فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوم، شماره ۵، بهار ۱۳۹۲، صفحه ۴۳- ۵۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۶/۲۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۱۸

# بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره استونی و متانولی چند گونه گلسنگ استان ایلام

**طاهره ولدبیگی:** استادیار زیست شناسی- گلسنگ‌شناسی، دانشگاه ایلام ، ایران، tvaladbigi@yahoo.com *
**حسین مرادی:** دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه ایلام، ایران، mrd.hosein@gmail.com

## چکیده

**مقدمه:** با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی روز افزون باکتری‌ها و گرایش عمومی به ترکیبات طبیعی، شناسایی گلسنگ‌ها و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن‌ها اهمیت خاصی دارد.

**مواد و روش‌ها:** پس از جمع‌آوری گلسنگ‌ها، عصاره متانولی و استونی آن‌ها تهیه و رقت‌های مختلف از عصاره‌ها، روی ۶ باکتری بیماری‌زا به روش انتشار دیسک تاثیر داده شد و با آنتی‌بیوتیک‌های متی‌سیلین، کلیندامایسین، استرپتومایسین و آمپی‌سیلین به عنوان شاهد مثبت مقایسه شد. مقدار حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها نیز برای آن‌ها تعیین شد.

**نتایج:** بررسی قطر هاله‌ها نشان داد که عصاره استونی گلسنگ‌های مورد بررسی بر روی باکتری‌ها تاثیر نداشت. از بین گلسنگ‌ها عصاره متانولی *Fulgensia fulgens* Sw. (Elenkin) فعالیت ضد باکتریایی در خور توجهی داشت.

**بحث و نتیجه‌گیری:** از بین گلسنگ‌های مورد بررسی فقط گونه *Fulgensia fulgens* دارای خواص ضدباکتریایی بود، بنابراین، عصاره متانولی این گلسنگ می‌تواند به عنوان یک فراورده ضدباکتریایی در درمان عفونت‌های این باکتری‌ها جایگزین داروهای شیمیایی شود.

**واژه‌های کلیدی:** ضدباکتریایی، عصاره متانولی، گلسنگ، ایلام

* نویسنده مسؤول مکاتبات

## مقدمه

گلسنگ از اجتماع حداقل یک جلبک یا سیانوباکتر (فایکوبیونت) و یک قارچ (مایکوبیونت) به وجود آمده است (۱). گلسنگ‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی متابولیت‌های ثانویه‌ی متفاوتی تولید می‌کنند. این متابولیت‌ها که اسیدهای گلسنگی[1] نامیده می‌شوند به طور معمول بیش از ترکیبات شیمیایی سایر موجودات زنده کاربرد دارند. زیرا بسیاری از این ترکیبات اختصاصی بوده و حاصل سنتز در شرایط هم‌زیست می‌باشند. این تولیدات برون سلولی نامحلول در آب که گاهی تا ۳۰ درصد وزن خشک ریسه را تشکیل می‌دهند، بر روی دیواره سلولی هیف‌های قارچی متبلور شده و سپس در سطح ریسه و یا در بافت‌های ویژه ذخیره می‌گردند (۲ و ۳). به‌علاوه گلسنگ‌ها از دوران باستان به‌عنوان داروهای طبیعی استفاده می‌شدند. این ارگانیسم‌ها و برخی از ارگانیسم‌های دریایی دیگر از منابع مهم ترکیبات بیولوژیکی فعال هستند (۴). این گلسنگ‌ها حاوی ترکیبات مختلف و متعددی از جمله اسیدهای آلیفاتیک، ترکیبات آروماتیک تک حلقه‌ای، کینون‌ها، دپسیدها، کاروتنوئیدها و ترکیبات بیشمار دیگری هستند که خواص دارویی متفاوتی دارند. آن‌ها مواد مصرفی خود را از محیط اطراف جذب می‌کنند. بنابراین، گلسنگ‌های مناطق مختلف می‌توانند متابولیت‌های ثانویه با خواص دارویی مختلفی داشته باشند. با توجه به مصرف گلسنگ‌ها در طب سنتی در نواحی متعددی از دنیا، شناسایی گلسنگ‌های بومی و بررسی اثرات ضد میکروبی آن‌ها اهمیت خاصی دارد (۵). از طرفی با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی روز افزون میکروارگانیسم‌ها و گرایش عمومی به ترکیبات طبیعی، شناسایی گلسنگ‌ها و بررسی اثرات ضدمیکروبی آن‌ها در سراسر دنیا از اهمیت خاصی برخوردار است. البته به طور معمول در کار با گلسنگ‌ها این پرسش مطرح است که آیا با توجه به کندی رشد آن‌ها، استفاده از خواص آنتی‌باکتریال آن‌ها از نظر صنعتی و اقتصادی امکان پذیر است؟ پاسخ آن است که امروزه مطالعات گسترده ای در راستای کشت گونه‌های مختلف گلسنگ انجام شده و امکان کشت و دوباره سنتز سریع آن‌ها فراهم آورده شده است. در این خصوص یاماتو و کوورکرز[2] موفق به ارائه روشی برای کشت بافت گلسنگ از ریسه رویشی شدند (۶). میلبانک و کرشاو[3] موفق به رشد قطعات ایزیدیای *Peltigera aphthosa* var. *variolosa* بر روی کاغذهای صافی در ارتباط با شن‌های مرطوب شدند (۷). همچنین، گالون و همکاران با الهام از روش Degelins، تکنیکی برای کشت ریسه گلسنگ‌ها ارائه نموده و پنج گونه *Gonohymenia sp.* (به‌ویژه *G. sinaica*) و دو گونه *Heppia sp.* و *Peccania sp.* را روی محیط سیلیکا- ژل کشت کردند (۸). به این ترتیب با غلبه بر مشکل کند رشدی گلسنگ‌ها امکان استفاده آسان آن‌ها در داروسازی فراهم آورده شده است و کار بر روی خواص آنتی باکتریال آن‌ها به صرفه بوده و از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۹). با این‌حال در زمینه شناسایی ترکیبات و خواص ضداین ارگانیسم‌ها در غرب ایران تا کنون کار مؤثری انجام نشده است. به همین علت در این تحقیق، به شناسایی و بررسی خواص ضدباکتریایی چند گونه‌ی بومی گلسنگ پرداخته می‌شود.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری گونه‌های گلسنگ

به منظور جمع‌آوری گونه‌های گلسنگ از کاردک و چاقو استفاده شد. این جمع‌آوری در ماه‌های اردیبهشت تا تیر ۱۳۹۰ از اطراف شهرستان‌های دره‌شهر، دهلران، آبدانان، سراب کلم و تونل رنو شهر ایلام انجام شد. گلسنگ‌ها همراه با بخشی از بستر جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها را طوری برداشته که هم دارای آسکوکارپ (در صورت وجود) و هم دارای لب (در صورت وجود) باشند. زیرا این دو فاکتور در شناسایی بسیار حائز اهمیت می‌باشند. پس از جمع‌آوری گلسنگ‌ها اطلاعات مربوط به گونه‌ها شامل: ارتفاع منطقه، طول و عرض جغرافیایی، مکان و تاریخ جمع‌آوری یادداشت و به آزمایشگاه دانشگاه ایلام انتقال داده شدند. در این مطالعه از سه گونه گلسنگ *Megaspora rimisorediata*، *Fulgencia fulgence* و *Placidium semaforonense* برای بررسی فعالیت ضد میکروبی استفاده شد.

### میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

در این تحقیق، از ۵ گونه باکتری گرم مثبت و گرم منفی که عبارتند از: *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli*، *E. aerogenes*، *Klebsiella pneumonia* و *Pesudomonas aeruginosa* تهیه شده در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام استفاده شد.

### عصاره‌گیری از گلسنگ‌ها

برای تهیه عصاره متانولی و استونی گونه‌های گلسنگ جمع‌آوری شده از سوکسله استفاده شد. به این شکل که پس از شناسایی گلسنگ‌ها، نمونه‌ها در سایه خشک و سپس از بستر جدا شدند. برای هر مرحله عصاره‌گیری از هر گونه مقدار ۵۰ گرم گلسنگ خرد شده و یک لیتر متانول یا استون استفاده شد. عصاره‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون و در دمای ۳۵ درجه قرار گرفتند تا حلال آن‌ها تبخیر و خشک شوند. سپس، عصاره خشک شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای منفی ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (۱۰).

### بررسی خواص ضدباکتریایی

در این مرحله ابتدا غلظت باکتری‌های مورد بررسی به مقدار نیم‌مک‌فارلند کدورت سنجی شد. سپس، باکتری‌ها بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به شکل چمنی کشت داده شدند. به وسیله دی‌متیل سولفوکساید[۴] ۱۰ درصد، رقت‌های ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های متانولی و استونی گلسنگ‌ها تهیه شد. دیسک‌های پیپر بلانک[۵] ۶ میلی‌متری (تهیه شده از شرکت رکین) برای رقت‌های مختلف استفاده شد. دیسک‌ها پس از ۱۰ دقیقه خارج شده و به طور جداگانه در پلیت‌های شیشه‌ای داخل آون ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا حلال آن‌ها بخار و خشک شوند. دیسک‌ها قبل و پس از ترکیب با عصاره‌ها وزن شدند و اختلاف آن‌ها، مقدار عصاره جذب شده در رقت‌های مختلف بود. مقدار عصاره جذب شده توسط هر دیسک به طور میانگین ۰.۸، ۲.۵، ۶، ۱۵ و ۳۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. دیسک‌ها پس از خشک شدن، با سوزن کشت استریل بر روی محیط کشت‌ها قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. در این تحقیق، از آنتی‌بیوتیک‌های متی‌سیلین، کلیندامایسین، استرپتومایسین و آمپی‌سیلین (آنتی‌بیوتیک‌های رایج مصرفی برعلیه باکتری‌های مورد مطالعه) به عنوان کنترل مثبت و به منظور تعیین میزان تأثیر آن‌ها بر باکتری‌ها و مقایسه با اثر عصاره‌ها استفاده شد. همچنین از دی متیل سولفوکساید ۱۰ درصد به عنوان کنترل منفی و به علت

این‌که تأثیری برروی باکتری‌های مورد بررسی ندارد استفاده شد (۱۳). هر آزمایش سه بار تکرار شد.

**تعیین MIC و MBC**

برای گلسنگ‌هایی که دارای اثر ضدباکتریایی بودند، مقدار MIC و MBC تعیین شد. تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC)، با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل و روش براث میکرودیلوشن[۶] طبق دستورالعمل CLSI[۷] انجام شد (۱۲). به هر یک از چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر محیط نوترینت براث و ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده عصاره (۶۳ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس با مقایسه‌ی کدورت چاهک‌های تحت تیمار با چاهک‌های شاهد میزان MIC مشخص شد. بنابراین، نخستین چاهک بدون کدورت به عنوان حداقل غلظت بازدارنده به شکل میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۱۳). حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها با توجه به نتایج MIC تعیین شد. از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها کاملا متوقف شده بود با سوآپ استریل نمونه‌برداری شد. سپس، نمونه‌ها روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، پس از ۲۴ ساعت کم‌ترین غلظتی از عصاره که باکتری‌ها در آن رشد نکرده بودند به عنوان مقادیر MBC گزارش شدند (۱۴). همه این مراحل سه بار تکرار شدند.

**تجزیه و تحلیل آماری داده**

برای تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ استفاده شد. ابتدا از آزمون مقایسه میانگین چند جامعه[۸] (تحلیل واریانس) با فاصله اطمینان ۹۹ درصد استفاده شد. با توجه به این‌که در آزمون تحلیل واریانس بین جوامع مورد مطالعه اختلاف معناداری مشاهده شد. یکی از آزمون‌های پس از تجربه[۹] (دانکن[۱۰]) برای دسته بندی این متغیرها استفاده شد. همچنین، برای توصیف متغیرها از آمار توصیفی مانند میانگین و انحراف معیار استفاده شد.

## نتایج

**اثرضد باکتریایی گلسنگ‌ها**

در این تحقیق، عصاره استونی تمام گلسنگ‌های مورد بررسی، همچنین عصاره متانولی گونه *M. rimisorediata* اثر ضدباکتریایی ندارد. طبق جدول ۱ و ۲ از بین باکتری‌های گرم مثبت، عصاره متانولی *P. semaforonense* بیش‌ترین تأثیر را بر روی استافیلوکوک اپیدرمیس و کم‌ترین تأثیر را بر روی باکتری انتروکوکوس فکالیس و از میان باکتری‌های گرم منفی بیش‌ترین و کم‌ترین تأثیر را به ترتیب بر روی پروتئوس میرابیلیس و کلبسیلا پنومونیه دارد. به‌طورکلی، باکتری سودوموناس آئروژینوزا مقاوم‌ترین باکتری و استافیلوکوک اپیدرمیس حساس‌ترین باکتری است. تحلیل داده‌ها در سطح ۰/۰۱ درصد خطای محاسبه شده برابر ۰/۰۲ را نشان می‌دهد. بنابرین، بین تأثیر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اختلاف معنی داری دیده نمی‌شود (جدول ۱ و ۲). عصاره متانولی *F. fulgence* از بین باکتری‌های گرم منفی تأثیری بر روی باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس ندارد ولی بر روی استافیلوکوک اپیدرمیس، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس تأثیر در خور توجهی نشان می‌دهد. در بین باکتری‌های گرم منفی بیش‌ترین تأثیر بر روی باکتری اشرشیا کلی و کم‌ترین تأثیر بر روی

باکتری انتروباکتر آئروژنز مشاهده می‌شود. در تحلیل آماری داده‌ها در سطح ۰/۰۱ درصد خطای محاسبه شده برابر صفر است. بنابراین، فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی *F. fulgence* بر روی باکتری‌های گرم مثبت به طور معنی داری بیشتر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از تأثیر عصاره متانولی دو گونه گلسنگ بر روی باکتری‌های گرم منفی

| گلسنگ | * | *E. aerogenes* | *K. pneumonia* | *E. coli* | *P. aeruginase* |
|---|---|---|---|---|---|
| *F. fulgence* | ۳۶/۲ | ۱۴ | ۱۹ | ۲۱ | ۱۹ |
| | ۱۵ | ۹/۶۷ | ۱۲/۶۷ | ۱۲/۳۳ | ۱۳/۳۳ |
| | ۶/۵ | ۶/۳۳ | ۹/۶۷ | ۹/۳۳ | ۹/۶۷ |
| | ۲/۵ | ۷ | ۷ | ۷/۳۳ | ۷/۳۳ |
| *P. semaforonense* | ۳۷/۳ | ۱۴/۳۳ | ۱۱/۳۳ | ۱۴/۳۳ | ۶ |
| | ۱۴/۸ | ۱۲/۶۷ | ۹ | ۱۲/۳۳ | ۶ |
| | ۶ | ۱۰/۳۳ | ۷/۶۷ | ۹ | ۶ |
| | ۲/۵ | ۷/۶۷ | ۷ | ۷ | ۶ |

* مقدار عصاره جذب شده توسط دیسک‌ها در غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از تأثیر عصاره متانولی دو گونه گلسنگ بر روی باکتری‌های گرم مثبت

| گونه | * | *S. aureus* | *E. paecalis* | *B. cereus* | *S. epidermidis* |
|---|---|---|---|---|---|
| *F. fulgence* | ۳۶/۲ | ۳۲/۲۳ | ۶ | ۲۳ | ۲۴/۳۳ |
| | ۱۵ | ۲۵ | ۶ | ۱۷/۳ | ۱۵ |
| | ۶/۵ | ۱۹ | ۶ | ۱۲ | ۱۰ |
| | ۲/۵ | ۱۱/۶۷ | ۶ | ۸ | ۷/۳۳ |
| *P semaforonense* | ۳۷/۳ | ۱۵/۶۷ | ۱۵/۳۳ | ۱۵ | ۱۸/۳۳ |
| | ۱۴/۸ | ۱۲/۳۳ | ۱۰/۳۳ | ۱۲/۳ | ۱۵ |
| | ۶ | ۱۰ | ۷/۶۷ | ۹/۳۳ | ۱۱/۶۷ |
| | ۲/۵ | ۷ | ۷ | ۸ | ۸ |

* مقدار عصاره جذب شده توسط دیسک‌ها در غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

**مقدار MIC و MBC**

طبق جدول ۳ عصاره متانولی *F. fulgence* در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریسدال (کشندگی) بر روی باکتری استافیلوکوک ارئوس دارد. این عصاره بر روی انتروکوک آئروژنز اثر در خور توجهی نداشته ولی بر سایر باکتری‌ها اثر باکتریواستاتیک (بازدارنده رشد) دارد. عصاره متانولی *P. semaforonense* بیش‌ترین اثر را بر روی باکتری استافیلوکوک اپیدرمیس دارد به طوری که در غظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر بازدارندگی و در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی مشاهده می‌شود.

جدول ۳- مقادیر MBC و MIC (بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره متانولی دو گونه گلسنگ بر علیه باکتری‌های مورد بررسی

| گلسنگ / باکتری | *P semaforonense* | | *F. fulgence* | |
|---|---|---|---|---|
| | MBC | MIC | MBC | MIC |
| *S. aureus* | ۱۰۰۰ | ۵۰۰ | ۲۵۰ | ۲۵۰ |
| *E. paecalis* | ۱۰۰۰ | ۵۰۰ | n | n |
| *B. cereus* | ۱۰۰۰ | ۱۰۰۰ | ۵۰۰ | ۵۰۰ |
| *S. epidermidis* | ۵۰۰ | ۲۵۰ | ۵۰۰ | ۵۰۰ |
| *P. aeruginase* | n | n* | ۵۰۰ | ۵۰۰ |
| *E. coli* | ۱۰۰۰ | ۵۰۰ | ۵۰۰ | ۵۰۰ |
| *K. pneumonia* | n | n | ۱۰۰۰ | ۵۰۰ |
| *E. aerogenes* | ۱۰۰۰ | ۱۰۰۰ | ۱۰۰۰ | ۱۰۰۰ |

*n عدم تاثیر عصاره روی باکتری

**اثر کنترل‌های مثبت و منفی بر روی باکتری‌ها**

برای مشخص نمودن تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها و DMSO (به ترتیب به عنوان کنترل‌های مثبت و منفی) از روش دیسک انتشار استفاده شد زیرا ۱- این روش نسبت به روش چاهک روشی مناسبتر برای سنجش آنتی بیوگرام است. ۲- دقت عمل بیشتری نسبت به روش چاهک دارد و ۳- رقت دیسک‌ها مشخص می‌باشد و نیازی به رقت‌سازی ندارد. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در جدول ۴ آمده است. کنترل منفی بر روی باکتری‌ها هیچ اثری ندارد.

جدول ۴- میانگین قطر هاله‌های عدم رشد و انحراف معیار (بر حسب میلی‌متر) ، حاصل از تاثیر کنترل‌های مثبت و منفی بر روی ۶ باکتری مورد آزمایش

| باکتری‌ها | Gentamycin | Sterptomycin | Clindamycin | Methicillin | DMSO |
|---|---|---|---|---|---|
| *S. aureus* | ۲۳±۰/۵۷ | ۱۲/۳۳±۰/۵۷ | ۹/۶۶±۰/۵۷ | ۶* ±۰ | ۶ ±۰ |
| *B. cereus* | ۲۵/۳۳±۰/۵۷ | ۱۵/۶۷±۰/۵۷ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ |
| *E. coli* | ۱۹/۶۶±۰/۵۷ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ |
| *K. pneumonia* | ۱۹/۳۳±۰/۵۷ | ۱۴/۳۳±۰/۵۷ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ |
| *E. aerogenes* | ۲۲/۳۳±۰/۵۷ | ۱۶/۳۳±۰/۵۷ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ |
| *P. aeruginosa* | ۱۴/۳۳±۰/۵۷ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ | ۶ ±۰ |
| *p-value*** | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۱ | ۱ | ۱ |

*قطر ۶ میلی‌متر برابر قطر دیسک است. DMSO: دی‌متیل‌سولفوکساید.

**مقدار خطای محاسبه شده در سطح ۰/۰۱ اندازه‌گیری شد. مقدار خطای محاسبه شده کوچکتر یا مساوی ۰/۰۱ معنی‌دار است و بزرگتر از ۰/۰۱ معنی‌دار نیست.

## بحث و نتیجه‌گیری

باتوجه به آن‌که امروزه بخش عظیمی از باکتری‌ها نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند و این مقاومت دارویی یکی از مشکلات بزرگ در حوزه درمان است، نیاز روز افزونی برای دستیابی به ترکیبات طبیعی مناسبتر احساس می‌شود (۱۵). از طرفی گلسنگ‌ها همانند بیشتر گیاهان، از دوران باستان به‌عنوان داروهای طبیعی استفاده می‌شوند. به‌طورکلی گلسنگ‌ها و برخی ارگانیسم‌های دریایی از منابع مهم ترکیبات بیولوژیکی فعال هستند. همچنین، بسیاری از متابولیت‌های گلسنگی مانند دی‌ترپن‌ها، تری‌ترپن‌ها، دی‌بنزوفوران‌ها، دی‌بنزوپیرانون‌ها، دپسیدها، دپسیدون‌ها، آنتراکوئینون‌ها، گزانتون، اسنیک اسید و پلوینیک اسید دارای فعالیت‌های زیستی آنتی‌مایکوباکتریایی، آنتی‌ویروسی، آنتی‌اکسیدانی، مسکنی، سیتوتوکسیکی، آنتی‌میکروبی، ضدقارچی و به عنوان بازدارنده آنزیمی و فتوسیستمی عمل می‌کنند. وجود مشتقات فنلی در گلسنگ‌ها نشان دهنده فعالیت آنتی‌میکروبی آن‌ها است. این مواد باعث اسیدی شدن سلول باکتری، به ترتیب تخریب غشاء سیتوپلاسم، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و اختلال انتقال الکترون و فسفریلاسیون اکسیداتیومی‌شوند (۱۶). با توجه به نتایج به‌دست آمده از بررسی حاضر می‌توان نتیجه گرفت که عصاره متانولی مؤثرتر از عصاره استونی است. عصاره استونی بر روی باکتری‌های مورد بررسی تأثیر ندارد. بنابراین، متانول حلال بهتری برای استخراج متابولیت‌های گلسنگ است که علت این امر می‌تواند مربوط به پیوند هیدروژنی بیشتر در ساختار الکل‌ها نسبت به کتون‌ها باشد.

از بین باکتری‌های گرم مثبت مقاوم‌ترین باکتری‌ها سالمونلا تیفی و پروتئوس میرابیلیس می‌باشند. چنانچه عصاره متانولی گونه‌های *F. fulgens* و *C. Cristatum* تأثیری بر روی باکتری‌های مذکورندرد وتنها عصاره متانولی گونه *P. semaforonense* بر این باکتری‌ها اثر دارد. همچنین، حساس‌ترین باکتری‌ها به عصاره متانولی گلسنگ‌ها در بین باکتری‌های گرم منفی گونه‌ی اشرشیا کلی و در بین باکتری‌های گرم مثبت گونه استافیلوکوک ارئوس شناخته شده است. به طور کلی تأثیر گلسنگ‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است که این می‌تواند به علت

اختلاف ساختار و مواد تشکیل دهنده‌ی دیواره باکتری‌های گرم مثبت با گرم منفی باشد (۱۷). دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی بیشتر از لیپوپلی‌ساکاریدها تشکیل شده است که از تجمع ترکیبات در غشای سلولی باکتری ممانعت بعمل می‌آورد. به همین علت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسترند (۱۸). نتایج این تحقیق تاثیر ضد باکتریایی *F. Fulgence* را اثبات می‌کند. بنابراین، عصاره متانولی این گونه می‌تواند جایگزین خوبی برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی برای درمان بیماری‌های حاصل از سویه‌های باکتریایی که شکل مقاومتی آن‌ها تغییر کرده است باشد. این یافته‌ها می‌تواند زمینه تحقیقات بیشتری را در آینده برای شناسایی، تعیین مقدار و تخلیص ترکیبات مؤثره گلسنگ‌ها در شرایط *In Vivo* فراهم نماید.

**تشکر و سپاسگزاری**

در پایان محققان بر خود لازم می‌دانند که از مسئولان دانشکده کشاورزی و پیرادامپزشکی که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، تشکر و قدردانی نمایند.

## References

(1) Temina M, Levitsky DO, Dembitsky VM. Chemical Constituents of the Epiphytic and Lithophilic Lichens of the Genus *Collema*. *Rec. Nat. Prod* 2010; 4 (1): 79-86.

(2) Huneck S, Schreiber K, Steglich W. Flechteninhaltsstoffe-XCVIII. Struktur des Aspicilins. *Tetrahedron* 1973; 29 (22): 3687-93.

(3) Kirmizigul S, Koz O, Anil H, Icli S. Isolation and structure elucidation of novel natural products from Turkish Lichen. *Turk. J. Chem* 2003; 27 (4) : 493-500.

(4) Celiktas OY, Hames Kocabas EE, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food. Chem* 2007; 100 (11) : 553-9.

(5) Molnara K, Farkasb E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites. *Nat. Forsch. J* 2010; 65 (6): 157-73.

(6) Volcu D, Brezeanu A. In vitro reactivity of *usnea barbata* mott.Rom. *J. boil-Plant Boil* 2008; 53 (2) :83-90.

(7) Milbank JW, Kershaw KA. Nitrogen metabolism in lichen nitrogen fixation by internal cephalodia of *pulmonaria*. *New Phytol* 1970; 69: 595-97.

(8) Margalith G, Kela M, Leah B. A method for the culture of lichen thalli under controlled conditions. *Archiv für Mikrobiologie* 1972; 83 (3) : 189-92.

(9) Bonnier G. Recherches sur la synthese ds lichens annalesdes science naturelles. *Botanique* 1896: 1-3.

(10) Martino E, Ramaiola I, Urbano M, Bracco F, Collin S. Microwave-Assisted Extraction of Coumarin and Related Compounds from *Melilotus Officinalis* (L) Pallas as an Alternative to Soxhlet and Ultrasound-Assisted Extraction. *J. Chromatogr.* A 2006; 1125 (25) : 147-51.

(11) Barnes J. Pharmacognosy in the 21 st century. *Pharm. J* 2000; 264 (2) : 701-3.

(12) Mahon CR, Manoselis G. *Textbook of Diagostic Microbiology*. 2nd ed. W. B Saunders Company; 2000.

(13) Sandri IG, Zacaria J, Fracaro F, Delaare APL, Echeverrigaray S. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Culina* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food. Chem. J* 2007; 103 (9) : 823-8.

(14) Androw JM. BSAC Standardized disc susceptibility testing method. *J. Antimicrobial. Chem* 2001; 7 (5) : 48-57.

(15) Stewart RS, William CJ. Antibiotic resistance of bacteria in biofilm. *Lancet* 2001; 358: 135-8.

(16) Elix JA. *Biochemistry and secondary metabolites. In: Lichen Biology*. Nash III T. H ed. Cambridge University Press; Cambridge: 1996.

(17) Kosanic M, Rankovic B. Screening of antimicrobial activity of some lichen species in vitro. *Kragujevac J. Sci* 2010; 32: 65-72.

(18) Sanez MT, Garcia MD, Rowe JG. Antibicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of spain. *Fitoterapia* 2006; 77: 156-62.

---

[1]. Lichen acids
[2]. Yamamato & Coworkerz
[3]. Milbank & Kershaw
[4]. *Dimethyl sulfoxide*
[5]. Blank paper discs
[6]. *Broth microdilution*
[7]. *Clinical and Laboratory Standards Institute.*
[8]. ANOVA
[9]. Post Hoc
[10]. Duncan

# An investigation of antibacterial effect of methanol and acetone extracts in some lichens in Ilam

**Tahereh Valadbeigi***
Associate Professor of Biology- Lichenology, Ilam University, Iran, tvaladbigi@yahoo.com
**Hosein Moradi**
MS.c of Microbiology, Ilam University, Iran, mrd.hosein@gmail.com

## Abstract

**Introduction:** With respect to the usefulness of lichens in the traditional medicine in different parts of the world, identification of lichens and studying their antimicrobial effects are of particular importance.

**Materials and methods:** After collecting lichen samples, the methanol extracts were prepared and the effects of dilutions extracts on six pathogenic bacteria to method disc diffusion and the antibiotic Methicillin, Clindamycin, Sterptomycin and Ampicillin were compared to a positive control. Then, the MIC and MBC were determined.

**Results:** Diameter investigation showed that acetone extract of the lichen on the bacteria did not have any affect. Methanol extracts of lichens *Fulgensia fulgens* (Sw.) Elenkin had significant antibacterial activity.

**Discussion and conclusion:** Among the lichens we studied, only *Fulgensia fulgens* had. Therefore, the methanol extracts of *Fulgensia fulgens* could have antibacterial effects in the treatment of bacterial infections and thus could be replaced by chemical drugs.

**Key words:** Antibacterial, Methanol extract, Lichen, Ilam

* Corresponding Author
**Received:** September 15, 2012/ **Accepted:** May 8, 2013