# ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی گلسنگ های *Candelariella rhodax* و *Protoparmeliopsis muralis*

**مژگان شفیعی[۱]، جعفر همت[۲]* و محمد سهرابی[۲]**

[۱] **ایران، لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی**

[۲] **ایران، تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۱۲

## چکیده

توسعه و گسترش مقاومت میکروبی به آنتی بیوتیک های موجود باعث شده است محققان ماده های جدید از منابع جدید را مورد مطالعه قرار دهند. گلسنگ ها به عنوان یکی از منابع مواد زیست فعال جدید با منشا طبیعی، مورد توجه می باشند. در این مطالعه اثرضد باکتریایی دو گونه گلسنگ بومی ایران مورد بررسی قرار گرفت. عصاره استونی *کاندلاریلا روداکس* (*Candelariella rhodax*) و *پروتوپارملیوپسیس مورالیس* (*Protoparmeliopsis muralis*) با استفاده از دستگاه سوکسوله تهیه شد. اثرات ضدباکتریایی عصاره با استفاده از مولرهینتون آگار و آنتی بیوتیک های استاندارد کربنیسیلین و آزیترومایسین به روش کربی بائر بر روی باکتری های گرم مثبت و منفی بررسی شد. مقدار حداقل غلظت مهار کننده و حداقل غلظت کشندگی عصاره ها نیز تعیین شد. عصاره استونی *کاندلاریلا روداکس* بر روی باکتری های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس*، *میکروکوکوس لوتئوس* اثرات ضدباکتریایی قابل توجهی نشان داد. اثرات ضد میکروبی این گلسنگ برای اولین بار گزارش شده است. عصاره *پروتوپارملیوپسیس مورالیس* اثر بازدارندگی و مهاری بر روی باکتری های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس*، *استافیلو کوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* داشت. نتایج این تحقیق تاثیر ضد باکتریایی هر دو گونه بومی گلسنگ را اثبات می کند. بنابراین عصاره استونی این گلسنگ ها می تواند جهت مطالعات بیشتر مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه های کلیدی:** متابولیت های قارچی، *کاندلاریلا روداکس* ، *پروتوپارملیوپسیس مورالیس* ، اثرات ضد باکتریایی .

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۱۱۸ داخلی-۵۶۲۷۶۰۲۰، پست الکترونیکی: j.hemmat@gmail.com

## مقدمه

استفاده مداوم و گاها ناصحیح از آنتی بیوتیک های مصنوعی، توسعه و گسترش مقاومت میکروبی به آنتی بیوتیک های موجود، همچنین برخی عوارض جانبی ناخواسته آنها، باعث شده است محققان کشف ماده های جدید از منابع جدید را مورد مطالعه قرار دهند. گلسنگ ها به عنوان یکی از منابع کمتر مطالعه شده مواد زیست فعال با منشاء طبیعی می باشند. در بسیاری از گونه های گلسنگی، فعالیتهای ضد باکتریایی بر علیه باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و همچنین فعالیت ضد قارچی نشان داده شده است. همچنین مطالعات نشان می دهد که برخی ترکیبات گلسنگی، رشد باکتری ها را در غلظت کمتری در مقایسه با دیگر منابع درمانی آنتی بیوتیکی مهار می کنند. برخی گلسنگ ها قرن ها بعنوان عناصر تشکیل دهنده در تهیه داروها به کار رفته اند (۲و۱). خواص دارویی برخی از گلسنگها در سیستم های طب سنتی ذکر شده است که از آن ها برای درمان طیف وسیعی از بیماری های شایع از جمله برونشیت، جذام، بیماری های خون، اختلالات معده، بیماری های قلبی، التهاب آسم، و ...استفاده شده است(۱۸). آزمایشات درمورد فعالیت آنتی بیوتیکی گلسنگ ها بر اساس عصاره آبی آنها شروع شد سپس به انواع عصاره ها

آنها تعمیم داده شد (۴). فعالیت ضد باکتریای عصاره متانولی گلسنگ *پارملیا سکساتیلیس* ( *Parmelia saxatilis* ) در سال ۲۰۰۶ گزارش شد (۷). فعالیت ضد باکتری گلسنگ *اوسنا استینری* (*Usena steineri*) در مقابل *مایکوباکتریوم کانساسی* در سال ۲۰۱۲گزارش شد(۱۲). فعالیت ضد باکتریایی ستراریا ایلاندیکا( *Cetraria islandica* ) در درمان زخم معده و زخم دوازدهه گزارش شده است و ترکیبات مؤثره این گلسنگ برای درمان عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری کاربرد دارد(۹). پیشرفت های اخیر در زمینه ی پزشکی منجر به کشف فعالیت بیولوژیک از جمله خواص آنتی بیوتیکی، ضدویروسی، ضدتکثیری، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی تعداد محدودی از محصولات گلسنگی شده است. در برخی از مطالعات نشان داده شده است که برخی گلسنگ ها دارای اثرات ضد تکثیری روی سلول های سرطانی هستند(۱۶و۱۱و۱۰و۵). در مجموع با توجه به کاربرد گلسنگ ها در طب سنتی در نواحی متعددی از دنیا، بنظر می رسد گلسنگ ها عوامل ضد سرطانی و ضد میکروبی مناسبی برای سیستم ایمنی باشند که می توانند در کنترل بیماری های عفونی و سرطانی نقش مهمی داشته باشند. بنابراین باید مطالعات بیشتری برای شناسایی ترکیبات جدید گلسنگی که خواص درمانی و فعالیت ضد میکروبی آنها را آشکار می کنند، انجام شود. (۱۳). در این مطالعه بمنظور بستر سازی بررسی ترکیبات موثره دو نمونه گلسنگ بومی ایران، اثرضد باکتریایی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روشها

مواد عمده مورد استفاده شامل موارد ذیل بودند: استون (مرک آلمان)، محلول نیم مک فارلند، محلول نمکی ۰/۹ درصد، دیسک های آنتی بیوتیک شامل آزیترومایسین ( Azithromycin)و کربنیسیلین(Carbenicillin) و دیسک خام (شرکت پادتن طب)، دی متیل سولفوکساید (مرک آلمان با جرم مولکولی ۷۸/۱۳ گرم بر مول)، پلیت، سواپ، پنس، ویال، محیط های مولر هینتون و نوترینت آگار.

**جمع آوری گلسنگ ها:** گلسنگ ها از از نواحی نقده واقع در آذربایجان غربی با طول و عرض جغرافیایی( ۳۶,۹۱۷۶، ۴۵,۳۷۲۶) جمع‌آوری شدند. شناسایی گلسنگ ها با توجه به مشخصات آن ها و بر اساس کلید شناسایی مرجع انجام شد(۲). در این مطالعه از دو گونه گلسنگ *کاندلاریلا روداکس* و *پروتوپارملیوپسیس موراليس* برای بررسی فعالیت ضد میکروبی استفاده شد.

**ریزسازواره های مورد مطالعه:** در این تحقیق از نه باکتری شاخص از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس*( *Staphylococcus aureus*) PTCC1431، *میکروکوکوس لوتئوس*( *Micrococcus luteus*) PTCC1110، *باسیلوس سرئوس*(*Bacillus cereus*) PTCC1247، *باسیلوس سوبتلیس*(*Bacillus subtilis*) PTCC1023، *اشریشیا کلی*( *E.coli*) PTCC1330، *کلبسیلا پنومونیه*(*Klebsiella pneumoniae*) PTCC1290، *سراشیا* مارسنس( *Serratia marcescens*)PTTC1111، *پروتئوس* ولگاریس(*proteus vulgaris*) PTCC1312، *سودوموناس آئروژینوزا* ( *pseudomonas aerogenosa*) PTCC1074، جهت ارزیابی اثرات ضد باکتریایی گلسنگ های موردمطالعه استفاده شد. باکتری ها همگی از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران دریافت شده بودند.

**عصاره گیری از گلسنگ ها:** ابتدا گلسنگ ها مورد نظر از مواد زائد از جمله خزه، خاک و ... جداسازی گردید. سپس نمونه ها به منظور عصاره گیری در مجاورت هوا خشک شدند. نمونه های خشک شده، آسیاب شدند تا به صورت پودر تقریبا یکنواختی در آیند. برای عصاره گیری گلسنگ ها از دستگاه سوکسله به مدت ۱۰ ساعت استفاده شد. بمنظورتغلیظ کردن عصاره استخراج شده و خارج کردن حلال از عصاره ازدستگاه روتاری اوپراتور (تحت فشار

پایین) استفاده شد. سپس عصاره تغلیظ شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای منفی ۱۸ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

**ارزیابی اثر ضد باکتریایی:** جهت ارزیابی اثر ضد باکتریایی از روش دیسک گذاری(کربی بائر) استفاده شد(۱۵). جزییات روش طبق روش قبلا گزارش شده انجام شد(۱). آنتی بیوتیکهای استاندارد کربنیسیلین (برای باکتریهای گرم مثبت)، آزیترومایسین (برای باکتری های گرم منفی) به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. سپس پلیت ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت مدت زمان مورد نظر قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها بررسی شد (کلیه آزمایش ها حداقل سه بار تکرار شدند).

**تعیین MIC و MBC:** در مورد گلسنگ هایی که دارای اثر ضد باکتریایی بودند حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده(MBC) تعیین شد. تعیین MIC با استفاده از پلیت ۹۶ خانه ای استریل و روش براث میکرودیلوشن انجام شد(۱۵). به این صورت که از ۱۵ چاهک پلیت برای هر آزمون استفاده شد. یکی از چاهک ها که فقط حاوی محیط کشت و باکتری می بود به عنوان کنترل مثبت و چاهک دیگر که فقط حاوی محیط کشت می باشد به عنوان 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 میلی گرم در میلی لیتر از عصاره های گلسنگی تهیه شد. سپس از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده مقدار ۱/۵ میکرولیتر برداشته و داخل تمام چاهک ها به جز کنترل منفی ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس رشد یا عدم رشد باکتری ها به صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت. مرز رقت بدون هیچ رشد قابل رویت به عنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد در نظر گرفته شد. برای بررسی دقیق تر و تعیین حداقل غلظت کشنده، از محلول یکنواخت چاهک ها برداشته و در محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. کمترین غلظتی که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشنده در نظر گرفته شد.

**تجزیه و تحلیل آماری:** هر آزمون سه بار تکرار شد و داده های به دست آمده به صورت میانگین با لحاظ انحراف معیار (Mean±SD) بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرف ، (ANOVA نرم افزار SPSS نسخه ۲۱) و آزمون توکی استفاده گردید. در تمام بررسی ها میزان معنی داری آزمونها $P< ۰/۰۵$ در نظر گرفته شده است.

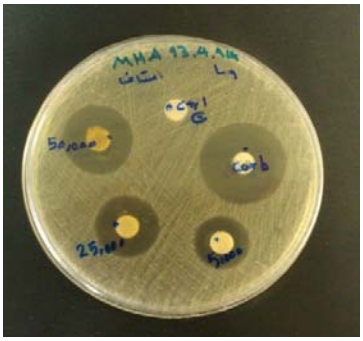
## نتایج

در این پژوهش اثرات ضدباکتریایی دو گونه گلسنگ بومی ایران بر روی انواع باکتری های شاخص گرم مثبت و منفی بررسی گردید. از کربنیسیلین برای باکتری های گرم مثبت و از آزیترومایسین برای باکتری های گرم منفی به عنوان کنترل مثبت و از دیسک آغشته به دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی استفاده شد. بر طبق نتایج حاصله، جدول (۱)، غلظت های ۵۰، ۲۵و۵ میلی گرم بر میلی لیترعصاره استونی گونه *کاندلاریلا روداکس* بطور معنی داری اثر بازدارندگی و مهاری بر روی باکتری های *باسیلوس سرئوس* (شکل ۱)، *باسیلوس سوبتلیس*، *میکروکوکوس لوتئوس* داشت در حالیکه بر روی باکتری های *استافیلو کوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلای*، *سراشیا مارسسنس*، *سودوموناس آئروژینوزا* ، *کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس ولگاریس* اثر نداشت. همچنین طبق جدول (۲) عصاره گلسنگ *پروتوپارملیوپسیس مورالیس* بطور معنی داری اثر بازدارندگی و مهاری بر روی باکتری های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس*، *استافیلو کوکوس اورئوس* (شکل۲) و *میکروکوکوس لوتئوس*

داشت در حالیکه بر روی باکتری های گرم منفی *اشریشیا کلای*، *سراشیا مارسسنس*، *سودوموناس آئروژینوزا* ، *کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس ولگاریس* اثر نداشت.

جدول ۱- ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره گلسنگ *کاندلاریلا روداکس*. نتایج میانگین سه بار تکرار می باشد. میزان معنی داری$P<۰/۰۵$ در مقایسه با کنترل در نظر گرفته شده است.

| آنتی بیوتیک / عصاره | باکتری‌های گرم مثبت | | | | باکتری‌های گرم منفی | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | باسیلوس سرئوس | استافیلوکوکوس اورئوس | باسیلوس سوبتلیس | میکروکوکوس لوتئوس | اشریشیا کلای | سراشیا مارسسنس | سودوموناس آءروجینوز | کلبسیلا پنومونیه | پروتئوس ولگاریس |
| کربنی سیلین | ۱۳/۶۶±۱/۵۲ | ۲۵/۳۳±۰/۷۵ | ۳۲/۶۶±۲/۵۱ | ۴۸±۱ | _ | _ | _ | _ | _ |
| آزیترومایسین | _ | _ | _ | _ | ۲۵/۶۶±۱/۵ | ۲۷/۶۶±۲/۰۸ | ۲۰/۳۳±۰/۵۷ | ۲۸±۱ | ۲۷±۱ |
| ۵۰mg/ml | ۸/۳۳±۰/۵۷ | _ | ۸/۳۳±۰/۵۷ | ۱۳/۱۶±۰/۷۶ | _ | _ | _ | _ | _ |
| ۲۵mg/ml | ۶/۵±۰/۵ | _ | _ | ۱۰/۸۳±۰/۷۶ | _ | _ | _ | _ | _ |
| ۵mg/ml | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |
| کنترل منفی | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |



شکل ۱- اثر ضدباکتریایی *پروتوپارملیوپسیس موراليس بر استافیلوکوکوس اورئوس* شکل ۲. اثر ضدباکتریایی *پروتوپارملیوپسیس موراليس* بر *باسیلوس سرئوس*

جدول ۲- ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره گلسنگ *پروتوپارملیوپسیس موراليس*. نتایج میانگین سه بار تکرار می باشد. میزان معنی داری $P<۰/۰۵$ در مقایسه با کنترل در نظر گرفته شده است.

| آنتی بیوتیک/ عصاره | باکتری‌های گرم مثبت | | | | باکتری‌های گرم منفی | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | باسیلوس سرئوس | استافیلوکوکوس اورئوس | باسیلوس سوبتلیس | میکروکوکوس لوتئوس | *اشریشیا کلای* | *سراشیا مارسسنس* | *سودوموناس آءروجینوز* | *کلبسیلا پنومونیه* | *پروتئوس ولگاریس* |
| کربنی سیلین | ۱۳/۶۶±۱/۵۲ | ۲۵/۳۳±۰/۷۵ | ۳۲/۶۶±۲/۵۱ | ۴۸±۱ | _ | _ | _ | _ | _ |
| آزیترومایسین | _ | _ | _ | _ | ۲۵/۶۶±۱/۵ | ۲۷/۶۶±۲/۰۸ | ۲۰/۳۳±۰/۵۷ | ۲۸±۱ | ۲۷±۱ |
| ۵۰mg/ml | ۱۹/۵±۰/۵ | ۲۲±۱ | ۱۷/۸۳±۰/۷۶ | ۳۱±۱ | _ | _ | _ | _ | _ |
| ۲۵mg/ml | ۱۸/۶۶±۰/۵۷ | ۱۷/۳۳±۰/۵۷ | ۱۶/۸۳±۰/۷۶ | ۲۶±۱ | _ | _ | _ | _ | _ |
| ۵mg/ml | ۱۶/۱۶±۰/۷۶ | ۱۲/۱۶±۱/۰۴ | ۱۲±۱ | ۲۴±۱ | _ | _ | _ | _ | _ |
| کنترل منفی | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |

**مقدار MIC و MBC**: طبق جدول ۳ عصاره استونی *کاندلاریلا روداکس* با کمترین غلظت ۱/۰۴ و ۱/۳ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی باکتری *باسیلوس سوبتلیس* و *باسیلوس سرئوس* دارد.

همچنین عصاره استونی *پروتوپارملیوپسیس موردالیس* با کمترین غلظت ۰/۰۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی باکتری های *باسیلوس سوبتلیس* و *باسیلوس سرئوس* نشان داده است.

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

| گلسنگ / باکتری | *کاندلاریلا روداکس* | | *پروتوپارملیوپسیس موردالیس* | |
|---|---|---|---|---|
| | MIC | MBC | MIC | MBC |
| باسیلوس سرئوس | ۱/۳ | ۲/۶ | ۰/۰۰۵ | ۰/۰۱ |
| باسیلوس سوبتلیس | ۱/۰۴ | ۲/۰۸ | ۰/۰۰۵ | ۰/۰۱ |
| استافیلوکوکوس اورئوس | – | – | ۰/۱۶ | ۰/۳۲ |
| میکروکوکوس لوتئوس | ۱/۸۲ | ۳/۶۴ | ۰/۰۰۷ | ۰/۰۱۴ |

## بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش اثرات ضدباکتریای دو گونه گلسنگ بومی ایران بر روی انواع باکتری های شاخص گرم مثبت و منفی بررسی گردید. بر طبق نتایج حاصله، جدول (۱)، غلظت های ۵۰، ۲۵و۵ میلی گرم بر میلی لیترعصاره استونی گونه گلسنگ *کاندلاریلا روداکس* اثر بازدارندگی و مهاری بر روی باکتری های *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس*، *میکروکوکوس لوتئوس* داشت در حالیکه بر روی باکتری های *استافیلو کوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلای*، *سراشیا مارسسنس*، *سودوموناس آئروژینوزا* ، *کلبسیلا پنومونیه* و *پروتئوس ولگاریس* اثر نداشت. تاکنون اثرات ضد میکروبی این گلسنگ مطالعه گزارش نشده است. از آنجایی که از جمله ترکیبات موجود در این گلسنگ ولپینیک اسید (vulpinic acid) می باشد، و در یک گزارش در سال ۱۹۹۵ اثرات ضد باکتریایی این اسید دربرابر باکتری های کلستریدیوم *پرفرنژنس*، *باکتروئیدز* تتایوتاومیکرون، *باکتروئیدز ولگاتوس* ، *باکتروئیدز فراژیلیس*، *باکتروئیدز لوشی*، *پروپیونی باکتریوم اکنز*، *انتروکوکوس فیکالیس*، *انتروکوکوس فاسیوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ارایه شده بود می توان حداقل بخشی از فعالیت ضد باکتریایی گلسنگ مورد مطالعه را به آن نسبت داد (۱۱). نتایج تحقیق نشان داد که این عصاره بر روی *استافیلوکوکوس* اورئوس اثر مهاری ندارد. که می توان احتمالا میزان این اسید در عصاره گلسنگ بومی مورد تحقیق مرتبط داد. می توان در مطالعات تکمیلی نسبت به شناسایی ترکیبات این گلسنگ از جمله مواد جدید احتمالی گلسنگی که فعالیت ضد میکروبی قوی نشان می دهند، پرداخت.

همچنین بر طبق نتایج حاصله، جدول (۲)، غلظت های ۵۰، ۲۵و۵ میلی گرم بر میلی لیترگونه گلسنگ *پروتوپارملیوپسیس موردالیس* مورد بررسی قرار گرفت بر اساس نتایج، این گلسنگ اثر بازدارندگی و مهاری بر روی باکتری های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس*، *استافیلو کوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* داشت در حالیکه بر روی باکتری های گرم *منفی اشریشیا کلای*، *سراشیا مارسسنس*، *سودوموناس آئروژینوزاا* ، *کلبسیلا پنومونیه* و *پروتئوس ولگاریس* اثر نداشت.

در تحقیقی در سال ۲۰۱۷ میسلیوم این گلسنگ را در محیط PDA و GLBM در شرایط آزمایشگاهی کشت دادند و عصاره استونی و متانولی میسلیوم کشت داده شده را استخراج کردند و اثر ضد باکتریایی آن را به روش انتشار دیسک بر روی باکتری های *باسیلوس سوبتلیس*، *اشریشیاکلای*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار داده و مشاهده کردند که عصاره فعالیت ضدباکتریایی قوی را در باکتری های گرم مثبت در مقایسه با باکتری های گرم منفی نشان می دهند(۶). از آنجا که زئورین (Zeorin) یکی از ترکیبات موجود در این نوع

گلسنگها می باشد می توان نتایج این تحقیق را با نتایج برانیسلاو(Branislav) و همکارانش مقایسه کرد که در سال ۲۰۱۰ اثر ضد باکتریایی زئورین جدا شده از*پارامیلوپسیس هایپروتا* ( *Parmeliopsis hyperopta* ) را گزارش کردند و نشان دادند که این متابولیت با غلظت۰/۳۹ میلی گرم بر میلی لیتر در برابر چهار گونه باکتری شامل *باسیلوس مایکوئیدز* ( *Bacillus mycoides* )، *باسیلوس سوبتلیس*، *انتروباکترکلوآسه آ*(*Enterobacter cloacae*) ، *کلبسیلا پنومونیه و استافیلوکوکوس اورئوس* فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی نشان می دهد. در نتایج این تحقیق نیز عصاره استونی گلسنگ *پروتوپارملیوپسیس موراليس* فعالیت ضد باکتریایی بیشتری راعلیه باکتری های گرم مثبت در مقایسه یا باکتری های گرم منفی نشان می دهد اما در برابر باکتری گرم منفی *کلبسیلا پنومونیه* اثر مهاری نشان نداد. مقایسه MIC تحقیق حاضر با MIC گونه های لهستان که اخیرا گزارش شده است، نشان از توان ۴ برابری گونه ایرانی در مقابل باسیلوس سوبتیلیس دارد، با ذکر اینکه سویه مورد ارزیابی wt 168 بوده است. در حالیکه در مقابل تاثیر عصاره گلسنگ لهسانی بر استاف سویه 6285/10 نزدیک ۶ برابر گونه ایرانی بوده است(۳). تبعا بخشی از این تفاوت اثر به تفاوت سویه ای باکتریایی مربوط می شود ولی بخش دیگر احتمالا به میزان و نوع ترکیبات گلسنگ های مناطق مختلف متفاوت می باشد که این نیز ممکن است به خاطر میزان کم برخی متابولیت ها مانند زئورین باشد. در تحقیق حاضر میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از تاثیر عصاره استونی *پروتوپارملیوپسیس موراليس* برروی باکتری باسیلوس سرئوس ۱۶/۱۶ میلیمتر بود درحالیکه قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک استاندرد ۱۳/۶۶ میلی متر بود که نشان دهنده اثر قوی تری عصاره این گلسنگ در مقایسه با آنتی بیوتیک استاندارد نشان می باشد. بنابراین احتمالا ماده ضد میکروبی بهتری نسبت به آنتی بیوتیک های شیمیایی می باشد. در تحقیقی که طی آن عصاره *پروتوپارملیوپسیس موراليس* کشت داده شده روی محیط کشت های مختلف بررسی شده بود، فعالیت ضد باکتریایی عصاره ها بسته به محیط کشت متغییر گزارش شد. هاله عدم رشد استاف اورئوس عصاره های این گلسنگ بین ۸ تا ۱۶,۵ میلیمتر گزارش شده است. که تا حدودی مشابه نتایج این تحقیق است (۶). در کل نتایج این تحقیق تاثیر ضد باکتریایی هر دو گونه گلسنگ گونه ایرانی را اثبات می کند. بنابراین عصاره استونی دو گلسنگ مطالعه شده بومی ایران می تواند جهت مطالعات بیشتر مورد استفاده قرار گیرد.

**تشکر و قدردانی**

از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به ویژه کارشناسان پژوهشکده زیست فناوری، سرکارخانم ها نازنین کاظمی نژاد، فرزانه سلامی، زهرا اصفهانی، سودابه کریمی و آقای مهندس شیخی نژاد به خاطر همکاری در این تحقیق سپاسگزاری می- گردد.

## منابع

۱- شفیعی، م.، همت، ج.، سام، م. (۱۳۹۵).مقایسهٔ آثار ضدباکتریایی عصارهٔ گلسنگ‌های *Glypholecia scabra* و *Rhizoplaca melanophthalma* بر برخی باکتری‌های استاندارد. *زیست شناسی میکروارگانیسم ها*.: ۵( ۱۹) 13-127 .

۲- وفایی، م.، همت، ج. (۱۳۹۷). بررسی بیوفیلم گلسنگی سطوح صخره‌ای روستای تاریخی کندوان. انسان و محیط زیست.: ۱۶(۱) ۶۱-۵۱ .

3- Branislav, R. A. N. K. O. V. I. Ć., Marijana, K. O. S. A. N. I. Ć., & Slobodan, S. U. K. D. O. L. A. K. (2010). Antimicrobial activity of some lichens and their components. Recent Adv Clin Med, 279-286.

4- Burkholder, P. R., Evans, A. W., McVeigh, I., & Thornton, H. K. (1944). Antibiotic activity of lichens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 30(9), 250.

5- Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F., & Verotta, L. (2009). Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. Planta medica, 75(06), 607-613.

6- Felczykowska, A., Pastuszak-Skrzypczak, A., Pawlik, A., Bogucka, K., Herman-Antosiewicz, A., & Guzow-Krzemińska, B. (2017). Antibacterial and anticancer activities of acetone extracts from in vitro cultured lichen-forming fungi. BMC complementary and alternative medicine, 17(1), 300.

7- Gulluce, M., Aslan, A., Sokmen, M., Sahin, F., Adiguzel, A., Agar, G., & Sokmen, A. (2006). Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens Parmelia saxatilis, Platismatia glauca, Ramalina pollinaria, Ramalina polymorpha and Umbilicaria nylanderiana. Phytomedicine, 13(7), 515-521.

8- Hodkinson, B. P., & Lutzoni, F. (2009). A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. Symbiosis, 49(3), 163-180.

9- Ingolfsdottir, K., Hjalmarsdottir, M. A., Sigurdsson, A., Gudjonsdottir, G. A., Brynjolfsdottir, A., & Steingrimsson, O. (1997). In vitro susceptibility of Helicobacter pylori to protolichesterinic acid from the lichen Cetraria islandica. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 41(1), 215-217.

10- Kosanić, M., Manojlović, N., Janković, S., Stanojković, T., & Ranković, B. (2013). Evernia prunastri and Pseudoevernia furfuraceae lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. Food and chemical toxicology, 53, 112-118.

11- Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T., & Marre, R. (1995). In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid,(+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. Antimicrobial agents and chemotherapy, 39(11), 2541-2543.

12- Lucarini, R., Tozatti, M. G., de Oliveira Salloum, A. I., Crotti, A. E., Silva, M. L., Gimenez, V. M., ... & Cunha, W. R. (2012). Antimycobacterial activity of Usnea steineri and its major constituent (+)-usnic acid. African Journal of Biotechnology, 11(20), 4636-4639.

13- Molnár, K., & Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. Zeitschrift für Naturforschung C, 65(3-4), 157-173..

14- Nakanishi, T., Murata, H., Inatomi, Y., INADA, A., MURATA, J., LANG, F. A., ... & OTAKE, T. (1998). 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. Nat Med . 52:521–526.

15- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1993) Approved Standard M2-A5. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests.National Committee for Clinical Laboratory Standards , Villanova, Pennsylvania.

16- 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. (2010). Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells?. Brazilian Journal of Biology, 70(3), 659-664.

17- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). 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, 42(4), 321-324.

18- Shukla, V., Joshi, G. P., & Rawat, M. S. M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. Phytochemistry Reviews, 9(2), 303-314.

# Antibacterial activity of *Candelariella rhodax* and *Protoparmeliopsis muralis*

**Shafiee M.,[1] Hemmat J.[2] and Sohrabi M.[2]**

**[1] Dept. Microbiology, Islamic Azad University, Lahijan, I.R. of Iran.**

**[2] Dept. of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, I.R. of Iran.**

## Abstract

The development of microbial resistance to antibiotics has led researchers to study the new material from the new resources. Lichens are considered as one of the sources of new biomaterials of natural origin. In this study, the antibacterial activity of two native lichens from Iran was evaluated. Acetonic extract of *Candelariella rhodax* and *Protoparmeliopsis* muralis were prepared using a Soxhlet extraction. The antibacterial activities of the extracts were investigated on some Gram-positive and Gram-negative bacteria using the Muller Hinton agar and Carbenicillin and Azithromycin as standard antibiotics by Kirby's method. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the extracts was determined. Extract of *Candelariella rhodax* showed significant sensitivity on some Gram-positive bacteria such as, *Bacillus cereus, Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus*. The results are published for the first time. Extract of *P.* muralis showed inhibitory effect on Gram-positive bacteria *B. cereus, B. subtilis, M. luteus* and .*S aureus*. The results of this research demonstrate the antibacterial effects of both native lichens. Accordingly, acetonic extract the lichens can be used for further studies.

**Key words:** Fungal metabolites, *Candelariella rhodax*, *Protoparmeliopsis muralis*, antibacterial activity.