

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی گل‌سنگ‌های *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 بیوتیک‌های موجود باعث شده است محققان ماده‌های جدید از منابع جدید را مورد مطالعه قرار دهند. گل‌سنگ‌ها به عنوان یکی از منابع مواد زیست فعال جدید با منشأ طبیعی، مورد توجه می‌باشند. در این مطالعه اثر ضد 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 مولر هینتون آگار و آنتی بیوتیک‌های استاندارد کرینسیلین و آزیترومایسین به روش کربی بائر بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی بررسی شد. مقدار حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها نیز تعیین شد. عصاره استونی *کاندلاریلا روداکس* بر روی باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *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 باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* داشت. نتایج این تحقیق تاثیر ضد باکتریایی هر دو گونه بومی گل‌سنگ را اثبات می‌کند. بنابراین عصاره استونی این گل‌سنگ‌ها می‌تواند جهت مطالعات بیشتر مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: متابولیت‌های قارچی، *کاندلاریلا روداکس*، پروتوپارملیوپسیس مورالیس، اثرات ضد باکتریایی.

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

مقدمه

ترکیبات گل‌سنگی، رشد باکتری‌ها را در غلظت کمتری در مقایسه با دیگر منابع درمانی آنتی بیوتیکی مهار می‌کنند. برخی گل‌سنگ‌ها قرن‌ها بعنوان عناصر تشکیل دهنده در تهیه داروها به کار رفته‌اند (۱ و ۲). خواص دارویی برخی از گل‌سنگ‌ها در سیستم‌های طب سنتی ذکر شده است که از آن‌ها برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های شایع از جمله برونشیت، جذام، بیماری‌های خون، اختلالات معده، بیماری‌های قلبی، التهاب آسم، و... استفاده شده است (۱۸). آزمایشات در مورد فعالیت آنتی بیوتیکی گل‌سنگ‌ها بر اساس عصاره آبی آنها شروع شد سپس به انواع عصاره‌ها

استفاده مداوم و گاهی ناصحیح از آنتی بیوتیک‌های مصنوعی، توسعه و گسترش مقاومت میکروبی به آنتی بیوتیک‌های موجود، همچنین برخی عوارض جانبی ناخواسته آنها، باعث شده است محققان کشف ماده‌های جدید از منابع جدید را مورد مطالعه قرار دهند. گل‌سنگ‌ها به عنوان یکی از منابع کمتر مطالعه شده مواد زیست فعال با منشأ طبیعی می‌باشند. در بسیاری از گونه‌های گل‌سنگی، فعالیت‌های ضد باکتریایی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و همچنین فعالیت ضد قارچی نشان داده شده است. همچنین مطالعات نشان می‌دهد که برخی

آلمان با جرم مولکولی ۷۸/۱۳ گرم بر مول، پلیت، سوپ، پنس، ویال، محیط‌های مولر هیتون و نوترینت آگار.

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

ریزسازواره‌های مورد مطالعه: در این تحقیق از نه باکتری شاخص از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1431) (*Staphylococcus aureus*)، *میکروکوکوس لوتوس* (PTCC1110) (*Micrococcus luteus*)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC1247) (*Bacillus cereus*)، *باسیلوس سوبتیلیس* (PTCC1023) (*Bacillus subtilis*)، *اشریشیا کلی* (PTCC1330) (*E. coli*)، *کلبسیلا پنومونیه* (PTCC1290) (*Klebsiella pneumoniae*)، *سراثیا مارسنس* (PTCC1111) (*Serratia marcescens*)، *پروتئوس ولگاریس* (PTCC1312) (*proteus vulgaris*)، *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC1074) (*pseudomonas aerogenosa*) جهت ارزیابی اثرات ضد باکتریایی گل‌سنگ‌های مورد مطالعه استفاده شد. باکتری‌ها همگی از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران دریافت شده بودند.

عصاره‌گیری از گل‌سنگ‌ها: ابتدا گل‌سنگ‌ها مورد نظر از مواد زائد از جمله خره، خاک و ... جداسازی گردید. سپس نمونه‌ها به منظور عصاره‌گیری در مجاورت هوا خشک شدند. نمونه‌های خشک شده، آسیاب شدند تا به صورت پودر تقریباً یکنواختی در آیند. برای عصاره‌گیری گل‌سنگ‌ها از دستگاه سوکسله به مدت ۱۰ ساعت استفاده شد. بمنظور تغلیظ کردن عصاره استخراج شده و خارج کردن حلال از عصاره از دستگاه روتاری اوپراتور (تحت فشار

آنها تعمیم داده شد (۴). فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی گل‌سنگ *پارملیا سکساتیلیس* (*Parmelia saxatilis*) در سال ۲۰۰۶ گزارش شد (۷). فعالیت ضد باکتری گل‌سنگ *اوسنا استینری* (*Usnea steineri*) در مقابل *مایکوباکتریوم کانساسی* در سال ۲۰۱۲ گزارش 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). پیشرفت‌های اخیر در زمینه پزشکی منجر به کشف فعالیت بیولوژیک از جمله خواص آنتی‌بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد تکثیر، آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی تعداد محدودی از محصولات گل‌سنگی شده است. در برخی از مطالعات نشان داده شده است که برخی گل‌سنگ‌ها دارای اثرات ضد تکثیر روی سلول‌های سرطانی هستند (۱۶ و ۱۱ و ۱۰ و ۵). در مجموع با توجه به کاربرد گل‌سنگ‌ها در طب سنتی در نواحی متعددی از دنیا، بنظر می‌رسد گل‌سنگ‌ها عوامل ضد سرطانی و ضد میکروبی مناسبی برای سیستم ایمنی باشند که می‌توانند در کنترل بیماری‌های 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 می‌کنند، انجام شود. (۱۳). در این مطالعه بمنظور بستر سازی بررسی ترکیبات مؤثره دو نمونه گل‌سنگ بومی ایران، اثر ضد 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، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل آزیترومایسین (*Azithromycin*) و کربنسیلین (*Carbenicillin*) و دیسک خام (شرکت پادتن طب)، دی متیل سولفوکساید (مرک

تعیین حداقل غلظت کشنده، از محلول یکنواخت چاهک‌ها برداشته و در محیط کشت مولر هیتون 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 داده‌های به دست آمده به صورت میانگین با لحاظ انحراف معیار (Mean±SD) بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرف، (ANOVA نرم افزار SPSS نسخه ۲۱) و آزمون توکی استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها میزان معنی‌داری آزمونها $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

نتایج

در این پژوهش اثرات ضدباکتریایی دو گونه گل‌سنگ بومی ایران بر روی انواع باکتری‌های شاخص گرم مثبت و منفی بررسی گردید. از کرینسیلین برای باکتری‌های گرم مثبت و از آزیترومایسین برای باکتری‌های گرم منفی به عنوان کنترل مثبت و از دیسک آغشته به دی‌متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی استفاده شد. بر طبق نتایج حاصله، جدول (۱)، غلظت‌های ۵۰، ۵۰۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره استونی‌گونه *کاندالاریلا روداکس* بطور معنی‌داری اثر بازدارندگی و مهارتی بر روی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* (شکل ۱)، *باسیلوس سوتیلیس*، *میکروکوکوس لوتئوس* داشت در حالیکه بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلای*، *سراشیا مارسسنس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونیه* و *پروتئوس وگاریس* اثر نداشت. همچنین طبق جدول (۲) عصاره گل‌سنگ *پروتوپارملیوپسیس مورالیس* بطور معنی‌داری اثر بازدارندگی و مهارتی بر روی باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* (شکل ۲) و *میکروکوکوس لوتئوس*

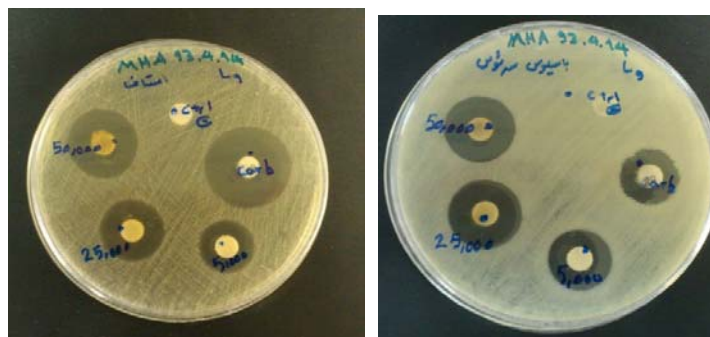
پایین) استفاده شد. سپس عصاره تغلیظ شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای منفی ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

ارزیابی اثر ضد باکتریایی: جهت ارزیابی اثر ضد باکتریایی از روش دیسک‌گذاری (کربی بائر) استفاده شد (۱۵). جزییات روش طبق روش قبل گزارش شده انجام شد (۱). آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد کرینسیلین (برای باکتری‌های گرم مثبت)، آزیترومایسین (برای باکتری‌های گرم منفی) به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت مدت زمان مورد نظر قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها بررسی شد (کلیه آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شدند).

تعیین MIC و MBC: در مورد گل‌سنگ‌هایی که دارای اثر ضد باکتریایی بودند حداقل غلظت مهارکننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) تعیین شد. تعیین MIC با استفاده از پلیت ۹۶ خانه ای استریل و روش برات میکرودیولوشن انجام شد (۱۵). به این صورت که از ۱۵ چاهک پلیت برای هر آزمون استفاده شد. یکی از چاهک‌ها که فقط حاوی محیط کشت و باکتری می‌بود به عنوان کنترل مثبت و چاهک دیگر که فقط حاوی محیط کشت می‌باشد 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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های گل‌سنگی تهیه شد. سپس از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده مقدار ۱/۵ میکرولیتر برداشته و داخل تمام چاهک‌ها به جز کنترل منفی ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس رشد یا عدم رشد باکتری‌ها 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 دقیق‌تر و

داشت در حالیکه بر روی باکتری های گرم منفی *اشریشیا کلبسیلا پنومونیه* و پروتئوس و لگاریس اثر نداشت. *کلای، سراسیا مارسنس، سودوموناس آئروژینوزا*، جدول ۱- ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره گل‌سنگ *کانداریلا روداکس*. نتایج میانگین سه بار تکرار می باشد. میزان معنی داری $P < 0.05$ در مقایسه با کنترل در نظر گرفته شده است.

آنتی بیوتیک / عصاره	باکتری‌های گرم مثبت				باکتری‌های گرم منفی				
	باسیلوس سرتوس	استافیلوکوکوس س اورتوس	باسیلوس سوتلیس	میکروکوکوس لوتتوس	اشریشیا کلای	سراسیا مارسنس	سودوموناس آروژینوز	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
۵۰ mg/ml	۸/۳۳±۰/۵۷	—	۸/۳۳±۰/۵۷	۱۳/۱۶±۰/۷۶	—	—	—	—	—
۲۵ mg/ml	۶/۵±۰/۵	—	—	۱۰/۸۳±۰/۷۶	—	—	—	—	—
۵ mg/ml	—	—	—	—	—	—	—	—	—
کنترل منفی	—	—	—	—	—	—	—	—	—



شکل ۱- اثر ضدباکتریایی پروتویارملیوپسیس مورالیس بر استافیلوکوکوس اورتوس شکل ۲. اثر ضدباکتریایی پروتویارملیوپسیس مورالیس بر باسیلوس سرتوس

جدول ۲- ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره گل‌سنگ پروتویارملیوپسیس مورالیس. نتایج میانگین سه بار تکرار می باشد. میزان معنی داری $P < 0.05$ در مقایسه با کنترل در نظر گرفته شده است.

آنتی بیوتیک / عصاره	باکتری‌های گرم مثبت				باکتری‌های گرم منفی				
	باسیلوس سرتوس	استافیلوکوکوس اورتوس	باسیلوس سوتلیس	میکروکوکوس لوتتوس	اشریشیا کلای	سراسیا مارسنس	سودوموناس آروژینوز	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
۵۰ mg/ml	۱۹/۵±۰/۵	۲۲±۱	۱۷/۸۳±۰/۷۶	۳۱±۱	—	—	—	—	—
۲۵ mg/ml	۱۸/۶۶±۰/۵۷	۱۷/۳۳±۰/۵۷	۱۶/۸۳±۰/۷۶	۲۶±۱	—	—	—	—	—
۵ mg/ml	۱۶/۱۶±۰/۷۶	۱۲/۱۶±۱/۰۴	۱۲±۱	۲۴±۱	—	—	—	—	—
کنترل منفی	—	—	—	—	—	—	—	—	—

گرم بر میلی لیتر به ترتیب بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی باکتری باسیلوس سوتلیس و باسیلوس سرتوس دارد.

مقدار MIC و MBC: طبق جدول ۳ عصاره استونی *کانداریلا روداکس* با کمترین غلظت ۱/۰۴ و ۱/۳ میلی

همچنین عصاره استونی پروتوپارملیوپسیس مورالیس با کمترین غلظت ۰/۰۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین اثر 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	کاندالاریلا روداکس		پروتوپارملیوپسیس مورالیس	
	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

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، ۲۵ و ۵ میلی گرم بر میلی لیترگونه گل‌سنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس مورد بررسی قرار گرفت بر اساس نتایج، این گل‌سنگ اثر بازدارندگی و مهاری بر روی باکتری های گرم مثبت باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتئوس داشت در حالیکه بر روی باکتری های گرم منفی اشیریشیا کلای، سراسیا مارسنس، سودوموناس آنروژینوزا// کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس ولگاریس اثر نداشت.

در تحقیقی در سال ۲۰۱۷ میلیم این گل‌سنگ را در محیط PDA و GLBM در شرایط آزمایشگاهی کشت دادند و عصاره استونی و متانولی میلیم کشت داده شده را استخراج کردند و اثر ضد باکتریایی آن را به روش انتشار دیسک بر روی باکتری های باسیلوس سوبتلیس، اشیریشیا کلای، سودوموناس آنروژینوزا 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

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش اثرات ضدباکتریایی 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، ۲۵ و ۵ میلی گرم بر میلی لیترعصاره استونی گونه گل‌سنگ کاندالاریلا روداکس اثر بازدارندگی و مهاری بر روی باکتری های باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، میکروکوکوس لوتئوس داشت در حالیکه بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیا کلای، سراسیا مارسنس، سودوموناس آنروژینوزا، 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 در برابر باکتری های کلبترییدیوم پرفرنزنس، باکترئیدز تتالیوتاومیکرون، باکترئیدز ولگاتوس، باکترئیدز فراژیلیس، باکترئیدز 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 احتمالاً میزان این اسید در

از تاثیر عصاره استونی پروتوپارملیوپسیس مورالیس بر روی باکتری باسیلوس سرئوس ۱۶/۱۶ میلی‌متر بود درحالیکه قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک استاندارد 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 مورالیس کشت داده شده روی محیط کشت های مختلف بررسی شده بود، فعالیت ضد باکتریایی عصاره ها بسته به محیط کشت متغیر 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.

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 پارملیوپسیس هایپروتا (*Parmeliopsis hyperopta*) را گزارش کردند و نشان دادند که این متابولیت با غلظت ۰/۳۹ میلی گرم بر میلی لیتر در برابر چهار گونه باکتری شامل باسیلوس میکوئیدز (*Bacillus mycoides*)، باسیلوس سوبتیلیس، انتروباکتر کلوآسه (*Enterobacter cloacae*)، کلبسیلا پنومونیه و استافیلوکوکوس اورئوس فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی نشان می دهد. در نتایج این تحقیق نیز عصاره استونی گل‌سنگ پروتوپارملیوپسیس مورالیس 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 لهستانی 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

منابع

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

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

3- Branislav, R. A. N. K. O. V. I. Č., Marijana, K. O. S. A. N. I. Č., & 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., Pastuszek-Skrzypczak, A., Pawlik, A., Bogucka, K., Herman-Antosiewicz, A., & Guzew-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., & Steingrimsdottir, O. (1997). In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to protolicheterinic 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 Salloom, 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.