

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۱۳۶-۱۲۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۲۱

مقایسه آثار ضدباکتریایی عصاره گل‌سنگ‌های *Glypholecia scabra* و *Rhizoplaca melanophthalma* بر برخی باکتری‌های استاندارد

مژگان شفیعی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات خراسان رضوی، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران، mojgan_shafiee22@yahoo.com
جعفر همت*: استادیار ژنتیک ملکولی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، j.hemmat@gmail.com
محمد رضا سام: استادیار ژنتیک ملکولی، مؤسسه بیوتکنولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، s_mohammadreza@yahoo.com

چکیده

مقدمه: در حال حاضر مقاومت ضد میکروبی در میان باکتری‌ها و دیگر موجودات بیماری‌زا تهدید جدی برای مدیریت بیماری‌های عفونی است. جستجوی داروهای فعال زیستی جدید با منشأ طبیعی در گل‌سنگ‌ها موضوع بسیاری از گروه‌های تحقیقاتی است.

مواد و روش‌ها: عصاره استونی گلیفولسیا اسکابرا و ریزوپلاکا ملانوفتالما با استفاده از دستگاه سوکسوله تهیه شد. آثار ضدباکتریایی عصاره با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار و آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد کرینسیلین و آزیترومایسین به روش کربی بائر بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی شامل باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، میکروکوکوس لوتئوس، سودوموناس آئروجینوزا، کلبسیلا پنومونیه، پروتئوس ولگاریس، سراسیا مارسنس و اشیریشیا کلی بررسی شد. حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها نیز تعیین شد.

نتایج: عصاره استونی گلیفولسیا اسکابرا بر روی باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، میکروکوکوس لوتئوس، استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین بر باکتری گرم منفی پروتئوس ولگاریس به ترتیب با مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی ۰/۱۶، ۰/۲۶، ۱/۰۴، ۱/۰۶۵ و ۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آثار مهارتی قابل توجهی نشان داد. عصاره ریزوپلاکا ملانوفتالما بر باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتئوس به ترتیب با مقادیر ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۱/۰۴ و ۰/۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حداقل غلظت مهارکنندگی نشان داد اما بر باکتری‌های گرم منفی تأثیر نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری: تاکنون آثار ضد میکروبی گلیفولکیا اسکابرا گزارش نشده است. نتایج این پژوهش تأثیر ضدباکتریایی هر دو گونه گل‌سنگ بومی ایران را اثبات می‌کند؛ بنابراین عصاره استونی این گل‌سنگ‌ها می‌تواند جایگزین خوبی برای آنتی‌بیوتیک‌های درمانی باشد که نیازمند مطالعات بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: گل‌سنگ، آنتی‌بیوتیک، آثار ضدباکتریایی.

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

گل‌سنگ‌ها سیستم‌های هم‌زیست اجباری متشکل از قارچ‌های رشته‌ای و یک شریک فتوسنتزکننده (جلبک یا سیانوباکتر) می‌باشند که قرن‌ها به‌عنوان عناصر تشکیل‌دهنده در تهیه داروها به کار رفته‌اند و در بسیاری از جوامع به‌عنوان داروهای سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده شده‌اند (۱ و ۲). خواص دارویی برخی از گل‌سنگ‌ها در سیستم‌های طب سنتی ذکر شده است و از آن‌ها برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های شایع از جمله خون، بیماری‌های قلبی، برونشیت، گال، جذام، التهاب آسم، اختلالات معده و غیره استفاده شده است (۳). پیشرفت‌های اخیر در زمینه پزشکی منجر به کشف فعالیت بیولوژیک تعداد محدودی از ترکیبات گل‌سنگی شده است. در برخی از مطالعات نشان داده شده است که برخی از مواد شیمیایی گل‌سنگی می‌توانند به‌عنوان منابع دارویی امیدوارکننده‌ای در آینده باشند. خواص آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، ضدتکثیری، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی برای ترکیبات گل‌سنگی نشان داده است (۷-۴).

در حال حاضر مقاومت ضد میکروبی در میان باکتری‌ها و دیگر موجودات بیماری‌زا تهدید جدی برای مدیریت بیماری‌های عفونی است. در جستجوی داروهای فعال زیستی جدید با منشأ طبیعی، گل‌سنگ‌ها موضوع بسیاری از گروه‌های تحقیقاتی هستند. در بسیاری از گونه‌های گل‌سنگی، فعالیت‌های ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده شده است. اولین آزمایشات درباره خواص آنتی‌بیوتیکی گل‌سنگ‌ها را بورخلدر^۱ و همکارانش در سال ۱۹۴۴ انجام داده بودند که آن‌ها عصاره آبی ۴۲ گونه گل‌سنگ را علیه *اشرشیا کلی*^۲، *باسیلوس سوبتیلیس*^۳ و *استافیلوکوکوس اورئوس*^۴

آزمایش کردند. نتایج حاصل از این مطالعات اولیه نشان داد که ۲۷ گل‌سنگ علیه *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* فعال بودند اما هیچ‌یک از گونه‌ها فعالیت علیه *اشرشیا کلی* نشان ندادند (۵). تورک^۵ و همکارانش در سال ۲۰۰۳ با مطالعات خود، فعالیت ضدباکتریایی عصاره استونی، دی اتیل اتر و اتانولی گل‌سنگ *ستراریا آکولئاتا*^۶ را در مقابل ۱۲ گونه باکتری بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که عصاره این گل‌سنگ دارای خواص قابل توجهی در برابر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*^۷، *پروتئوس و لگاریس*^۸، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*^۹، *باسیلوس سرئوس*^{۱۰}، *باسیلوس سوبتیلیس*، *استرپتوکوکوس فیکالیس*^{۱۱} و *اشرشیا کلی* است و عصاره‌هایی که دارای فعالیت ضد میکروبی هستند، حاوی اسید پروتولیکسترنیک^{۱۲} هستند (۸). دیوی^{۱۳} و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف گل‌سنگ *روشلا بلانگرین*^{۱۴} در مقابل باکتری‌های مختلف بیشترین تأثیر بازدارنده را مربوط به عصاره متانولی و در مقابل *ویبریو کلرا*^{۱۵} گزارش کردند (۹). لوکارین^{۱۶} و همکارانش در سال ۲۰۱۴ فعالیت ضدباکتری گل‌سنگ *اوسنا استینری*^{۱۷} را در مقابل *مایکوباکتریوم کاناسی*^{۱۸} گزارش کردند (۱۰). ولدییگی و همکارش در سال ۲۰۱۳ فعالیت ضدباکتریایی عصاره متانولی و استونی گل‌سنگ‌های *فولجنسیا فولجنس*^{۱۹} و *پلاسیدیوم سیمافوروننز*^{۲۰} را در مقابل چند گونه باکتری بررسی کردند و نشان دادند که عصاره متانولی *فولجنسیا فولجنس* دارای بیشترین اثر باکتری‌سیدال در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و عصاره *پلاسیدیوم سیمافوروننز* در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*^{۲۱} هستند (۱۱).

مواد و روش‌ها

استون (مرک ۲۲ آلمان)، محلول نیم مک فارلند، محلول نمکی ۰/۹ درصد، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل موارد زیر است: آزیترومایسین، جتنامایسین و کرنیسیلین و دیسک خام (شرکت پادتن طب)، دی متیل سولفوکساید (مرک آلمان با جرم مولکولی ۷۸/۱۳ گرم بر مول)، پلیت، سوپ، پنس، ویال، محیط‌های مولر هینتون و نوترینت آگار.

جمع‌آوری گل‌سنگ‌ها: گل‌سنگ‌ها در سال ۱۳۹۲ از نواحی نقره واقع در آذربایجان غربی با طول و عرض جغرافیایی (۳۶،۹۱۷۶، ۴۵،۳۷۲۶) جمع‌آوری شدند. در این مطالعه از دو گونه گل‌سنگ *گلیفولکیا اسکابرا*^{۳۳} و *ریزوپلاکا ملانوفتالما*^{۳۴} برای بررسی فعالیت ضد میکروبی استفاده شد.

میکروارگانسیم‌های مطالعه شده: در این پژوهش از نه باکتری شاخص از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC1431، *میکروکوکوس لوتوس*^{۲۵} PTCC1110، *باسیلوس سرئوس* PTCC1247، *باسیلوس سوبتلیس* PTCC1023، *اشرشیا کلی* PTCC1330، *کلبسیلا پنومونیه*^{۲۶} PTCC1290، *سراشیا مارسنس*^{۲۷} PTCC1111، *پروتئوس و لگاریس* PTCC1312 و *سودوموناس آتروجنوزا* PTCC1074، جهت ارزیابی آثار ضدباکتریایی گل‌سنگ‌های مطالعه شده استفاده شد.

عصاره‌گیری از گل‌سنگ‌ها: ابتدا نمونه‌های موردنظر از مواد زائد از جمله خزه، خاک و دیگر مواد جداسازی شدند. سپس گل‌سنگ‌ها به منظور عصاره‌گیری در مجاورت هوا به مدت دو هفته خشک شدند. نمونه‌های

خشک‌شده، آسیاب شدند تا به صورت پودر تقریباً یکنواختی در آیند. برای عصاره‌گیری گل‌سنگ‌ها از دستگاه سوکسله به مدت ۱۰ ساعت استفاده شد. به منظور تغلیظ کردن عصاره استخراج شده و خارج کردن حلال از عصاره از دستگاه روتاری اوپراتور (تحت فشار پایین) استفاده شد. سپس عصاره تغلیظ‌شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای منفی ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

ارزیابی اثر ضدباکتریایی: جهت ارزیابی اثر ضدباکتریایی از روش دیسک‌گذاری (کربی بائر) استفاده شد (۱۲). براساس این روش ابتدا باکتری‌های بررسی شده در مرحله رشدنمایی به مقدار نیم مک فارلند کدورت رقیق‌سازی شد. سپس باکتری‌ها بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به شکل چمنی کشت داده شدند. به وسیله دی متیل سولفوکساید رقت‌های ۵۰، ۲۵ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره استونی گل‌سنگ‌ها تهیه شد. دیسک‌های پیر بلانک ۶ میلی‌متری به‌عنوان حامل رقت‌های مختلف استفاده شد. روی هر کدام از دیسک‌های خام حدود ۲۵ میکرولیتر از سه رقت مختلف عصاره‌های گل‌سنگی ریخته شد و بر روی محیط کشت قرار گرفت. بر روی یکی از دیسک‌های خام حلال مربوطه دی متیل سولفوکساید ریخته و به‌عنوان کنترل منفی روی محیط کشت قرار داده شد. آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد کرنیسیلین^{۲۸} (برای باکتری‌های گرم مثبت)، آزیترومایسین^{۲۹} و جتنامایسین^{۳۰} (برای باکتری‌های گرم منفی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در

در آن مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت کشنده در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری: هر آزمون سه بار تکرار شد و داده‌های به‌دست آمده به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار^{۳۳} بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرف^{۳۴}، (ANOVA نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱) و آزمون توکی^{۳۵} استفاده شد. در تمام بررسی‌ها میزان معنی‌داری آزمون‌ها $P < 0/05$ در نظر گرفته شده است.

نتایج

در این پژوهش عصاره استونی هر دو گل‌سنگ اثر ضدباکتریایی نشان دادند. طبق جدول ۱ عصاره استونی گلیفولسیاس کابرا به‌طور معنی‌داری اثر بازدارندگی و مهارتی بر باکتری‌های باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، میکروکوکوس لوتئوس و پروتئوس ولگاریس (شکل ۱ - الف) دارد. درحالی‌که بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلای، سراسیا مارسنس، سودوموناس آئروجینوزا و کلبسیلا پنومونیه بی‌تاثیر است. همچنین طبق جدول ۲ عصاره گل‌سنگ ریزوپلاک‌ملا نوتالما به‌طور معنی‌داری اثر بازدارندگی و مهارتی بر باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس (شکل ۱ - ب)، باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتئوس داشت. درحالی‌که بر باکتری‌های گرم منفی اشرشیا کلای، سراسیا مارسنس، سودوموناس آئروجینوزا، کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس ولگاریس اثر نداشت.

داخل انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت مدت‌زمان موردنظر، قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها بررسی شد (کلیه آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شدند).

تعیین MIC و MBC: درباره گل‌سنگ‌هایی که دارای اثر ضدباکتریایی بودند حداقل غلظت مهارکننده^{۳۱} (MIC) و حداقل غلظت کشنده^{۳۲} (MBC) تعیین شد. تعیین MIC با استفاده از پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل و روش برات میکرودیلوژن انجام شد (۱۳). به این صورت که از ۱۵ چاهک پلیت برای هر آزمون استفاده شد. یکی از چاهک‌ها که فقط حاوی محیط کشت و باکتری بود به‌عنوان کنترل مثبت و چاهک دیگر که فقط حاوی محیط کشت بود به‌عنوان کنترل منفی انتخاب شد. در ۱۳ چاهک بعدی غلظت‌های ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸، ۰/۳۹، ۰/۱۹۵، ۰/۰۹۷، ۰/۰۴۸، ۰/۰۲۴، ۰/۰۱۲، ۰/۰۰۶ و ۰/۰۰۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های گل‌سنگی تهیه شد. سپس از سوسپانسیون باکتریایی تهیه‌شده مقدار ۱/۵ میکرولیتر برداشته شد و داخل تمام چاهک‌ها به‌جز کنترل منفی ریخته شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس رشد یا عدم رشد باکتری‌ها براساس IC90 بررسی شد. برای بررسی دقیق‌تر و تعیین حداقل غلظت کشنده، از محلول یکنواخت چاهک‌ها برداشته و در محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. کمترین غلظتی که هیچ رشدی از باکتری

جدول ۱- ارزیابی آثار ضدباکتریایی عصاره گل‌سنگ گلیفولسیا اس کابرا .

نام باکتری	کربنی سیلین	آزیترومایسین	۵۰ mg/ml	۲۵mg/ml	۵mg/ml	کنترل منفی
باکتری های گرم مثبت	میکروکوکوس لوتئوس	۴۸±۱	-	۱۴±۱	۰/۵۷±۱۱/۶۶	۹/۱۶±۰/۷۶
	باسیلوس سوبتیلیس	۳۲/۶۶±۲/۵۱	-	۱/۰۴±۹/۶۶	۰/۷۶±۸/۸۳	۷/۱۶±۰/۷۶
	استافیلوکوکوس اورئوس	۳۲/۶۶±۲/۵۱	-	۰/۷۶±۸/۸۳	۰/۷۶±۷/۸۳	۷±۰/۵
	باسیلوس سرئوس	۱۳/۶۶±۱/۵۲	-	۹/۶۶±۰/۵۷	۸/۵±۰/۵	۷/۸۳±۰/۷۶
باکتری های گرم منفی	پروتئوس ولگاریس	-	۲۷±۱	-	۱/۱۵±۱۹/۶۶	۱۳±۱
	کلسیلا پنومونیه	-	۲۸±۱	-	-	-
	سودوموناس آروجینوزا	-	۲۰/۳۳±۰/۵۷	-	-	-
	سراسیا مارسنس	-	۲۷/۶۶±۲/۰۸	-	-	-
	اشرشیا کلای	-	۲۵/۶۶±۱/۵	-	-	-

جدول ۲- ارزیابی آثار ضدباکتریایی عصاره گل‌سنگ ریزوپلاکا ملانوفتالما

نام باکتری	کربنی سیلین	آزیترومایسین	۵۰ mg/ml	۲۵mg/ml	۵mg/ml	کنترل منفی
باکتری های گرم مثبت	میکروکوکوس لوتئوس	۴۸±۱	-	۲۶/۵±۰/۵	۲۴/۳۳±۰/۵۷	۲۲±۱
	باسیلوس سوبتیلیس	۳۲/۶۶±۲/۵۱	-	۱۷/۵±۰/۸۶	۱۴/۵±۰/۵	۱۱/۶±۰/۵۷
	استافیلوکوکوس اورئوس	۲۵/۳۳±۰/۵۷	-	۱۲±۱	۹/۵±۰/۵	۷/۶۶±۰/۵۷
	باسیلوس سرئوس	۱۳/۶۶±۱/۵۲	-	۲۱±۱	۱۷/۶۶±۰/۷۶	۱۵/۸۳±۰/۲۸
باکتری های گرم منفی	پروتئوس ولگاریس	-	۲۷±۱	-	-	-
	کلسیلا پنومونیه	-	۲۸±۱	-	-	-
	سودوموناس آروجینوزا	-	۲۰/۳۳±۰/۵۷	-	-	-
	سراسیا مارسنس	-	۲۷/۶۶±۲/۰۸	-	-	-
	اشرشیا کلای	-	۲۵/۶۶±۱/۵	-	-	-



ب



الف

شکل ۱- اثر ضدباکتریایی *Glypholecia scabra* بر پروتئوس ولگاریس (الف) و اثر ضدباکتریایی *Rhizoplaca melanophthalma* بر باسیلوس سرئوس (ب)

به نور و انتقال الکترون در قسمت احیا فتوسیستم II را مهار می‌کند (۱۶). می‌توان نتایج این پژوهش را با نتایج کاندان^{۳۷} و همکارانش مقایسه کرد که در سال ۲۰۰۶ اثر ضدباکتریایی عصاره استونی گل‌سنگ زانتوپارمیلیا پوکورنی^{۳۸} حاوی ژیروفوریک اسید را برای باکتری‌های باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، لیستریا مونوسیتوژنز، پروتئوس ولگاریس، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس فیکالیس و یرسینیا انتروکولیتیکا^{۳۹} گزارش کرده بودند (۱۷). در مطالعات ما نیز عصاره این گل‌سنگ بر باکتری‌های باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و پروتئوس ولگاریس اثر مهاري نشان داده بود، می‌توان در مطالعات تکمیلی، ترکیبات این گل‌سنگ از جمله مواد جدید احتمالی گل‌سنگی که فعالیت ضد میکروبی قوی نشان می‌دهند را شناسایی کرد.

طبق نتایج حاصل شده غلظت‌های ۵۰، ۲۵ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گل‌سنگ ریزوپلاکا ملانوفتالما اثر بازدارندگی بر باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتئوس داشت در حالی که بر باکتری‌های گرم منفی اشرشیا کلی، سراسشیا مارسنس، سودوموناس آئروجینوزا، کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس ولگاریس اثر نداشت. میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از تأثیر تراکم ۵ mg/ml عصاره استونی ریزوپلاکا ملانوفتالما بر باکتری باسیلوس سرئوس ۱۵/۸۳ میلی‌متر بود که بسیار به قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک استاندارد کاربانیسین، ۱۳/۶ میلی‌متر، نزدیک بود. کاراگز^{۴۰} و همکارانش در سال ۲۰۰۹ اثر ضدباکتریایی عصاره آبی و اتانولی این گل‌سنگ را بر باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه، باسیلوس سوبتلیس،

ارزیابی مقدار MIC و MBC: طبق جدول ۳ عصاره استونی گلیفولسیا اسکابرا با کمترین غلظت ۰/۱۱ و ۰/۲۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب بیشترین اثر بازدارندگی و کشندگی را بر باکتری پروتئوس ولگاریس دارد. همچنین عصاره استونی ریزوپلاکا ملانوفتالما با کمترین غلظت ۰/۰۴ و ۰/۰۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب بیشترین اثر بازدارندگی و باکتریسدال (کشندگی) را بر باکتری باسیلوس سرئوس دارد.

جدول ۳- حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، مقادیر به صورت mg/ml برای عصاره گل‌سنگ‌ها، نتایج میانگین سه بار آزمایش است.

گل‌سنگ / باکتری	گلیفولسیا اسکابرا		ریزوپلاکا ملانوفتالما	
	MBC	MIC	MBC	MIC
باسیلوس سرئوس	۰/۳۲	۰/۱۶	۰/۰۸	۰/۰۴
باسیلوس سوبتلیس	۰/۵۲	۰/۲۶	۰/۱۶	۰/۰۸
استافیلوکوکوس اورئوس	۲/۰۸	۱/۰۴	۲/۰۸	۱/۰۴
میکروکوکوس لوتئوس	۱/۳	۰/۶۵	۰/۳۲	۰/۱۶
پروتئوس ولگاریس	۰/۲۲	۰/۱۱	-	-

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش آثار ضدباکتریایی دو گونه گل‌سنگ بومی ایران بر انواع باکتری‌های شاخص گرم مثبت و منفی بررسی شد. تاکنون آثار ضد میکروبی گل‌سنگ گلیفولسیا اسکابرا گزارش نشده است. از آنجایی که از جمله ترکیبات موجود در این گل‌سنگ ژیروفوریک^{۳۶} اسید است (۱۴) تنها در تعداد کمی از مطالعات فعالیت‌های بیولوژیک این اسید بررسی شده است. این اسید آثار ضد تکثیری و سیتوتوکسیک در رده سلولی کراتینوسیت HaCat نشان داده است (۱۵)، همچنین نشان داده شده است که به طور قابل توجهی سنتز ATP وابسته

نتایج این پژوهش تأثیر ضد باکتریایی هر دو گونه گل‌سنگ را به‌ویژه بر انواع گرم مثبت مطالعه شده اثبات می‌کند. بنابراین عصاره استونی این گل‌سنگ‌ها ممکن است پتانسیل جایگزینی برای برخی آنتی بیوتیک‌های مصرف شده در درمان بیماری‌های حاصل از سویه‌های باکتریایی را داشته باشد که نیازمند مطالعات بیشتر است. این منابع طبیعی اهمیت زیادی در کشف داروهای جدید دارند و باید مطالعات بیشتری برای شناسایی ترکیبات گل‌سنگ‌های مناطق مختلف صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌ویژه کارشناسان پژوهشکده زیست‌فناوری، سرکارخانم‌ها کاظمی نژاد، سلامی، اصفهانی، آقایان دکتر سهرابی، مهندس پرچ و شیخی نژاد برای همکاری در این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

References

- (1) Selbmann L., Zucconi L., Ruisi S., Grube M., Cardinale M., Onofri S. Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. *Polar biology* 2010; 33(1): 71-83.
- (2) Hodkinson B. P., Lutzoni, F. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis* 2009; 49 (3): 163-80.
- (3) Shukla, V., Joshi G. P., Rawat M. S. M. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews* 2010; 9 (2): 303-14.

سودوموناس آئروژینز، اشرشیا کلامی، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بررسی کردند که نشان دادند عصاره آبی این گل‌سنگ در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بر باکتری‌های باسیلوس سوبتلیس و استافیلوکوکوس اورئوس اثر دارد و قطر هاله عدم رشد برای هر دو باکتری ۹ میلی متر بود (۱۸). در نتایج این پژوهش نشان داده شده است که عصاره استونی این گل‌سنگ قطر هاله عدم رشد برای هر دو باکتری به ترتیب ۱۱/۶ و ۷/۶۶ میلی متر بود. علاوه بر این حتی در غلظت‌های ۰/۰۴، ۰/۰۸ و ۱/۰۴ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب بر باکتری‌های باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس و استافیلوکوکوس اورئوس اثر مهاری دارد. این مقایسه نشان می‌دهد عصاره بومی ایران با غلظت پایین‌تر در مقایسه با عصاره‌ای که کاراگز و همکارانش گزارش کرده‌اند اثر قوی‌تری بر باسیلوس سوبتلیس نشان می‌دهد. این تفاوت‌ها را می‌توان به تأثیر عوامل جغرافیایی و تنوع زیستی گونه‌ها مرتبط دانست (۱۱). نخعی و همکارش در سال ۲۰۰۹ آثار ضدباکتریایی عصاره استونی و متانولی این گل‌سنگ را بر باکتری‌های باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و سراسیا مارسنس بررسی کردند که نشان دادند هر دو عصاره این گل‌سنگ فقط بر باکتری‌های گرم مثبت آزمایش شده اثر دارند و عصاره استونی این گل‌سنگ در غلظت ۲ میلی گرم وزن خشک در هر دیسک بر باکتری‌های باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس و استافیلوکوکوس اورئوس اثر دارد و قطر هاله عدم رشد برای این باکتری‌ها به ترتیب ۱۳/۳، ۹/۶ و ۸ میلی متر است (۱۹).

- (4) Burlando B., Ranzato E., Volante A., Appendino G., Pollastro F., Verotta L. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Medica* 2009; 75:607- 13.
- (5) Burkholder P. R., Evans A. W., McVeigh I., Thornton, H. K. Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1944; 30 (9): 250.
- (6) Nakanishi T., Murata H., Inatomi Y., Inada A., Murata J., Lang F. A. et al. Screening of anti-HIV-1 activity of North American plants: Anti-HIV-1 activities of plant extracts, and active components of *Letharia vulpina* (L.) Hue. *Natural Medicines* 1998; 52: 521- 26.
- (7) O'Neill M. A., Mayer M., Murray K. E., Rolim-Santos H. M. L., Santos-Magalhães N. S., Thompson A. M., & Appleyard, V. C. L. Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells. *Brazilian Journal of Biology* 2010; 70 (3): 659- 64.
- (8) Turk A. O., Yilmaz M., Kivanc M., Turk H. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. *Zeitschrift f für Naturforschung C* 2003; 58 (11/12):850- 54.
- (9) Devi G. K., Anantharaman P., Kathiresan K., & Balasubramanian T. Antimicrobial activities of the lichen *Rocella belangeriana* (Awasthi) from mangroves of Gulf of Mannar. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 2011; 40: 449- 53.
- (10) Lucarini R., Tozatti M. G., de Oliveira Salloum A. I., Crotti A. E. M., Silva M. L. A., Gimenez V. M. M., et al. Antimycobacterial activity of *Usnea steineri* and its major constituent (+)-usnic acid. *African Journal of Biotechnology* 2014; 11 (20): 4636- 9.
- (11) Valadbeigi T & Moradi H. An investigation of antibacterial effect of methanol and acetone extracts in some lichens in Ilam. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2 (5): 43- 50.
- (12) Bacter R. W., Kirby M. D. K., Sherris J. C., Turek M. Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method. *American Journal of clinical pathology* 1966; 45: 493- 6.
- (13) Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 2007; 42(4): 321-324.
- (14) Soltani A., Moniri. H., Nejadstari, T. Extraction and determination of secondary metabolites of some species of crustose and foliose lichens in Khorasan Razavi province using established microcrystals. *Journal of Biological Sciences Islamic Azad University of Zanzan* 2010; 3(3):115-121.
- (15) Kumar KC, S., & Müller, K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *Journal of natural products* 1999; 62(6): 821-823.
- (16) Rojas I. S., Lotina-Hennsen B., Mata R. Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts 1. *Journal of natural products* 2000; 63(10): 1396-1399.
- (17) Candan M., Yilmaz M., Tay T., Kivanc M., Turk, H. Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Xanthoparmelia pokornyi* and its gyrophoric and stenosporic acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C* 2006; 61(5/6): 319.
- (18) Karagöz A., Dogruöz N., Zeybek Z., Aslan A. Antibacterial activity of some lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 2009; 3(12): 1034-1039.
- (19) Nakhai M. M., Zokaei M. Identification and evaluation of antibacterial activity of five native lichens on the outskirts of the Mashad collected in vitro. *Journal of Biological Sciences, Islamic Azad University of Zanzan* 2009; 4(2); 27-33.

- ¹ Burkholder
- ² *E.coli*
- ³ *Bacillus subtilis*
- ⁴ *Staphylococcus aureus*
- ⁵ Türk
- ⁶ *Cetraria aculeata*
- ⁷ *Pseudomonas aerogenosa*
- ⁸ *proteus vulgaris*
- ⁹ *Listeria monocytogenes*
- ¹⁰ *Bacillus cereus*
- ¹¹ *streptococcus faecalis*
- ¹² *protolichsterinic acid*
- ¹³ Devi
- ¹⁴ - *Rocella belangerian Rocella belangerian*
- ¹⁵ - *vibrio cholerae*
- ¹⁶ - Lucarini
- ¹⁷ - *Usena steineri*
- ¹⁸ - *Mycobacterium kansasii*
- ¹⁹ - *Fulgensia fulgens*
- ²⁰ - *Placidium semaforonense*
- ²¹ - *Staphylococcus epidermidis*
- ²² - Merck
- ²³ - *Glypholecia scabra*
- ²⁴ - *Rhizoplaca melanophthalma*
- ²⁵ - *Micrococcus luteus*
- ²⁶ - *Klebsiella pneumoniae*
- ²⁷ - *Serratia marcescens*
- ²⁸ - Carbenicillin
- ²⁹ - Azithromycin
- ³⁰ - Gentamicin
- ³¹ - Minimum inhibitory concentration
- ³² - Minimum bactericidal concentration
- ³³ - Mean±SD
- ³⁴ - One-Way Analysis of variance
- ³⁵ - Tukey
- ³⁶ - gyrophoric
- ³⁷ - Candan
- ³⁸ - *Xanthoparmelia pokorny*
- ³⁹ - *yersinia enterocolitica*
- ⁴⁰ - Karagöz

Evaluation antibacterial activity of acetone extract of *Glypholecia scabra* and *Rhizoplaca melanophthalm* on some standard bacteria

Mojgan Shafiee

M.Sc of Microbiology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Khorasan Razavi, Neyshabur, Iran;
mojgan_shafiee22@yahoo.com

Jafar Hemmat *

Assistant Professor of Molecular Genetic, Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran.
j.hemmat@gmail.com

Mohammad Reza Sam

Assistant Professor of Molecular Genetic, Institute of Biotechnology, Urmia University, Iran,
s_mohammadreza@yahoo.com

Abstract

Introduction: Nowadays, antimicrobial resistance among bacteria and other pathogenic microorganisms is a serious threat to management of infectious diseases. Therefore, investigation of new metabolite from new resources such as lichens are the subject of many research groups.

Materials and methods: Acetone extract of two lichens of *Glypholecia scabra* and *Rhizoplaca melanophthalm* were prepared using a Soxhlet extraction. The antibacterial activities of the extracts were investigated on some Gram-positive and Gram-negative bacteria such as, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staph aureus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescense*, *Escherichia coli* using the Mueller Hinton Medium and Carbenicillin and Azithromycin standard antibiotics by Kirby's method. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the extracts were determined.

Results: Extract of *Glypholecia scabra* showed significant effects on Gram-positive bacteria such as, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staph aureus*, and *Micrococcus luteus* and also on Gram-negative *Proteus vulgaris*, respectively, with MIC values of 0.16, 0.26, 1.04, 0.65 and 0.11 mg/ml. Extract of *Rhizoplaca melanophthalma* showed inhibitory effects on Gram-positive bacteria *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*, respectively, with values of 0.04, 0.08, 1.04 and 0.16 mg/ml but had no effect on Gram-negative bacteria.

Discussion and conclusion: The antibacterial effect of *Glypholecia scabra* has not published before. The results of this research demonstrate the antibacterial effects of both Iranian native lichens. So acetone extract of the studied lichens maybe an alternative to chemical antibiotics that need to be studied more.

Key words: Lichen, Antibiotic, Anti bacterial effects

* Corresponding author

Received: May 24, 2015 / **Accepted:** September 12, 2015