اثر ضدمیکروبی پنج ترکیب جداشده 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 ۲۶-۱ میکروگرم بر میلی لیتر موثر بود در حالی‌که اسید اوسنیک تنها علیه مانع رشد باکتری *S. aureus* شد. مطالعات نشان داده است که عصاره گلسنگ *R. peruviana* دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه *S.aureus, Streptococcus mutans* می‌باشد (Moreira *et al*.,2015). علاوه براین، Kambar و همکارانش در سال ۲۰۱۴ اثرات ضدمیکروبی عصاره اتانولی چهار گلسنگ *Roccella montagnei*, *Ramalina hossei*, *Leptogium burnetiae* و *Heterodermia diademata* را علیه چهار باکتری*K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* *S. aureus* مطالعه کردند و مشاهده نمودند که از میان چهار گلسنگ بررسی شده گلسنگ *R. hossei* بیشترین و *L. burnetiae* کمترین اثر ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 قارچ های پاتوژن گیاهی دارند. همچنین گزارش هایی 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 متابولیت های هریک از این گلسنگ ها، نیاز به پژوهش های بیشتری می باشد.

نتیجه گیری

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. borreri* می‌تواند در کنترل رشد عوامل میکروبی مورد توجه قرار گیرد. مطالعات گسترده تری باید انجام شود تا امکان استفاده از این متابولیت‌های گلسنگی در درمان عفونت‌ها بررسی شود. اگرچه داروهای شیمیایی دارای اثر مهارکنندگی بیشتری می باشند، اما با افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و اثرات جانبی داروهای شیمیایی، شناسایی گلسنگ‌های محلی و بررسی خواص ضدمیکروبی متابولیت‌های آن‌ها نه‌تنها در درمان عفونت‌ها می تواند مورد توجه قرار گیرد بلکه استفاده از این ترکیبات در کنترل جمعیت‌های میکروبی در اکوسیستم‌های مختلف همچون خاک پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

تمامی آزمون های 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 پروفسور معصومی و همکاران ایشان به دلیل همکاری در بخش شناسایی کلاسیک گلسنگ ها تشکر نمایند. از کارشناسان محترم آزمایشگاه خصوصاً خانم مریم یوسفی به دلیل کمک های تکنیکی‌شان تقدیر می گردد. 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.

Amoozegar, 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 Haluwyne, 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., Tosic, 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., Misic, 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 Minoo 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.Hamzekhani[1], P. Mohammadi[2*], A. Saboora[3]

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*, *Staphylococus 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 glabrat* showed that the extracts of *Leptogium saturninum, Ramalina peruviana* were effective on all the strains. However the extract of *Punktelia subrodecta* 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