Archive of SID

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های گلسنگ *Lecanora muralis SP.* بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی

شهرزاد نصیری سمنانی[1*]، مهدی رهنما[1]، حسن قاسم پور[1]، حامد علیزاده[2]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، مرکزتحقیقات بیولوژی، زنجان، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، زنجان، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۶/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* از عوامل مهم عفونی و امروزه مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها بوده و یافتن ترکیبات ضد میکروبی علیه آن‌ها ضروری می‌باشد. هدف از این پژوهش ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های *Lecanora muralis SP.* علیه این باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه عصاره‌های آبی، استونی و اتانولی *Lecanora muralis SP.* تهیه و اثر ضد میکروبی آن‌ها با روش انتشار چاهکی در آگار و میزان MIC و MBC با روش رقت در براث تعیین گردید. در مطالعه مدل حیوانی، پس از ۲۴ ساعت از آلوده شدن موش‌ها به باکتری‌ها تیمار با تزریق ۰/۵ میلی لیتر از عصاره‌های *Lecanora muralis SP* (با غلظت MBC) انجام و تعداد کلونی‌های باکتری‌های مذکور در طحال پس از گذشت ۹ روز با کشت بر روی محیط آگاردار شمارش گردید.

نتایج: نتایج به دست آمده مشخص نمود که MIC عصاره استونی برای *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱۰۳/۷۵ و ۲۰۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و عصاره اتانولی ۴۹/۸۱ و ۹۹/۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوده و عصاره آبی اثر ضد میکروبی بر روی باکتری‌ها نشان نداد. در مدل حیوانی میانگین تعداد باکتری‌های رشد کرده در گروه‌های آزمایش نسبت به گروه‌های کنترل کاهش معنی دار نشان داد.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی در مقایسه با عصاره استونی فعالیت بیشتری داشته و *سالمونلا تیفی موریوم* به عصاره‌ها حساس‌تر می‌باشد.

کلمات کلیدی: ***استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، عصاره‌های *Lecanora muralis SP.*، اثر ضد میکروبی.**

مقدمه

گلسنگ‌ها حاصل از همزیستی قارچ-جلبک هستند که خواص ضد میکروبی دارند و از سالیان دور در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱). متابولیت‌های ثانویه گلسنگ بیش از ۳۰٪ وزن خشک تال را شامل می‌شود (۲، ۳). ترکیبات ضد میکروبی گلسنگ‌ها شامل پلی ساکاریدها (با فعالیت ضد سرطانی)، depsides، depsidones، Coumarones، مشتقات بنزوفورن، گزانتون‌ها یا مشتقات اسیدهای چرب (اکسی اکسو اسیدها-لاکتون‌ها) می‌باشد (۴). برخی از عصاره‌های گلسنگ‌ها دارای خواص ضد سرطانی، ضد ویروسی و ضد آلرژی می‌باشند (۷-۵). اولین بررسی‌های ضد باکتریایی گلسنگ‌ها توسط Burkholder انجام شد (۴). بعدها محققین دیگری خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی برخی از گلسنگ‌ها را بر روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت گزارش نمودند (۱۰-۸). *استافیلوکوکوس اورئوس* باکتری‌های کروی گرم مثبت با متابولیک فعال و از مهم ترین

*نویسنده مسئول: **شهرزاد نصیری سمنانی**، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، مرکز تحقیقات بیولوژی، زنجان، ایران. تلفن:۰۹۱۲۷۴۰۲۵۶۴ Email:Sh.nasiri92@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

عوامل عفونت‌های بیمارستانی بوده که شیوع آن نسبتاً رو به گسترش می‌باشد. این باکتری در ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله اندوکاریت، استئومیلیت، پنومونی، سندرم شوک سمی، کورک و دمل نقش دارد. تخمین زده می‌شود که ۳۰-۲۵ درصد افراد در جوامع مختلف ناقل *استافیلوکوکوس اورئوس* در بینی خود می‌باشند که در بسیاری از موارد منشا عفونت همین ناقلین طبیعی می‌باشد (۱۱، ۱۲). *سالمونلا تیفی موریوم* گونه‌ای از جنس سالمونلا از خانواده‌ی انتروباکتریاسه است این باکتری باسیل گرم منفی، هوازی یا بی هوازی اختیاری، به اندازه‌ی ۰/۵ در ۳ میکرون، فاقد اسپور، متحرک و دارای فلاژل پری تریش است که از طریق خوراکی وارد بدن انسان شده و موجب بیماری‌هایی از قبیل التهاب روده، عفونت سیستمیک و تب روده‌ای می‌شوند (۱۳).

گسترش روز افزون سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* مقاوم به آنتی بیوتیک، از معضلاتی است که امروزه پزشکان با آن مواجه هستند و به همین علت روز به روز تعداد آنتی بیوتیک‌های موثر و در دسترس برای درمان این عفونت‌ها کاهش می‌یابد (۱۲). از شروع قرن ۲۱ میلادی با توجه به اثرات جانبی آنتی بیوتیک‌های تجاری و مقاومت‌های باکتریایی در برابر آن‌ها، توجه به طب سنتی و استفاده از گیاهان دارویی که یکی از منابع با ارزش در پزشکی به شمار می‌آیند، افزایش یافت. از طرفی در پی گسترش بیماری‌های عفونی، شناسایی تعداد گیاهان دارویی و خالص سازی ترکیبات موثره آن‌ها در درمان بیماری‌ها می‌تواند راه‌های درمانی جدیدی علیه بیماری‌های عفونی پیشنهاد دهد.

هدف از این پژوهش بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های اتانولی و استونی *Lecanora muralis SP.* بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی و عصاره‌گیری

گلسنگ *Lecanora muralis SP.* در اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ از حوالی شهرستان زنجان و طارم جمع آوری و پس از شناسایی توسط گیاه شناسان مورد استفاده قرار گرفت (۱۶-۱۴). نمونه‌ها پس از جمع آوری در سایه خشک و پس از پودر شدن درون شیشه‌های مات در محیط خشک تا زمان استفاده نگه داری شد. برای عصاره‌گیری ۵۰ گرم از پودر گلسنگ را به نسبت ۴: ۱ با حلال‌های مورد آزمایش (آب، اتانول ۸۰٪ و استون مطلق) مخلوط و ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه نگه داری و هر یک ساعت یک بار با میله شیشه‌ای مخلوط حاصل هم زده شدند. سپس با گاز استریل ۴ لایه‌ای و قیف صاف و در مرحله بعد عمل سانتریفوژ با دور ۲۵۰۰ در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام و عصاره‌ها در خلا تقطیر و تغلیظ گردیدند. عصاره‌های حاصل با استفاده از فیلترهای میکروبی ۰/۴۵ میکرونی استریل و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری استریل تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند (۱۷).

تهیه باکتری

باکتری‌های *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از بانک میکروبی آزمایشگاه بیمارستان آیت ا... موسوی زنجان (جدا شده از نمونه‌های بالینی) تهیه شد. موش‌ها از موسسه سرم و واکسن سازی کرج، محیط‌های کشت مورد استفاده و اتانول از شرکت مرک و استون از شرکت سیگما تهیه گردید. موش‌ها در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی گراد، دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس‌های انفرادی نگه داری شدند. نویسندگان مقاله در طول انجام آزمایش ملزم به رعایت حقوق حیوانات بوده‌اند.

تعیین اثر ضد میکروبی عصاره‌ها به روش انتشار چاهکی در آگار

بر روی محیط مولر هینتون آگار چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی متر ایجاد و پس از کشت باکتری از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند توسط سوآب استریل، در هر چاهک حدود ۸۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره تلقیح شد. سپس پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و در نهایت هاله‌های عدم رشد باکتری‌ها توسط خط کش اندازه‌گیری شد. مراحل فوق با سه بار تکرار انجام گردید (۱۸).

تعیین MIC و MBC

برای تعیین MIC و MBC عصاره‌ها از روش ماکرودایلوشن در براث استفاده شد. به این منظور ابتدا غلظت‌های ۸۲۰-۲۴ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره‌ها در محیط مولر هینتون براث تهیه

www.SID.ir

Archive of SID

گردید. سپس با افزودن ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی با کدورت 10^5 × ۵ باکتری در هر میلی لیتر غلظت‌های نهایی عصاره‌ها به میزان ۱۲ تا ۴۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر تنظیم شدند. لوله‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. سپس کدورت لوله‌ها بررسی شده و یک ساب کالچر بر روی محیط مولر هینتون آگار نیز داده شد. اولین لوله از غلظت‌های پائین عصاره‌ها که فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بود به عنوان غلظت MIC در نظر گرفته شده و اولین لوله از غلظت‌های عصاره‌ها که در آنها ۹۹/۹ درصد از مقدار تلقیح اولیه باکتری‌ها از بین رفته بود و در ساب کالچر فقط یک درصد از باکتری رشد کرده بودند به عنوان غلظت MBC عصاره در نظر گرفته شد. این بررسی سه بار تکرار شده و در کنار لوله‌های تست برای تعیین MIC، کنترل مثبت شامل باکتری در محیط فاقد عصاره برای مقایسه کدورت لوله‌های مورد آزمایش انجام شد (۱۹، ۲۰).

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ها در مدل حیوانی

جهت بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های گلسنگ در مدل حیوانی از موش‌های ماده BALB/c ۸-۶ هفته‌ای استفاده شد. ۱۸سر موش ماده BALB/c به ۶ گروه ۳ تایی تقسیم و از هر تیمار به ۲ گروه تزریق و ۲ گروه نیز به عنوان گروه‌های شاهد دریافت کننده نرمال سالین استریل بودند (۲۱). برای تهیه سوسپانسیون میکروبی جهت ایجاد عفونت در موش‌ها، از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های مذکور سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند که حاوی 10^8× ۱/۵ باکتری در هر میلی لیتر بود تهیه کرده و آن را به نسبت ۱:۳۰۰ در نرمال سالین استریل رقیق شده تا رقت سوسپانسیون میکروبی جهت تزریق، به تعداد 10^5 × ۵ باکتری در هر میلی لیتر برسد (۲۱). در روز اول به هر گروه، تعداد 10^5 × ۵ باکتری به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در روز بعد، ۰/۵ سی سی (برابر غلظت MBC تیمارها) از عصاره‌های استونی و اتانولی گلسنگ به صورت داخل صفاقی به ۴ گروه و نرمال سالین به ۲ گروه شاهد تزریق شد. پس از ۷ روز، موش‌ها با بی هوشی در اتر کشته شدند و طحال حیوانات در شرایط استریل خارج و در ۱۰ میلی لیتر فسفات بافر سالین استریل به مقدار هموژنیزه شدند، سپس از سوسپانسیون هموژنیزه طحالی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت انجام گرفت. پلیت‌های مذکور در ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری گردیدند و سپس تعداد باکتری‌های رشد کرده مورد شمارش قرار گرفت (۲۱).

تجزیه و تحلیل آماری

یافته‌های این مطالعه با نرم افزار SPSS و آزمون آماری One Way ANOVA (LSD) تحلیل و در p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شدند.

نتایج

نتایج بررسی اثر عصاره‌ها به روش انتشار چاهکی

نتایج تحلیل آماری مشخص نمود که در سطح معنی $p>0/05$ تفاوت معنی داری ما بین نوع حلال‌های عصاره‌گیری شده وجود دارد به طوری که بیشترین هاله عدم رشد مربوط به عصاره خالص استونی گلسنگ و کم‌ترین هاله عدم رشد مربوط به عصاره اتانولی باغلظت ۴۹/۸۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. مقدار حداکثر و حداقل هاله عدم رشد برای عصاره اتانولی به ترتیب برابر ۲۵ و ۶ میلی متر، عصاره استونی ۳۹/۶۶ و ۵/۳۳ میلی متر می‌باشد (جدول ۱ و ۲). بیشترین و کمترین هاله‌های عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* ۲۵/۶۶ و ۸ میلی متر به ترتیب مربوط عصاره اتانولی خالص و غلظت ۹۹/۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر است، بررسی‌های آماری نشان داد که عصاره اتانولی نسبت به عصاره استونی بر روی رشد این باکتری در سطح $p>0/05$ بیشتر موثر می‌باشد به طوری که در غلظت خالص قطر هاله عدم رشد بیشتر است. بیشترین و کمترین هاله‌های عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۳۹/۶۶ و۵/۳۳ میلی متر به ترتیب مربوط عصاره استونی خالص و غلظت ۲۵/۹۳۷ میلی گرم بر میلی لیتر است، عصاره استونی نسبت به عصاره اتانولی بر روی رشد این باکتری بیشتر موثر می‌باشد به طوری که در غلظت خالص قطر هاله عدم رشد بیشتر است (جدول ۱ و ۲). باکتری *استافیلو کوکوس اورئوس* به طور معنی داری حساسیت بیشتری به عصاره‌ها در مقایسه با *سالمونلا تیفی موریوم* دارد.

نتایج تعیین MIC و MBC

نتایج نشان داد که MIC و MBC عصاره استونی گلسنگ برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* با یک دیگر برابر

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- اثرات غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گلسنگ بر میانگین و انحراف از معیار قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* برحسب میلی متر

غلظت عصاره		کنترل منفی	خالص	۱:۲	۱:۴	۱:۸	۱:۱۶	۱:۳۲
قطر عدم رشد	*استافیلوکوکوس اورئوس*	-	۲۴/۶۶±۱	۱۵±۱	۱۱/۳۳±۱/۵	۹/۳۳±۱/۵	۶±۱/۵	-
	سالمونلا تیفی موریوم	-	۲۵±۳	۱۹/۳۳±۲/۶	۱۰/۶۶±۲	۸±۰/۵	-	-

جدول ۲- اثرات غلظت‌های مختلف استونی بر میانگین و انحراف از معیار قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم*

غلظت عصاره		کنترل منفی	خالص	۱:۲	۱:۴	۱:۸	۱:۱۶	۱:۳۲
قطر عدم رشد	*استافیلوکوکوس اورئوس*	-	۳۹/۶۶±۱/۵	۲۴/۳۳±۱/۵	۲۱/۶۶±۱/۵	۱۸/۳۳±۱/۷	۱۱/۳۳±۱/۵	۵/۳۳±۱
	سالمونلا تیفی موریوم	-	۲۰±۱	۱۰/۶۶±۱	۸/۶۶±۰/۵	-	-	-

بوده و به ترتیب برابر به ترتیب ۱۰۳/۷۵ و ۲۰۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و عصاره اتانولی ۴۹/۸۱ و ۹۹/۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بودند. این نتایج نشان می‌دهند که عصاره اتانولی نسبت به عصاره استونی آن، در سطح معنی $p>0/05$ فعالیت ضدمیکروبی بیشتری علیه باکتری‌های مذکور دارد. عصاره آبی اثر ضد میکروبی نشان نداد و باکتری‌ها در مجاورت عصاره‌های آبی رشدی معادل نمونه‌های کنترل را داشتند.

جدول۳- میانگین تعداد باکتری‌های رشد یافته *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* در طحال موش‌های آلوده و تیمار شده با عصاره‌ها

نوع عصاره / باکتری	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*سالمونلا تیفی موریوم*
استونی	۱۲×۱۰^۶*	۹×۱۰^۸*
اتانولی	۲۶×۱۰^۶*	۱۱×۱۰^۸*
کنترل(نرمال سالین)	۳۵×۱۰^۸	۶×۱۰^۱۳

نتایج بررسی اثر عصاره‌ها در مدل حیوانی

عصاره استونی موثرترین عصاره در مدل حیوانی علیه هر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* مورد مطالعه بود. اختلاف معنی داری در سطح $p>0/05$ بین گروه‌های آزمون و گروه کنترل وجود داشت به طوری که تیمارهای حاصل

www.SID.ir

Archive of SID

موجب کاهش معنی دار رشد هر دو باکتری می‌گردید. برخلاف شرایط آزمایشگاهی حساسیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به تیمارها کمتر از *سالمونلا تیفی موریوم* می‌باشد (جدول ۳).

بحث و نتیجه گیری

ترکیبات بیو اکتیو گلسنگ‌ها بیشتر از ۳۰٪ از جرم خشک گلسنگ را شامل می‌شود. اگر چه بیش از ۲۰ هزار گونه گلسنگ در جهان شناسایی شده است ولی تاکنون پژوهش‌های بسیار کمی در رابطه با ترکیبات فعال زیستی آن‌ها انجام شده است (۳۱). انواع ترکیبات فعال زیستی گلسنگ‌ها به عنوان مواد ضد ویروس، ضد تومور، ضد فیلامانت، آلرژی زا، ضد تکثیر و ضد پروتوزوا معرفی شده‌اند (۶) به علاوه برخی از گونه‌های گلسنگ‌ها در صنایع غذاسازی دام و انسان، رنگ سازی، تولید عطر، الکل سازی و در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۲) از گلسنگ‌ها صدها سال در برخی از کشورهای اروپایی در درمان بیماری‌های گوارشی، دیابت، ریوی، سل، التهاب پوستی استفاده شده است (۳۳). در طی سالیان اخیر گلسنگ‌ها در طب سنتی توسط تعدادی از پژوهشگران به عنوان یک ماده ضد میکروبی استفاده شده است (۸، ۳۶-۳۴). *استافیلوکوکوس اورئوس*، به دلیل قدرت بیماری زایی بالقوه و مقاومت روز افزون در برابر داروهای ضد میکروبی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در جهان تبدیل شده است. بنابراین جلوگیری از بروز عفونت‌های ناشی از این باکتری و ریشه یابی کانون‌های انتشار آن در بیمارستان‌ها از مسائل ضروری است (۱۲). شیوع شدید پاراتیفوئید خصوصاً *سالمونلا تیفی موریوم* در سال ۱۹۷۸ در آمریکا و استرالیا سبب خسارات زیادی شده است. صنعت مرغداری مهم ترین و بزرگ ترین منبع سالمونلا هستند که می‌توانند آن را از طریق غذا به انسان منتقل کنند در نتیجه کنترل آن بسیار مهم می‌باشد (۲۲). در این بررسی، عصاره‌های اتانولی و آبی گلسنگ Lecanora muralis بر روی دو باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* که جز پاتوژن‌های مقاوم هستند و مقاومت آنتی بیوتیکی آن‌ها روز به روز در حال افزایش است، مورد بررسی قرار گرفته است. Earlier و همکاران در مطالعه‌ای مشاهده نمودند عصاره آبی گلسنگ‌ها اثر ضد میکروبی ندارد، نتایج به دست آمده در این مطالعه نیز بی اثر بودن عصاره آبی را بر باکتری‌ها نشان داد که با نتایج این محققان هم خوانی دارد (۲۴، ۲۳). یکی از دلایلی که عصاره آبی گلسنگ بی اثر می‌باشد می‌تواند غیر قطبی بودن مواد موثره گلسنگ و حل شدن این مواد در حلال‌های غیر قطبی باشد (۲۵). Gulluce و همکاران (۲۰۰۶) اثر ضد میکروبی عصاره متانولی را ثابت نمودند (۸). Rowe و همکاران (۲۶) گزارش نمودند که گلسنگ‌های بومی ترکیه از جمله Evernia prunastri, Pseudovernia furfuracea و Alectoria capillaries بر روی باکتری‌های گرم مثبت موثر می‌باشند، البته برخی از عصاره‌های گلسنگ‌ها از جمله Roccella belangeriana بازدارنده رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌باشند (۲۷). مطالعات Burkholder و همکاران (۲۸) بر روی ۱۰۰ گونه از گلسنگ‌های آمریکا نشان داد که ۵۲٪ از گلسنگ‌ها دارای اثر بازدارندگی بر روی باکتری‌های گرم مثبت هستند. Vartia (۲۹) گزارش نمود که ۱۴۹-۷۵ از گونه‌های گلسنگ جنس Finnish بازدارنده رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی هستند. Silva و همکاران (۳۰) مشاهده نمودند که اغلب گلسنگ‌های برزیل بر باکتری‌های گرم مثبت اثر بازدارندگی دارند. Rankovic و همکاران بیان نمودند که عصاره‌های آبی، متانولی و استونی Lasallia pustulata, Parmelia sulcata, Umbilicaria crustulosa و Umbilicaria cylindrical دارای ترشحات ضد میکروبی می‌باشند. فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره‌های گلسنگ با روش انتشار چاهکی و تعیین MIC به خوبی ثابت شده است. یافته‌های محققان نشان داده که عصاره‌های متانولی و استونی Lasallia pustulata, Parmelia sulcata and Umbilicaria crustulosa فعالیت ضد باکتری دارد و MIC آن ۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی Bacillus mycoides بوده و عصاره آبی بی تاثیر بوده است که با نتایج حاضر مطابقت دارد (۳۴). مطالعات نشان داده است که تفاوت اثرات ضد باکتریایی بین عصاره‌های گلسنگ ارتباط مستقیمی با نوع حلال و غلظت عصاره و نوع میکروارگانیسم دارد که نتایج مطالعه حاضر با این گفته مطابقت دارد (۳۸، ۳۷). Yelh mar و همکاران (۲۰۰۴) مشخص نمودند که میزان MIC عصاره‌های گلسنگ‌هایی که حلال‌های آن‌ها دارای محیط قطبی مانند استون، دی اتیل اتر هستند نسبت به حلال‌هایی با قطبیت کمتر مانند اتانول و اتر نفت کمتر است که با نتایج حاصل از این مطالعه هم خوانی دارد. عصاره استونی موجب جدا سازی ۳ ماده ضد میکروبی اسید اورسنیک، فوماراپروتوستراتیک و آنترا فورین می‌گردد (۳۹). دلیل تفاوت

www.SID.ir

Archive of SID

میزان حساسیت باکتری‌ها در برابر عصاره‌ها می‌تواند به علت تفاوت ساختار دیوار سلولی باشد (۴۰). دیواره سلولی باکتری گرم مثبت شامل پپتیدگلیکان‌ها و اسیدهای تیکوئیک است. در حالی که دیواره باکتری گرم منفی شامل لیپو پلی ساکاریدها و لیپو پروتئین‌ها است (۱۰، ۹). با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها، تلاش برای دست یابی به آگاهی بیشتر از مواد موثر ترکیبات موجود در گیاهان و کاربردشان در درمان بیماری‌های مختلف ضروری به نظر می‌رسد.

در مجموع نتایج بررسی‌های شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی نشان دادند که عصاره‌های اتانولی و استونی استخراج شده از Lecanora muralis دارای فعالیت ضد میکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* می‌باشند؛ لذا می‌توان در تولید داروهای گیاهی جدید علیه عفونت‌های باکتری‌های فوق از آن‌ها استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان سپاسگزاری می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Spirbille T. All you ever wanted to know (almost) about the lichens of the lichens of the West Kootenays[internet]. Valhalla Wilderness Society Lichen Field Trip New Denver, British Columbia];7 Aug 2004 Available from:http://wwwuser.gwdg.de/~botanik/vegetation/spribille/.
2.Taylor TN, Hass H, Remy W, Kerp H. The oldest fossil lichen. Nature Publishing Group. 1995; 378: 244-245.
3.Galun M, Shomer I. Secundary metabolites products. In: Handbook of Lichenology. Vol. I. (Ed.): M. Galun. CRC Press, Boca Raton, Florida; 1988.P: 95 -107.
4. Some Y, Isoda JM, Misaki A. Isolation and chemical characterizatIon of polysaccharides from Iwatake, Gyrophora esculenta. Biosci. Biochem. 1996; 60(2): 213-215.
5. Gülçin I, Oktay M, Küfrevioğlu Öİ, Aslan A. Determination of antioxidant activity of lichen< i> Cetraria islandica(L) Ach. Journal of Ethnopharmacology. 2002; 79(3): 325-329.
6. Halama P, Haluwin C. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. Bio Control. 2004; 49(1): 95-107.
7. Davies JE, Waters B, Saxena G. Method for inhibiting eukaryotic protein kinases. US Patent. 2002; 20:68-85.
8. Gulluce M, Aslan A, Sokmen M, Sahin F, Adiguzel A, Agar G, et al. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens Parmelia saxatilis, Platismatia glauca, Ramalina pollinaria, Ramalina polymorpha and Umbilicaria nylanderiana. Phytomedicine. 2006;13(7): 515–521.
9. Heijenoort J. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. Glycobiology. 2001; 11(3): 25-36.
10. Hugenholtz P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. Genome Biology. 2002;3(2): 0003.1–0003.8
11. Behera B.C, Verma N, Sonone A, Makhija U. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. Bioresource technology. 2008; 99 (4): 776-784.
12. Orrt FA, Land M. Meteicillin resistant Staphylococus aureus prevalence: Current susceptibility patterns in Trinidad. BMC Infect Dis. 2006; 6(1):83.
13. Clelland M, Sanderson KE, Spieth J, Cliftonet SW. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature. 2001; 41 (6858): 852-856.
14. Borriello PS, Murray PR, Funke GD. Microbiology and microbial infections in topply & wilson, London U.K; 2006.P: 1399.
15. Kosanić M, Branislav R. Screening of antimicrobial activity of Some lichen Species In Vitro. Kragujevac Journal of Science. 2010; 32 (3): 65-72.
16. Dobson F. Lichens an illustrated guide. The Richmond publishing Co. Ltd, England; 2000.P. 480
17. Coppins B J, Jamesj PW, Hawksworth DL. New species and combinations in the lichen flora of Great Britain and Ireland. The lichenologist. 1992; 24 (04): 351-369.

www.SID.ir

18. Purvis OW, Coppins B J, Hawksworth DL, James PW, Moore DM. The Lichen flora of great Britian and Ireland. London: Natural History Museum Publications in association with the British Lichen Society; 1992; 1–710.
19. Friedel AG, Müller FR. Bryophytes and lichens as indicators for changes of air pollution in the Serrahn Natural Forest Reserve (Mueritz National Park). Herzogia. 2004; 17(1): 279-286.
20. Wirth V. Die Flechten Baden-Württembergs-Teil 1 und 2. Vergal Ulmer. Stuttgart;1995.P: 1-1006.
21. Tay T. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen Ramalina farinacea and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences. 2004; 59(5-6):384-388.
22. Vivek Kumar G, Mahendra P, Darokar PS. Khanujaantimy cobacterial activity of lichens pharmaceutical biology. 2007; 45(3): 200–204.
23. Iftikhar T, Zia A, Niaz M, Ashraf I, Abbas SQ, Lee KJ, et al. Mutation induced enhanced biosynthesis of lipases by Rhizopus oligosporus var. microsporus. Pak. J. Bot. 2010; 42(2):1235-1249.
24. Jabeen R, Ashraf M, Ahmad I, Iftikhar T. Purification and bioassays of bioactive fraction from Curcuma longa against Xanthomonas oryzae pv. Oryza. causing blb disease in rice. Pak. J. Bot. 2011; 43(2): 1335-1342.
25. Wanger A. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant Candida isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.1995: 39(11): 2520-2522.
26. Anonymous. NCCLS (National Commitee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for antimicrobial disk suscebtibility test (Oth ed), Approved Standard. 1993. M2-A6, Wayne PA, USA.
27. Naeini A, Khosravi A, Tadjbakhsh H, Ghazanfari T, Yaraee R, Shokri H. Evaluation of the immunostimulatory activity of Ziziphora tenuior extracts. Comp Clin Pathol. 2010 ; 19(5): 459-463.
28. Briskin D P. Production of phytomedicinal chemicals by plants. Handbook of Plant and Crop Physiology.2002; 2(4): 485-500.
29. Lawson LD. Phytomedicines of Europe: Their chemistry and biological activity. Am, Chemi. Soci. Washing. DC. Pub. 1998;23-36.
30. Yilmaz M, Ozdemir Turk A, Tay T, Kivac M. The antimicrobial activity of extracts of the lichen Cladonia foliacea and its (G)-usnic acid, atranorin and fumaprocetraric acid constituents Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung. 2004; 59(2):149-254.
31. Devi GK, Anantharaman P, Kathiresan K, Balasubramanian T. Antimicrobial activities of the lichen Roccella belangeriana (Awasthi) from mangroves of Gulf of Mannar. Indian Journal of Geo-Marine Sciences. 2011; 40(3): 449-453.
32. Tay T, Ozdemir TA, Yilmaz M, Kivac M. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen Ramalina farinacea and its (+)-usnic acid and procetraric acid constituents. Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung. 2004; 59(C): 384-388.
33. Kinoshita K, Matsubara H, Koyama K, Takahashi K, Yoshimura I, Yamamuto Y. Topics in the chemistry of lichen compounds. J. Hattori Bot. Lab. 1994; 76(1): 227-233.
34. Rowe JG, Saenz MT. Contribution a a'l e' tudedel' activit antibactérienne de queques lichens du sudde l'Espagne. Pharmaceutique francaise. 1989; 47(1): 89-94.
35. Karthikaidevi G, Thirumaran G, Manivannan K, Anantharaman P, Kathiresan K, Balasubaramanian T. Screening of the antibacterial properties of Lichen Roccella belangeriana (Awasthi) from pichavaram mangrove (Rhizophora Sp.). Advances in Biological Research. 2009; 3 (3-4): 127-131.
36. Burkholder PR, Evans AW, McVeigh I, Thornton HK. Antibiotic activity of lichens proceedings on national academic science, USA. 1944; 30(9): 250-255.
37. Vartia KO. On antibiotic effects of lichens and lichen substances. Diss. Helsinki. Ann. Suppl 1950 b; 30:76-78.
38. Silva DA, Oliveira J. Antimicrobial activity of Brazilian lichens. Biological Society Broteriana. 1986; 59(C): 87-96.
39. Tohma HS, Gulcin I. Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (Glycyrrhiza glabra L.). Int J Food Prop. 2010; 13(4): 657-671.
40. Kosani M, Rankovi, Sukdolak S. Antimicrobial activity of the lichen Lecanora frustulosa and Parmeliopsis hyperopta and their divaricatic acid and zeorin constituents. African Journal of Microbiology Research. 2010; 4 (9): 885-890.
41. Baytop T. Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present). Istanbul University, Istanbul;1999: 45-49.
42. Rankovic B, Misjic M, Sukdolak S. Evaluation of antimicrobial activity of the Lichens Lasallia pustulata, Parmelia sulcata, Umbilicaria crustulosa and Umbilicaria cylindrical. J. Microbiol. 2007; 76(2): 723-727.
43. Ranković B, Mišić M, Sukdolak S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens Physcia aipolia, Umbilicaria polyphylla, Parmelia caperata and Hypogymnia physodes. World J Microbiol. Biotechnol. 2008; 24(7): 1239-1242.
44. Choudhary MI, Jalil SA, Rahman A. Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen. Usnea longissima. Phytochemistry. 2005; 66(19): 2346-2350.
45. Ranković B, Kosanić M. Antimicrobial activities of different extracts of Lecanora atra Lecanora muralis,

www.SID.ir

Archive of SID

Parmelia saxatilis, Parmelia sulcata and Parmeliopsis ambigua. Pak. J. Bot. 2012; 44(1): 429-433.
46. Ranković B, Kosanić M, Stanojković TP. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens Cladonia furcata, Lecanora atra and Lecanora muralis. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2011; 11(97); 1-8.
47. Yilmaz M, Tay T, Kivanc M. The antimicrobial activity of extracts of the Lichen Hypogimnia tubulosa and Its 3- Hydroxyphysodic Acid Constituent. J.Z. Naturforsch. 2005; 60(1-2): 35-38.
48. Yang Y, Anderson EJ. Antimicrobial activity of a porcine myeloperozidase against plant phatogenic bacteria and fungi. Journal of Applied Microbiology. 1999; 86(2): 211-220.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Article

Evaluation of Antibacterial Effects of *Lecanora muralis SP.* Extract on *Staphylococcus Aureus* and *Salmonella Typhimurium* in in-vitro and in animal model

Nasisri Semnani Sh[1*], Rahnema M[1], Ghasempour H[1], Alizadeh H[2]

1- Biological Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
2- Young Researchers and Elite Club, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

Received: 07 Dec 2013 Accepted: 05 Mar 2014

Abstract

Background & Objective: *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* are among important causes of infection and antibiotic resistance. It is essential to find antimicrobial compounds against them. The objective of this study is to evaluate the antibacterial activity of Lecanora muralis SP. extracts on *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in in-vitro and in animal model.

Materials & Methods: In this study, aquatic, acetonic, and ethanoic extracts of *Lecanora muralis SP*. were prepared. Then their antimicrobial effects were determined by agar well diffusion method. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bacterial Concentration (MBC) were calculated by macro dilution method. In animal model, 24 hours after inoculation of bacteria in mice, care was provided by injecting 0.5 ml of *Lecanora muralis SP*. extracts (as MBC concentration).. Then, the colonies of mentioned bacteria in spleen were counted on agar media after nine days.

Results: The results indicated that MIC of acetonic extract of Lecanora muralis SP. for *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* were 103.75 and 207.5 mg/ml and for ethanoic extract were 49.81 and 99.625 mg/ml, respectively. The aquatic extracts of the tested lichens didn't show any antibacterial activity on mentioned organisms. The mean of the bacterial count in experiment group showed significant reduction compared to the control group in animal model.

Conclusion: The ethanoic extract of *Lecanora muralis SP.* had the most effective antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in comparison with acetonic extract. In addition *Salmonella typhimurium* was more sensitive to extracts.

Keywords: ***Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Lecanora muralis SP* extracts, Antimicrobial effect.**

⁎**Corresponding author: Shahrzad Nasiri Semnani,** Biological Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
Email: sh.nasiri92@yahoo.com
Tel: +989127402564

www.SID.ir