مجله دانش نوین
کشاورزی پایدار
جلد ۱۰ شماره ۱
صفحات ۵۰-۴۱

خاصیت ضدباکتریایی عصاره متانولی چهار گونه گلسنگ بومی ایران

سلیمان جمشیدی*
دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه
باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان
میانه، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
s.jamshidi@m-iau.ac.ir
(مسؤل مکاتبات)

سیده مریم شهیدی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه
باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان
میانه،ایران
نشانی الکترونیک ✉:
maryam_shahidy@yahoo.com

محمد سهرابی
استادیار سازمان پژوهش‌های
علمی و صنعتی ایران
تهران، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
mycolich@yahoo.com

سمیرا جمشیدی
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد میانه
میانه، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
samira.j232@yahoo.com

چکیده گلسنگ‌ها به عنوان یکی از منابع سرشار از ترکیبات طبیعی با خاصیت آنتی‌بیوتیک شناخته شده اند که از برخی از آنها به عنوان دارو و برای درمان بیماری‌های خاص استفاده می‌شود. در این پژوهش اثر بازدارندگی، باکتری‌ایستایی و کشندگی عصاره متانولی چهار گونه گلسنگ جمع‌آوری شده از منطقه ارسباران، آذربایجان شرقی شامل *Pleopsidium gobiensis*، *Parmelina tiliacea*، *Anaptychia setifera* و *Lecanora argopholis* روی چند گونه باکتری گیاهی از جمله *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescens*، *Enterobacter* sp. در آزمایشگاه با روش دیسک‌گذاری و تعیین حداقل غلظت بازدارنده و کشنده مورد بررسی قرار گرفت. در روش نشر در آگار، عصاره‌های متانولی گلسنگ‌های مورد بررسی اثر بازدارنده قابل توجهی بر رشد باکتری‌ها به جز *Enterobacter* sp. داشتند. عصاره‌های گلسنگ *A. setifera* از بازدارندگی کمتری در مقایسه با سایرین بر رشد باکتری‌های مورد مطالعه داشت. عصاره متانولی همه گلسنگ‌ها کم و بیش بر باکتری‌های مورد مطالعه اثر بازدارنده و کشنده داشتند. گلسنگ‌های *P. gobiensis* و *P. tiliacea* اثر باکتری‌ایستایی و نیز کشندگی بسیار بیشتری در مقایسه با دو گلسنگ دیگر نشان دادند. عصاره‌های گلسنگی برابر *B. subtilis* بیشتر خاصیت بازدارندگی داشتند. در روش حداقل غلظت باکتری‌ایستایی و کشندگی، واکنش باکتری‌کشی و باکتری‌ایستایی *Enterobacter* sp. از دو باکتری دیگر به عصاره‌های گلسنگی بیشتر بود. با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد عصاره‌های گلسنگی از کارآیی قابل ملاحظه‌ای برای مقابله باکتری‌های گیاهی مورد مطالعه برخوردارند.

شناسه مقاله:
نوع مقاله: **پژوهشی**
تاریخ پژوهش: **۱۳۹۱**
تاریخ دریافت: **۹۲/۰۷/۰۳**
تاریخ پذیرش: **۹۳/۰۲/۲۵**

واژه‌های کلیدی:
- **مهار زیستی**
- **فعالیت ضدباکتریایی**
- **ترکیبات طبیعی**
- **ضدمیکروب**
- **باکتری‌ایستایی**
- **باکتری‌کشی**

مقدمه گلسنگ‌ها زیست‌بوم‌های کوچکی هستند که شامل دو موجود همزیست قارچی و جلبکی می‌باشند. این موجودات از مهمترین منابع منحصر به فرد شناخته‌شده‌ای هستند که دارای تولیدات طبیعی شامل مواد بیوشیمیایی مختلف مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدها، ترکیبات فنلی و رنگدانه‌ها با خواص دارویی و ضد میکروبی هستند.[۱،۹] بخش قارچی گلسنگ‌ها، قادر است انواع مختلفی از ترکیبات آلی و بیوشیمیایی را تولید نمایند که اغلب ارزش چندانی در تأمین انرژی لازم برای بقا و ساخت اجزای سلولی گلسنگ‌ها ندارد و تولیدات ثانویه و حدواسطی به شمار می‌روند که به طور مستقیم یا غیرمستقیم در سوخت و ساز سلولی مؤثرند.[۱۵،۲۶] این ترکیبات به لحاظ دارا بودن خاصیت آنتی‌بیوتیک، مسؤول حفاظت گلسنگ در مقابل حمله‌ی باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشند که از این خاصیت علیه عوامل بیماریزا استفاده می‌گردد.[۶،۲۶] ترکیبات متعدد آلی در گونه‌های مختلف گلسنگ‌ها وجود دارد که برای موجوداتی مثل باکتری‌ها و قارچ‌ها سمی بوده و سبب کشندگی یا بازدارندگی رشد آنها می‌گردد.[۲۰] مطالعه روی آنتی‌بیوتیک‌های استخراج شده از گلسنگ‌ها توسط *بورک‌هولدر و همکاران (۱۹۹۴)* آغاز شد.[۷] از آن زمان تا به امروز آنتی‌بیوتیک‌های بی‌نظیری از گلسنگ‌ها کشف شده که روی باکتری‌ها و قارچ‌ها مؤثر بوده‌اند.[۱،۲،۷] حدود ۸۰۰ ترکیب ثانویه از گلسنگ‌های قارچی کشف شده که در نوع خود منحصربه فرد می‌باشند و خاصیت ضدباکتریایی دارند [۱۲،۱۴] آنتراگونیون‌های[1] جدا شده از گلسنگ‌ها دارای خواص ضدمیکروبی مقابل باکتری‌هایی نظیر *Bacillus brevis*، *Bacillus subtilis*، *Arthrobacter citrus*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas fluorencess* و *Stereptomyces* sp. گزارش شده‌اند.[۳] تأثیر ضدباکتریایی عصاره گلسنگ *Ramalina farinocea* به ویژه عصاره‌های اتیل الکل، کلروفرم، ان-هگزان برابر باکتری‌های مختلف از جمله باکتری‌های *S. aureus*، *B. subtilis*، *E. coli*، *S. typhi*، *P. aeruginos* گزارش شده است.[۱۰] همچنین، عصاره‌های استونی، دی‌اتیل‌اتری و اتانولی گلسنگ *Cetraria aculeate* مقابل ۱۲ باکتری از جمله *E. coli*، *Streptococcus faecalis*، *Staphylococcus aureus*، *Aeromona shydrophila*، *Proteus vulgaris*، *B. cereus*، *B. subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Listeria monocytogenes* بررسی و اثبات شده است.[۱۶] ترکیبات استخراج شده از عصاره متانولی گلسنگ *Ramalina terbrata* از قبیل اوسنیک اسید[2]، اوسمین[3] و رامالین[4]، مقابل باکتری *B. subtilis* با حداقل غلظت بازدارنده ۲۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای خاصیت ضدباکتریایی بود و عصاره خام و اوسنیک اسید در مقابل باکتری *Phylococcus aureus* خاصیت ضدباکتریایی داشت.[۱۷] همچنین، عصاره استونی، متانولی و آبی گلسنگ‌های *Lecanora frustulosa*، *Parmeliopsis hyperopta* و ترکیبات زئورین[5] و دیواریکاتیک اسید[6] آنها مقابل باکتری‌های *Bacillus mycoides*، *B. subtilis*، *S. aureuss*، *E. cloaceae*، *E. coli*، *K. neumonia* بررسی کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارنده ۰/۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مقابل باکتری‌ها گزارش شده است. در این بررسی، عصاره‌های استونی و متانولی گلسنگ‌های مورد مطالعه تأثیر زیادی مقابل باکتری‌ها داشت در حالی که عصاره آبی هیچ گونه خاصیتی در بازدارندگی از رشد آنها نشان نداد.[۱۳] در مطالعه‌ای اثر ضدباکتریایی عصاره استونی، متانولی و آبی گلسنگ‌های *Laconora frustulosa* و *Parmeliopsis hyperopta* علیه باکتری‌های *S. aureus*، *B. mycoides*، *E. coli*، *K. pneumonia* و *B. subtilis* بررسی

[1] antherquanone
[2] usnic acid
[3] usnic
[4] ramalin
[5] zeorin
[6] divaricatic acid

و عصاره‌های استونی و متانولی به دست آمده از گلسنگ‌ها فعالیت ضدمیکروبی نسبتاً قوی به جز روی *E. coli* نشان داده‌اند.[۱۸] بررسی فعالیت ضدباکتری عصاره‌های متانولی، اتانولی، کلروفرمی و آبی گلسنگ *Parmotrema ailgherrense* مقابل باکتری‌های بیماریزای گیاهی و انسانی از جمله *B. subtilis*، *Erwinia chrysanthemi*، *E. coli*، *Rhizobium tumefaciens* و *Xanthomonas phaseoli* نشان داد که تمام عصاره‌های گلسنگ مذکور مقابل باکتری‌های مورد مطالعه دارای خاصیت ضدباکتریایی می‌باشند.[۲۱] فعالیت ضدمیکروبی گلسنگ *Parmelia perlata* روی باکتری‌های بیماریزای گیاهی مثل *Clavibacter michiganensis* و *Ralstonia solanacearum* و قارچ *Fusarium oxysporum* و *Rhizopus nigricans* گزارش شده است.[۲۵] بررسی اثر عصاره‌های کلروفورمی، استونی، دی‌اتیل‌اتری و متانولی گلسنگ‌های *Pleopsidium gobiensis*، *Parmelina tiliacea*، *Anaptychia setifera* و *Lecanora argopholis* روی باکتری‌های پوسیدگی نرم سیب زمینی نشان داد که باکتری *Pectobacterium cartovorum* pv. *cartovorum* به این ترکیبات حساس و *R. solanacearum* مقاوم است.[۲۲] عصاره متانولی گلسنگ *R. sinensis* در مقابل باکتری *P. caratovorum* pv. *caratovorum* با ایجاد هاله بازدارنده ۱۶/۶ میلی‌متری و حداقل غلظت بازدارنده و کشنده به ترتیب ۲/۱۹ و ۴/۳۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، مؤثرترین تیمار گلسنگی بود که اثر آن حتی از تتراسایکلین و استرپتومایسین نیز بهتر بود.[۲۳] در مجموع، گلسنگ‌های *P. tiliacea* و *R. sinensis* بیشترین اثر بازدارندگی را بر رشد باکتری‌های مورد مطالعه داشتند.[۲۴] همچنین، بررسی اثر عصاره‌های استونی، متانولی و کلروفورمی پنج گونه گلسنگ شامل *Ramalina capitata*، *Xanthoparmelia stenophylla*، *Umbilicaria cylindrica* و *Rhizoplaca crysoleuca* جمع‌آوری شده از مشگین شهر و *Anamylopsora pulcherrima* از داران جلفا، نشان داد که این گلسنگ‌ها روی گونه‌های *Fusarium* عامل پوسیدگی خشک سیب زمینی بی اثر ولی روی باکتری *P. caratovorum* pv. *caratovorum* مؤثر بودند.[۱۱]

هدف این پژوهش تعیین اثر بازدارندگی عصاره متانولی چهار گونه گلسنگ بومی شمال غرب ایران روی سه گونه باکتری گیاهی در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گلسنگ و عصاره‌گیری

نمونه‌های گلسنگی در اردیبهشت سال ۱۳۹۱ از منطقه ارسباران آذربایجان شرقی جمع‌آوری و درون پاکت‌های کاغذی پس از درج مشخصات نمونه، به آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه منتقل گردید (جدول ۱). گلسنگ‌ها با آب مقطر سترون داخل الک‌های معمولی شسته شده و به مدت ۱۳ روز در تاریکی و دمای معمولی آزمایشگاه روی روزنامه پهن شدند تا رطوبت آنها گرفته شود. سپس گلسنگ‌ها به قطعات کوچک خرد و با استفاده از آسیاب برقی (Moulinex Co., France) پودر شدند. عصاره‌گیری با استفاده از حلال متانول (Merck Co., Germany) با دستگاه سوکسله انجام شد، به این ترتیب که ۱۰ گرم از پودر هر یک از گلسنگ‌ها داخل یک کاغذ صافی که به صورت مخروط ته بسته درست شده بود، ریخته شده و به مخزن سوکسله انتقال و ۲۵۰ میلی لیتر متانول در بالن ریخته شد. حلال در اثر حرارت بخار و پس از تبرید روی نمونه ریخته شد. این عمل به مدت ۵ ساعت ادامه یافته و عصاره غلیظ گلسنگ‌ها به دست آمد. برای جدا شدن حلال از عصاره از دستگاه روتاری به همراه پمپ خلاء (Laboratoa 4010 Digital, Heidolph Co., Germany) استفاده شد. عصاره داخل بالن خشک و سترون دستگاه روتاری ریخته شده و در دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سلسیوس تحت خلاء قرار گرفت. به این ترتیب حلال از عصاره

جدول ۱- اسامی، نوع بستر و مشخصات جغرافیایی گلسنگ‌های مورد مطالعه

Table 1. Collected lichens geographic characteristics and their substrates

Lichen	acronym	substrate	region name	longitude	latitude	altitude (m)
Parmelina tiliacea	*Pa*	rock	Kolale	46° 61' 15" E	38° 88' 77" N	960
Anaptychia setifera	*As*	tree	Kolale	46° 61' 15" E	38° 87' 05" N	1350
Lecanora argopholis	*La*	rock	Kordasht	46° 36' 75" E	38° 90' 88" N	502
Pleopsidium gobiensis	*Pg*	rock	Kordasht	46° 36' 75" E	38° 90' 88" N	502

خشک جدا شده و عصاره غلیظ به دست آمده و در دمای ۴ درجه سلسیوس تا انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی نگهداری شد.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

باکتری‌های *Bacillus subtilis* (*Bs*)،*Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) و *Enterobacter* sp. (*E*) جدا شده از برگ گیاه صبر زرد از مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور دریافت و به محیط کشت آگار مغذی منتقل و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد.

آزمون نشر در آگار

برای انجام آزمون ضدباکتریایی از محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck Co. Germany) استفاده شد که برای تهیه آن، ۳۴ گرم از محیط کشت را در ۱ لیتر آب حل و اتوکلاو (۱۰ دقیقه، ۱۲۱ درجه سلسیوس) گردید و بعد از ریختن محیط کشت، تشتک‌های پتری در زیر هود قرار داده شد تا محیط کشت کاملاً بسته شود. اینوکولوم اولیه از باکتری‌های مورد بررسی تهیه و بعد از خالص سازی باکتری، یک تک کلون باکتری به وسیله سوزن سترون برداشته و در سرم فیزیولوژی سترون حل شد. سوسپانسیون باکتری با رقت ۱۰۹-۱۰۷ سلول باکتری در میلی لیتر به روش مقایسه با محیط استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری روی محیط منعقد شده ریخته و به وسیله پیپت پاستور سترون، به طور کامل روی محیط پخش شد و برای مدت ۲۵-۲۰ دقیقه بدون در زیر هود سترون قرار گرفت تا محیط کاملاً خشک شود. مقدار ۳۵ میلی‌گرم از عصاره غلیظ گلسنگ در ۱۰۰۰ میکرولیتر حلال خنثی دی متیل سولفوکسید حل و با استفاده از سرنگ فیلتر ۰/۲۲ میکرون سترون شد. به این ترتیب غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گلسنگ به دست آمد. روی هرکدام از دیسک‌ها مقدار ۱۵ میکرولیتر از عصاره گلسنگ‌ها ریخته شد و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به صورت آماده ساخت شرکت پادتن طب به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. همچنین برای شاهد منفی نیز مقدار ۱۵ میکرولیتر از حلال دی‌متیل‌سولفوکسید به دیسک‌ها اضافه شد. دیسک‌های فوق روی تشتک‌های پتری سترون شده برای مدت ۱۰ دقیقه در زیر هود قرار گرفت تا کاملاً خشک شوند، سپس در فاصله معین و در سه تکرار روی محیط کشت قرار داده شدند. تشتک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس داخل انکوباتور قرار داده شد و قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد[1] و کشنده[2]

در آزمون حداقل غلظت بازدارنده رشد و کشنده از محیط کشت مولر هینتون براث[3] (۲۱ گرم در لیتر) استفاده شد. برای تهیه غلظت اولیه عصاره گلسنگ از ۸۰ میلی‌گرم عصاره خشک در ۱۰۰۰ میکرولیتر حلال دی متیل سولفوکسید استفاده شد. در این بخش از نه لوله آزمایش

[1] minimal Inhibitive concentration (MIC)
[2] minimal bactericide concentration (MBC)
[3] Muller-Hinton broth

حاوی ۱۰۰۰ میکرولیتر از محیط کشت استفاده شد. یکی از لوله‌های آزمایش به عنوان شاهد مثبت حاوی فقط محیط کشت و باکتری و لوله آزمایش دیگر به عنوان شاهد منفی حاوی فقط محیط کشت انتخاب شد. هفت لوله آزمایش باقی مانده از شماره ۱ تا ۷ شماره گذاری گردید. در داخل لوله شماره ۱، ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره گلسنگ با غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ریخته شد، به وسیله شیکر لوله به مدت یک دقیقه یکنواخت شد. از لوله آزمایش شماره ۱، مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از مخلوط یکنواخت به وسیله سمپلر برداشته شده و داخل لوله شماره ۲ ریخته شد و این کار تا لوله شماره ۷ تکرار شد و از لوله شماره ۷، ۱۰۰۰ میکرولیتر از مخلوط یکنواخت محیط کشت مایع و عصاره گلسنگ برداشته و به بیرون انتقال گردید بدین ترتیب غلظت‌های ۴۵، ۲۲/۵، ۱۱/۲۵، ۵/۶۲، ۲/۸، ۱/۴ و ۰/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های گلسنگی به دست آمد. سپس از سوسپانسیون باکتری تهیه شده مقدار ۲۰ میکرولیتر برداشته و داخل تمام لوله‌ها به جز لوله شاهد منفی ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری و سپس رشد یا عدم رشد باکتری‌ها به‌صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت. مرز رقت بدون هیچ رشد قابل رؤیت به عنوان حداقل غلظت بازدارنده از رشد در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشنده، از محلول یکنواخت لوله‌های سری ۱۰ میکرولیتر برداشته و به محیط کشت جامد مولر هینتون آگار انتقال داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. کمترین رقت که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشنده در نظر گرفته شد. آزمایش نشر در آگار شامل سه آزمون برای هر باکتری با چهار گونه گلسنگ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ver. 16 تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

نتایج

تیمارهای مورد بررسی شامل عصاره متانولی چهار گونه گلسنگ، استرپتومایسین و شاهد از لحاظ بازدارندگی رشد بر هر سه باکتری مورد مطالعه در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری با هم نشان دادند (جدول ۲). عصاره‌های متانولی هیچ یک از گلسنگ‌های مورد بررسی از لحاظ آماری و عددی نتوانستند با آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین که به عنوان شاهد مثبت استفاده شده بود، از نظر اثر بازدارنده رشد بر باکتری‌های مورد مطالعه رقابت کنند. در کل، باکتری *E* حساسیت زیادی به عصاره‌های گلسنگی نشان نداد ولی دو باکتری *Pf* و *Bs* به اکثر عصاره‌های گلسنگی حساس بودند. گلسنگ *As* اثر زیادی در بازدارندگی باکتری‌ها در مقایسه با سایر گلسنگ‌ها نشان نداد. حساس‌ترین باکتری از لحاظ بازدارندگی رشد به عصاره‌های گلسنگ، باکتری *Pf* بود و به ویژه در مقابل عصاره گلسنگ‌های *Pt* و *La* بیشترین بازدارندگی از رشد آن مشاهده گردید. این باکتری به تمام عصاره‌های گلسنگی حساسیت نشان داد ولی این حساسیت به گلسنگ

جدول ۲- تجزیه واریانس قطر هاله بازدارنده ایجاد شده در پرگنه باکتری‌های مورد مطالعه در اثر عصاره اتانولی چندگلسنگ

Table 2 - Variance analysis of inhibition zone diameter in studied bacteria colonies by lichens ethanol extracts

Source of variation	df	Mean of squares		
		Enterobacter sp.	*Pseudomonas fluorescens*	*Bacillus subtilis*
Treatment	5	83.575**	315.547**	122.084**
Experimental error	12	0.04	0.194	0.222
Total	17			

** تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪

** Significant difference at 1% level

جدول ۳- مقایسه میانگین قطر هاله بازدارنده پرگنه باکتری‌های مورد مطالعه در اثر عصاره متانولی گلسنگ‌های مختلف

Table 3 - Inhibition zone diameter caused by some lichens treatment application in studied bacteria's colony

Lichens	inhibition zone diameter (mm)		
	Enterobacter sp.	*Pseudomonas fluorescens*	*Bacillus subtilis*
P. gobiensis	7.83[b]	14.83[d]	15.66[b]
A. setifera	7.16[c]	8.33[e]	6.4[e]
L. argopholis	6.4[d]	24.66[c]	8.66[d]
P. tiliacea	8.16[b]	25.66[b]	13.66[c]
streptomycin	20[a]	31.66[a]	22.66[a]
control	6.4[d]	6.4[f]	6.4[e]

میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

The columns with common letters in labels had no significant difference.

As در حداقل بود. گلسنگ *Pt* روی هر سه باکتری به ویژه *Pf* اثر بازدارنده بر رشد داشت. بازدارنده‌ترین عصاره گلسنگی در مقابل باکتری *Bs* گلسنگ *Pg* بود. تنها عصاره‌های گلسنگی بی‌اثر بر باکتری *E*، *La* و روی باکتری *Bs* مربوط به گلسنگ

جدول ۴- حداقل غلظت بازدارنده از رشد و کشنده عصاره متانولی چند گلسنگ روی باکتری‌های مورد مطالعه

Table 4 – Minimal inhibitory and bactericide concentrations of some lichens methanol extract on studied bacteria

Bacterium	Lichen	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC
Enterobacter sp.	*P. gobiensis*	5.62	11.25	2
	A. setifera	11.25	45	4
	L. argopholis	11.25	45	4
	P. tiliacea	5.62	11.25	2
P. fleurcens	*P. gobiensis*	2.8	5.62	2
	A. setifera	2.8	5.62	2
	L. argopholis	5.62	11.25	2
	P. tiliacea	0.7	2.8	4
B. subtilis	*P. gobiensis*	0.7	2.8	4
	A. setifera	5.62	22.5	4
	L. argopholis	5.62	45	8
	P. tiliacea	0.7	2.8	4

As بود. اثر بازدارنده عصاره‌های گلسنگی روی باکتری *E* حدود یک سوم اثر استرپتومایسین بود. مؤثرترین تیمار شامل اثر گلسنگ *Pt* بر باکتری *Pf* بود که هاله بازدارنده ایجاد شده، تنها ۶ میلی‌متر با هاله بازدارنده استرپتومایسین روی همین باکتری کمتر بود. حساسیت باکتری *Bs* به عصاره‌های *Pg* و *Pt* بیش از نصف حساسیت آن به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بود ولی این حساسیت به عصاره‌های گلسنگ *La* به حدود یک سوم و در مورد گلسنگ *As* به صفر کاهش یافت. در کل، تنها باکتری که به تمام عصاره-های گلسنگی واکنش نشان داد، *Pf* بود ولی این واکنش به گلسنگ *As* حداقل و به *Pg* نیز چشمگیر نبود (جدول ۳).

تمام عصاره‌های متانولی گلسنگ‌های مورد مطالعه بر باکتری‌های مورد مطالعه کم و بیش اثر باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی نشان دادند. با این حال، واکنش باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی باکتری *E* به عصاره‌های گلسنگی بسیار بیشتر از دو باکتری دیگر بود. واکنش باکتری‌ایستایی باکتری *Bs* در حداکثر بود. همچنین، عصاره‌های گلسنگی گلسنگ‌های *As*

و *La* اثر کشندگی زیادی در برابر این باکتری نشان ندادند. حساسیت باکتری *Pf* از لحاظ واکنش باکتری‌ایستایی از همه کمتر بود. گلسنگ‌های *Pg* و *Pt* اثر باکتری-ایستایی و نیز کشندگی بسیار بیشتری در مقایسه با دو گلسنگ دیگر نشان دادند. کشنده ترین گلسنگ‌ها *Pg* و *Pt* روی *Bs* و *Pt* روی *Pf* و کم اثرترین عصاره گلسنگ از لحاظ کشندگی *La* روی *Bs* و *La* و *As* روی *E* بود. در مجموع، باکتری *Bs* از لحاظ باکتری‌ایستایی حساسیت زیادی به عصاره متانولی گلسنگ‌ها نشان داد تا باکتری‌کشی. با چهار برابر کردن و گاه هشت برابر کردن غلظت بازدارنده عصاره‌های گلسنگی، خاصیت کشندگی روی این باکتری مشاهده گردید. اکثر عصاره‌های گلسنگی تنها با دو برابر کردن غلظت باکتری‌ایستا، توانستند بر باکتری *Pf* کشنده باشند به جز عصاره گلسنگ *Pt*. (جدول ۴).

بحث گلسنگ‌ها و مواد استخراج شده از آنها دارای چندین فعالیت بیولوژیکی نظر خواص ضدویروسی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و نیز دارای آنزیم‌های مهار کننده رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشند[۴،۸،۱۲]. ترکیبات متعدد آلی در گونه‌های مختلف گلسنگ‌ها شناسایی شده که برای موجوداتی مثل باکتری‌ها و قارچ‌ها سمی بوده و سبب کشندگی یا بازدارندگی رشد آنها می‌گردند.[۲۰] در این پژوهش نیز عصاره‌های متانولی همه گلسنگ‌های مورد بررسی کم و بیش دارای فعالیت ضدباکتریایی در مقابل باکتری های مورد آزمایش بودند. هر چند حساسیت این باکتری‌ها به عصاره‌های گلسنگی یکسان نبود. همچنین گونه‌های مختلف گلسنگی، اثرات متفاوتی بر باکتری‌ها داشتند که این امر به دلیل تفاوت گونه‌ها در دارا بودن انواع مختلف مواد با فعالیت ضدباکتریایی و موادی تشکیل دهنده عصاره‌ها می‌باشد[۲۷،۱۸]. در تحقیق حاضر، هیچ کدام از عصاره متانولی گلسنگ‌ها نتوانستند به اندازه استرپتومایسین بازدارنده باشند. با توجه به این که ماده مؤثره موجود در عصاره گلسنگ‌ها با مواد همراه دیگری که در عصاره‌ها موجود است، مخلوط شده و ناخالص می‌باشد، در صورتی که بتوان ماده مؤثره آنها را شناسایی و خالص نمود احتمالاً اثر بسیار بهتری را می‌توان از آنها انتظار داشت. در واقع پس از شناسایی ماده مؤثره و به خالص‌سازی آن می توان برای تجاری‌سازی و فرموله کردن آنها نیز اقدام نمود. برخی پژوهشگران نیز گزارش کرده‌اند که اوسنیک اسید استخراج شده از گلسنگ‌ها به عنوان یکی از ترکیبات مؤثر آنتی میکروبی، در مقایسه با استرپتومایسین فعالیت ضدباکتریایی قوی‌تری را دارا می‌باشد[۱۹]. در پژوهشی، نشان داده شد که عصاره‌های گلسنگ *Pt* در مقابل باکتری‌های گرم منفی فاقد فعالیت بود[۵]، در حالی که در این گلسنگ روی دو باکتری گرم منفی *E* و *Pf* تأثیر خوبی داشت. در این بررسی، گلسنگ *As* اثر زیادی در بازدارندگی باکتری‌ها در مقایسه با سایر گلسنگ‌ها نشان نداد. شهیدی و همکاران[۲۲،۲۳و۲۴] نیز گزارش کردند که عصاره‌های متانولی، دی‌اتیل‌اتری، استونی گلسنگ *As* در مقایسه با سایر عصاره‌های گلسنگی مورد مطالعه دارای کمترین تأثیر بود. در مطالعه شهیدی و همکاران[۲۴] نیز عصاره‌های متانولی، استونی، دی اتیل اتری گلسنگ‌های *Pt* بیشترین اثر بازدارندگی را بر رشد باکتری‌های گیاهی داشت. با توجه به نتایج به دست آمده آزمایش‌های تکمیلی در خصوص مشخص نمودن ماده مؤثره موجود در ترکیبات گلسنگی، در به ثمر رساندن و کاربردی نمودن این پژوهش کمک شایانی نماید. در نهایت، ترکیبات گلسنگی مورد مطالعه می‌توانند کارایی بالقوه‌ای در مهار باکتری‌های مورد مطالعه داشته باشند و در آینده برای مهار این باکتری‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری کلی در این پژوهش، عصاره‌های متانولی گلسنگ‌های بومی جمع‌آوری شده از منطقه ارسباران در مقابل باکتری‌هایی

با منشاء گیاهی دارای فعالیت بازدارنده، باکتری‌ایستایی و کشنده بودند. گلسنگ *A. setifera* کمترین اثر را بر باکتری‌های مورد مطالعه داشت. همچنین باکتری *Enterobacter* sp. حساسیت کمتری به عصاره‌های گلسنگی نشان داد. اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها بر حسب گونه گلسنگ و باکتری هدف متفاوت بود.

سپاسگزاری بدین وسیله از مهندس ابوالقاسم قاسمی عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، به جهت شناسایی و تحویل باکتری‌های گیاهی، قدردانی می‌شود. همچنین از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی جهت تأمین اعتبار اجرای این طرح پژوهشی سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Ahmadjianm, V. and hale, M.E. 1973. Methods of isolating and culturing lichen symbionts and thalli. In The Lichens, Academic Press, London. pp. 653–659.
2. Alexopoulos, CJ, Mims, CW and Blackwell M. 1996. Introductory on Mycology. 4th edition. John Wiley, New York. 869 pp.
3. Anke, H., Kolthoum, I., Zahner, H. and Laatsch, H. 1980. Metabolic products of microorganisms. 185. The anthraquinones of the Aspergillus glaucus group. I. Occurrence, isolation, identification and antimicrobial activity. Arch Microbiol. 126(3):223-30.
4. Aslan, A, Gulluce, M, Atalan, E. (2001). A study of antimicrobial activity of some lichens. Bull. Pure Applied Science 20: 23-26.
5. Aydin S, Kinaliogli K. (2010). Antimicrobial activity of the lichen extracts of *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* and *P. tiliaceae*. The Black Sea Journal of Sciences Sonbahar 1(2): 30-38.
6. Boustie J, Grube M. (2005). Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 3(2): 273-287.
7. Burkholder P, Evansa W, Mcveigh I, Thorntonh K. (1994). Antibiotic activity of lichens. Proceeding of National Academic Science, USA, 30: 250–255.
8. Dulger B, Gucin F, Kara A, Aslan A. (1997). *Usenea florida* (L.) Wig. antimicrobial activity of lichen, Transactions Journal of Biology 21:103-108.
9. Elix JA, Stocker-Wörgötter E. (2008). Biochemistry and secondary metabolites. - *In:* T. H. Nash, (ed.) III: Lichen Biology. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge UK. 104-133.
10. Esimone, C.O. and Adikwu, M.U. 1999. Antimicrobial activity and cytotoxicity *Ramalina farinacea.* J. Fitoterapia, 70: 428-431.
11. Houshyar F, Jamshidi S, Sorhrabi M. (2013). Antibacterial potential of five lichen species on *Fusarium equiseti* and *Pectobacterium carotovora* pv. *carotovora* potato rot agents in laboratory and storage condition. The conference of New Topics in Agriculture 14 pp.
12. Huneck S. (1999). The Significance of lichens and their metabolites. Naturwissenschaften 86: 559-576.
13. Marijana, K., Rankovic, B. and Sukdolak. S. 2010. Antimicrobial activity of the lichen Lecanora frustulosa and Parmeliopsis hyperopta and their Divaricatic acid and zeorin constituents. African J. of Microbiology Research, 4 (9): 885-890.
14. Miao, V., Coeffet, M., Brown, D., Sinnemann, S., Donaldson, G. and Davies, J. 2001. Genetic approaches to harvesting lichen products. Trends Biotechnol., 19: 349-355.
15. Nash TH. (1996). Lichen biology. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 303 pp.
16. ÖzdemirTürk, A., Yılmaz, M., Kıvanc, M. and Türk, H. 2003. The Antimicrobial activity of extracts of the lichen Cetrariaa culeata and its protolichesterinic acid constituent, Z. Naturforsch., 58c: 850-854.
17. Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, H. K., OH, H., Bhin, H. W. and Yim, J. H. 2010. Antibacterial activities of Ramalin, Usnic Acid and its Three Derivatives Isolated from the Antarcitic Lichen *Ramalina terbrata*. Z. Naturforsch., 65(1-2): 34-38.

18. Ranković B, Mišić M, Sukdolak S, Milosavljevic D. (2007). Antimicrobial activity of the lichens *Aspicilia cinerea*, *Collema cristatum*, *Ochrolechia androgyna*, *Physicia aipolia* and *Physcia caesia*. Italian Journal of Food Science 19(4): 461-469.
19. Rankovic B, Rankovic D, Kosanic M, Msric D. (2010). Antioxidant and antibacterial properties of the lichens *Anaptychya ciliaris*, *Nephroma parile*, *Ochrolechia tartarea* and *Parmelia centrifuga*, Central European Journal of Biology 5 (5): 649-655.
20. Romagni JG, Rosell RC, Nanayakkara NPD, Dayan FE. (2004). Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites. *In:* Macías FA, Galindo JCG, Molinillo JMG, Cutler HG (eds.): Allelopathy. Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 13-33.
21. Sati, S.C. and joshi, S. 2011. Antibacterial activity of the Himalayan lichen *Parmotrema nilgherrense* extracts, British Microbiology Research Journal, 1(2): 26-32.
22. Shahidi SM, Jamshidi S,and Torabi M (2013a). Antibacterial potential of five lichen species derived from Arasbaran region on *Dikerya chryanthemi* potato in laboratory and storage condition. Modern Science of Sustainable Agricultural Journal. 8(4): 55-65.
23. Shahidi SM, Jamshidi S, and Torabi M (2013b). Inhibitive effect of five lichen species different extracts on *Ralstonia solanacearum*. The 1st National Conference of Sustainable Development of Agriculture and Green Environment 9 pp.
24. Shahidi, SM, Jamshidi S and Torabi (2013c). Antibacterial potential of five lichen species from Arasbaran region against *Pectobacterium carotovora* pv. *carotovora* causing potato soft rot in laboratory and storage conditions Iranian Journal of Applied Plant Protection. In press.
25. Thippeswamy B, Sushma NR, Naveenkumar KJ. (2010). Antimicrobial property of bioactive factor isolated from *Parmelia perlata*. International Multidisciplinary Research Journal 2 (2): 1-5.
26. Tomas HN. (2008). Lichen Biology. Arizona State University, USA, 498 pp.
27. Yilmaz M, Tay T, Kivanc M, Turk H, Turk AS. (2005). The antibacterial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulisa* and its 3-hydroxyphysodic acid constituent. Z. Naturforsch 60c: 35-38.

Antibacterial activity of methanol extract of some Iranian lichens

Modern Science of Sustainable Agriculture

Vol. 10, No. 1, (41-50)

Soleiman Jamshidi[*]

Young Researchers and Elite Club
Miyaneh Branch
Islamic Azad University
Miyaneh, Iran
Email ✉:
s.jamshidy@yahoo.com
(corresponding author)

Seyyedeh Maryam Shahidi

Young Researchers and Elite Club
Miyaneh Branch
Islamic Azad University
Miyaneh, Iran
Email ✉:
maryam_shahidy@yahoo.com

Mohammad Sohrabi

Professor assistant of Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST)
Tehran, Iran
Email ✉:
mycolich@yahoo.com

Samira Jamshidi

Islamic Azad University
Miyaneh, Iran
Email ✉:
samira.j232@yahoo.com

Received: 29 September, 2013 **Accepted:** May 15, 2014

ABSTRACT Lichens are known as one of the greatest sources of natural compounds having antibiotic properties which some of them are being used as drugs for special diseases therapy. In current study, inhibitive, bacteriostatic and bactericidal activities of methanol extracts of five lichens derived from Arasbaran, East Azarbaijan Province of Iran including *Pleopsidium gobiensis*, *Parmelina tiliacea*, *Anaptychia setifera* and *Lecanora argopholis* on some plant derived bacteria such as *Pseudomonas fluorecens*, *Bacillus subtillis* and *Enterobacter* sp. were studied using disc diffusion and minimal inhibitory and bactericide concentration methods. Methanol extracts of lichens had significant inhibitive effects of studied bacteria other than *Enterobacter* sp. in disc diffusion agar method. *A. setifera* extracts had less inhibitive in bacteria than others. All lichens extracts had more or less bacteriostatic and bactericidal effects on bacteria. Methanol extracts of all lichens had various bacteriostatic and bactericidal effects on bacteria *P. gobiensis* and *P. tiliacea* had much more bacteriostatic and bactericide comparing two other lichens. Lichens extracts was more inhibitive against *B. subtillis*. The bacteriostatic and bactericidal reaction of *Enterobacter* sp. to lichen extracts was more than two other bacteria. Regarding results of the results, the lichens extracts could have remarkable potential for studied plant bacteria biocontrol and might be considered as promising agents against pathogens.

Keywords:
- biocontrol
- antibacterial activity
- natural compounds
- antimicrobials
- bacteriostatic
- bactericide