فاعلية المستخلص الأسيتوني لأشنة *Lecanora epibryon* تجاه بعض العزلات الجرثومية الممرضة

مروى خواجكية[1] و بسام الأعرج[2] و محمود قويدر[3]

تاريخ الإيداع 2013/07/28

قبل للنشر في 2013/12/22

الملّخص

جُمعت عينات للأشنات من النوع *Lecanora epibryon* من محمية العرشاني في مدينة إدلب، بهدف دراسة فاعليتها المضادة للجراثيم، واستعمل الأسيتون كمذيب لاستخلاص المركبات الفعالة فيها، واختُبرت فاعلية المستخلص تجاه ثلاث عزلات جرثومية ممرضة *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. بوساطة طريقة مقايسة السمية الخلوية باستعمال اختبار MTT.

أظهر المستخلص الأسيتوني فاعلية مضادة للجراثيم المختبرة، ولكن عزلة *Salmonella* sp. كانت الأكثر حساسية تجاه المستخلص حتى عند التراكيز المنخفضة.

الكلمات المفتاحية: أشنة *Lecanora epibryon*، اختبار MTT، مقايسة السمية الخلوية، الفاعلية المضادة للجراثيم.

[1] طالبة ماجستير، [2] الأستاذ المشرف، قسم علم الحياة النباتية، [3] الأستاذ المشرف المشارك، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

Activity of acetone extract from Lichen *Lecanora epibryon* against some isolated infectious bacteria

M. Khawajkiah[(1)], B. Al-Araj[(2)] and M. Kweider[(3)]

Received 28/07/2013
Accepted 22/12/2013

ABSTRACT

Lichen (*Lecanora epibryon*) collected from Arshany reservation at Idleb city was taken for screening antibacterial activity. Acetone was used as solvent for extraction of active compounds from lichen. The activity of extract was tested against three isolated infectious bacteria (*Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp.) by cytotoxicity assay using MTT test. Acetone extract of lichen showed antibacterial activity against all test organisms, but *Salmonella* sp. was highly susceptible to the extract even at low concentration.

Key words: Lichen (*Lecanora epibryo*n), MTT test, Cytotoxicity assay, Antibacterial activity.

[(1)] MCS., Student, [(2)]Superviser, Department of Plant Biology, [(3)] Associated Superviser, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus university, Syria.

المقدمة

إن ازدياد المقاومة الجرثومية تجاه الصادات الحيوية دفع إلى البحث عن مركبات جديدة لها فاعلية ضد الجراثيم الممرضة (Lopez *et al*., 2001)، وتعدُّ النباتات مصدراً لمئات الآلاف من المركبات الكيميائية المتنوعة ذات الخصائص الحيوية المختلفة، وعادة ما تكون هذه المركبات فعالة ضد الأحياء الدقيقة الممرضة. لذلك ازداد البحث في السنوات الأخيرة عن نباتات لها فاعلية مضادة للجراثيم، وأصبحت هناك حاجة ملحة ومستمرة لاكتشاف مركبات جديدة مضادة للأحياء الدقيقة بسبب الذعر المتزايد من انتشار أمراض معدية جديدة أو عودة ظهور أمراض أخرى. فضلاً عن تحدٍّ آخر كبير يكمن في ازدياد المقاومة للصادات الحيوية في الاستعمالات السريرية الحالية (Souza *et al*., 2004).

استُعملت الأشن منذ مئات السنين في العديد من البلدان الأوروبية كمواد مدرّة للبول، ولمعالجة أمراض المعدة، والسعال، وداء السل الرئوي، وفي معالجة الجروح وأمراض الجلد المختلفة (Baytop, 1999; Huneck, 1999). وعُرفت الفاعلية الحيوية للعديد من مستخلصات الأشن ومركباتها الكيميائية، كمضادات فيروسية، ومضادات سرطان، ومضادات للالتهاب والحساسية والحمى، ومضادات طفيلية (Lawrey, 1986; Halama and Haluwin. 2004; Huneck, 1999). وبعد سنوات عديدة من استعمال الأشن في الطب الشعبي، جاء العديد من الباحثين وأثبتوا أهلية هذا الاستعمال ووثّقوا نشاطها المضاد للميكروبات (Cansaran *et al*., 2006; Choudhary *et al*., 2005; Gulluce *et al*., 2006; Rankovic *et al*., 2007)

يعدُّ النوع *Lecanora epibryo*n أحد أنواع الأشن التي تنشأ عن علاقة تعايش بين كائنين أحدهما ينتمي إلى الفطريات Fungi والآخر ينتمي إلى الطحالب الخضراء Green algae أو الجراثيم الزرقاء Cyanobacteria. ينتمي النوع *L. epibryon* إلى رتبة Lecanorales التي تمتلك أعلى درجة من التنوع الكيميائي ولاسيما المواد المفيدة وظيفياً، مثل صفوف: depsides و depsidones الكيميائية (Cohen, 1995)، وهي مركبات ذات نشاط مضاد للفيروسات والجراثيم والسرطان والطفيليات (Dayan and Romagni 2001). والجنس *Lecanora* إحدى الأشن التي نالت اهتماماً عالمياً من قبل الباحثين بسبب قدرته على تحفيز البالعات البشرية على إنتاج NO في الزجاج (Choi *et al*., 2009). ونشاطه المضاد للأكسدة (Bhattarai *et al*., 2008) فضلاً عن عزل العديد من المركبات الكيميائية منه ذات الفاعلية الحيوية المضادة للجراثيم والفطريات والفيروسات، وأهم هذه المركبات حمض الأوسنيك usnic acid الذي أُثبتت فاعليته الحيوية كمضاد فيروسي (Scripa *et al*., 1999)، ومضاد فطري (Lauterwein *et al*., 1995, Lawrey, 1995, Cocchietto *et al*., 2002)، ووُجد أن له تأثيراً مثبطاً لجراثيم السل *Mycobacterium tuberculosis* عند التركيز الأدنى المثبط

(Honda *et* ميكروغرام/ مل 62.5 = MIC (Minimum Inhibition Concentration) (2010 ,*al*.، وفي بحث أجراه Tay وآخرون (2004) أُثبت أن لحمض الأوسنيك فاعلية تجاه الجراثيم: *Listeria monocytgenes, Proteus vulgaris, Streptococcus faecalis, Yersinia enterocolitica, Bucillus subtilis, Staphylococcus aureus*، كما أمكن عزل مركبات كيميائية أخرى من الجنس *Lecanora*، مثل: xanthones (Karunaratne *et al*., 2005)، ومركب chloroatranorin الذي أُثبت وجوده في أكثر من 40 نوعاً من الأشن ومنها: *L. brancha*، و*L. epibryon*، و*L. rupicola*، ومركب pannarin المعزول من النوع *L. hercynica*، وgangaleoidin المعزول من النوع *L. gangaleoids* (Dembitsky and Tolstikov 2003) ومركبات atranorin وterpenoids (Guttova *et al*., 2007).

ونظراً إلى ما تتميّز به الأشن من أهمية دوائية كونها مصدراً للعديد من المركبات الفعالة المضادة للأحياء الدقيقة، وإلى أن الجنس *Lecanora* يمتلك بعضاً من تلك المركبات. هَدَفَ البحث إلى التحقق من الفاعلية المضادة للمستخلص الأسيتوني للنوع *L. epibryon* تجاه بعض العزلات الجرثومية الممرضة، وتحديد التركيز السمي من المستخلص الذي يقتل نصف عدد الخلايا CC_{50} Cytotoxicity Concentration.

مواد البحث وطرائقه

عينة الأشن Lichen specimen

ينمو النوع *L. epibryon* (الشكل1) على الصخور الكلسية ونادراً ما يشاهد على التربة، وجرى جمعه من محمية العرشاني في مدينة إدلب، خلال شهري كانون الأول وكانون الثاني من عام 2011، ووضعت العينة في أكياس شفافة من النايلون، ثم نُقل إلى مختبر الدراسات العليا في قسم علم الحياة النباتية- كلية العلوم- جامعة دمشق، حيث جرى تصنيفه بالاعتماد على المعايير المتبعة في تصنيف الأشن (Schubert, 1983, Johns, 1987). وحُفظ إلى حين إجراء الدراسة.

الشكل (1)
صورة النوع *Lecanora epipryon* في موقع الجمع

تحضير المستخلصات Preparation of Extracts

نُظفت مشرة الأشنة من التراب والحشرات والبقايا النباتية، وغسلت بالماء المقطر عدة مرات للتخلص من الشوائب جميعها، ثم جففت في درجة حرارة المختبر (25-30) م°، وأخذت كمية محددة منها، وسحقت جيداً باستعمال مطحنة كهربائية حتى أصبحت مسحوقاً ناعماً. وبعد الطحن أُخذ 5غ من مسحوق الأشنة وأضيف إليه 50 مل من المذيب العضوي: الأسيتون (Panreac, Spain)، وتُركت منقوعة في المذيب مدة 24 ساعة مع التحريك المستمر على هزازةٍ رحوية (JSR, Korea) 300 هزة/دقيقة، بعيداً عن الضوء وبدرجة حرارة المختبر. رشّحت الخلاصة عبر أغشية ترشيح من نوع Watman No.1. وجرى بعدئذ تبخير المذيب تحت ضغط مخفف ودرجة حرارة لا تتجاوز 50 °C باستعمال المبخر الدوار Rotary evaporator (IKA, Germany). وُزن المستخلص الناتج وحُفظ في المجمدة -40° C (Climas, Spain) إلى حين اختبار تأثيره (Fournet *et al*., 1994).

العزلات الجرثومية Isolated Bacteria

استعمل في هذه الدراسة ثلاث عزلات جرثومية (*Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp.) أُخذت من مرضى مستشفى الأطفال.

مقايسة السمية الخلوية Cytotoxicity assay:

أُذيب 5 ملغ من مسحوق المستخلص في 50 ميكرولتراً من ثنائي ميتيل سلفوكسيد(Sigma, Germany) Dimethyl sulfoxide (DMSO)، ورُشحت عبر أغشية ترشيح 0.22 µm بهدف التعقيم، ثم خُففت إلى التركيز الملائم (10 - 500) µg/ml باستعمال وسط الاستزراع المرق المغذي NB. على ألا يتجاوز تركيز DMSO 0.2 % (حجم/حجم). اختُبرت فاعلية المستخلص وتأثيره في العزلات الجرثومية الممرضة باستعمال اختبار MTT (microculture tetrazolium test) (Sigma-Aldrich, Germany) (Mossman,. 1983)، الذي يعتمد على قياس نشاط الخلايا الحية التي تقوم بدورها بنزع الهيدروجين من المركب M-5655 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)، بوساطة إنزيمات الديهيدروجيناز الميتاكوندرية التي تشق حلقة التترازوليوم وتعطي بلورات الفورمازان البنفسجية، ولوحظ أنه يمكن للجراثيم والميكوبلاسما وغيرها من الميكروبات التي لا تمتلك جسيمات ميتاكوندرية القدرة على شق حلقة التترازوليوم (Sigma, Product information)، ويؤدي تغير العدد الخلوي زيادةً أو نقصاناً إلى تغيّر في كمية بلورات الفورمازان المتشكلة مما يدل على درجة السمية المسبّبة بوساطة المادة المختبرة. جرى زرع الخلايا الجرثومية في صفيحة الاستزراع ذات 24 حفرة بعدد خلوي يساوي 10^4 خلية/مل، ثم حُضنت صفيحة الاستزراع السابقة بدرجة حرارة 37°م مدة 24 ساعة مع المستخلص ذي التراكيز المذكورة سابقاً ومن دونها، بحجم نهائي

يساوي 100 ميكرولتر/حفرة. أُضيف مركب M-5655 (5 ملغ/مل في PBS) إلى الحفر بكمية تساوي 10% من حجم المستزرع الأصلي. ثم أُعيدت صفيحة الاستزراع إلى الحاضنة مدة تراوح بين 2 و4 ساعات. وبعد مدة الحضن أُضيف المحلول M-8910 (10% تريتون 100x + 0.1 HCl ن في مركب الإيزوبروبانول اللامائي) بحجم مساوٍ لحجم المزرعة الأصلي (100 ميكرولتر/ حفرة) لإذابة بلورات الفورمازان البنفسجيةً المتشكلة، ثم قيست الامتصاصية عند طول موجة 540 نانومتراً باستعمال قارئ ELISA (HS Human, Germany). وحُسبت النسبة المئوية للحيوية الخلوية في كل حفرة من حفر الزرع المعالجة بتركيزات مختلفة من المستخلص مقارنة بالشاهد بحسب العلاقة: (امتصاصية الخلايا المعالجة بالمستخلص/ امتصاصية الشاهد) × 100.

أجريت التجارب جميعها باستعمال مكررين لكل شرط تجريبي في التجربة الواحدة في ثلاث تجارب كاملة مكررة، واستعمل برنامج SPSS النسخة (SPSS statistical package, version 16 for windows16). واعْتُمد اختبار تحليل التباين وحيد الاتجاه one way analysis of variance (ANOVA) لمَعالجة البيانات إحصائياً وتحليلها ورسم المنحنيات البيانية.

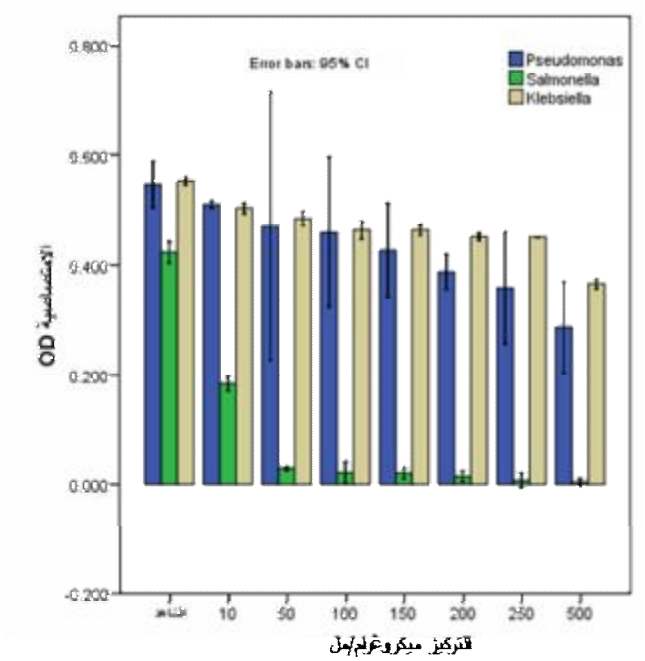
النتائج

قُيّمت الفاعلية الحيوية للمستخلص الأسيتوني للنوع *Lecanora epibryon* تجاه ثلاث عزلات جرثومية ممرضة معزولة من مرضى مستشفى الأطفال (*Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp.). باستعمال اختبار MTT، ثم قورنت قيم الامتصاصية بطول موجة 540 نانومتراً لعينات الجراثيم المعالجة بالتراكيز المختلفة من ذلك المستخلص (10, 50, 100, 150, 200, 250, 500 µg/ml)، وحصلنا على قيم التركيز السمي الذي يقتل نصف عدد الخلايا CC_{50} الموضّحة في الجدول 1. وقد أكدت النتائج وجود علاقة ارتباط عكسية بين التركيز والامتصاصية (الشكل2)، ووُجد أن جنس *Salmonella* sp. كان الأكثر حساسية تجاه التراكيز المختلفة من المستخلص الأسيتوني لأشنة *L. epibryon* حتى التراكيز المنخفضة منها (10 µg/ml) إذْ بلغت نسبة الحيوية للخلايا الجرثومية عند هذا التركيز 43.44% (الشكل 3)، وباستعمال اختبار المقارنات المتعددة بطريقة Tukey HSD لم يُلحظ عند ازدياد هذا التركيز أي فروق معنوية (sig>0.05)، أما جنس *Klebsiella* sp فكان الأقل حساسية تجاه التراكيز المختلفة من المستخلص الأسيتوني لأشنة *L. epibryon* مقارنة ببقية العزلات الجرثومية، وبلغت قيمة CC_{50} = 786±0.2 ميكروغرام /مل، وكانت الفروق معنوية في التراكيز المستعملة جميعها (sig<0.05)، ماعدا التراكيز 100,150 ميكروغرام/مل، والتراكيز 200 و250 ميكروغرام/مل فكانت الفروق فيما بينها غير معنوية (sig> 0.05). وكانت نسبة الحيوية للخلايا الجرثومية أقل من 90% عند التراكيز جميعها باستثناء التركيز 10 ميكروغرام/مل

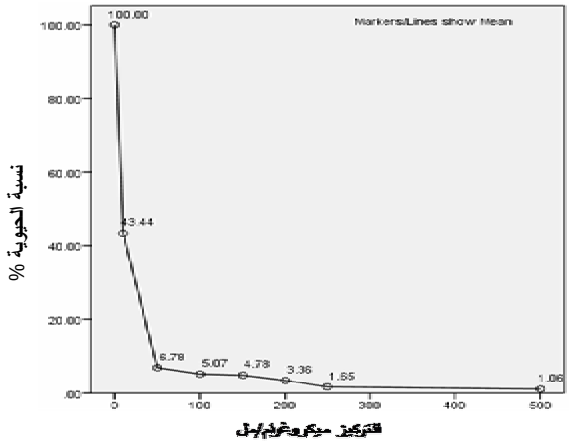
الذي بلغت عنده نسبة الحيوية 91.26% (الشكل 4)، ولوحظ تأثر جنس *Pseudomonas* sp. عند التراكيز المنخفضة على نحو ضعيف، وازداد معدّل التأثير الحيوي للمستخلص الأسيتوني معنوياً (sig<0.05) بارتفاع التركيز، وبلغت قيمة CC_{50} = 475±2.4 ميكروغرام/مل. وتبيّن أن النسبة المئوية لحيوية الجراثيم المعالجة بالتراكيز المتزايدة من المستخلص كانت أقل من 90% من أجل التراكيز المختبرة جميعها باستثناء التركيز 10 ميكروغرام/مل الذي بلغت عنده نسبة الحيوية 93.36% (الشكل 5).

الجدول (1) التركيز السمي من المستخلص الذي يقتل نصف عدد الخلايا Cytotoxicity concentration CC_{50}.

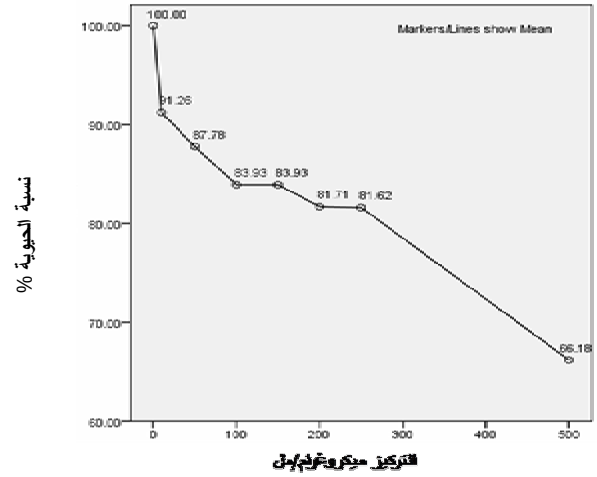
الجرثوم المختبر	CC_{50}± الانحراف المعياري ميكروغرام /مل
Pseudomonas sp.	475±2.4
Salmonella sp.	10<
Klebsiella sp.	786±0.2



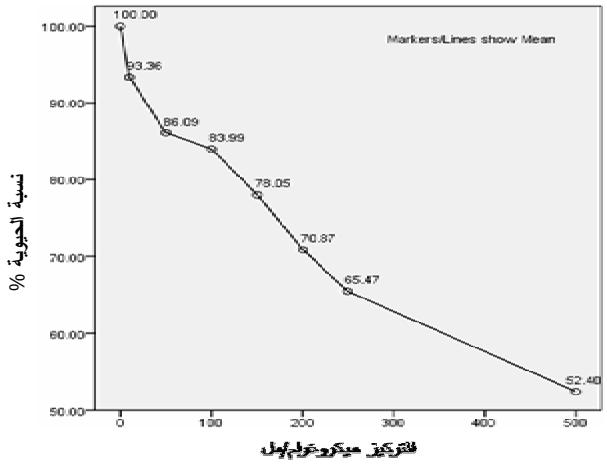
الشكل (2) العلاقة بين قيم الامتصاصية OD عند طول موجة 540 نانومتراً، لعينات الجراثيم المعالجة بالتراكيز المختلفة للمستخلص الأسيتوني للأشنة *L. epibryon*



الشكل (3) نسبة حيوية الخلايا الجرثومية من النوع *Salmonella* sp بعد معالجتها بقيم التراكيز المختلفة لمستخلص النوع *L. epibryon*.



الشكل (4) نسبة حيوية الخلايا الجرثومية للجنس *Klebsiella* بعد معالجتها بقيم التراكيز المختلفة لمستخلص النوع *L. epibryon*.



الشكل (5) نسبة حيوية الخلايا الجرثومية للجنس *Pseudomonas* بعد معالجتها بقيم التراكيز المختلفة لمستخلص النوع *L. epibryon*.

مناقشة النتائج

استُعملت الأشن في الطب الشعبي منذ قرون، وعُرفت فاعليتها الحيوية عند الشعوب الأمريكية الأصلية والهنود والصينيين والأوروبيين لمعالجة الأمراض، وجاءت العديد من الدراسات الحديثة تدعم هذا الاستعمال في معالجة الأمراض التنفسية والتهاب المجاري البولية والالتهاب الرئوي، وغيرها كثير (Hoskeri *et al*., 2010)، فقد أثبتت هذه الدراسات قدرة الأشن على إنتاج العديد من المستقلبات الثانوية التي تحميها من الإجهاد الفيزيائي والهجوم الحيوي في أثناء نموها البطيء، وأظهرت المدى الواسع للفاعلية الحيوية لتلك المواد، ولاسيما المواد من الصفوف الكيميائية Depside, Depsidone ذات النشاط المضاد للفيروسات والجراثيم والسرطان (Dayan and Romagni 2001). ووُجد أن المستخلصات الخام للعديد من أنواع الأشن تظهر فاعلية مضادة للجراثيم الممرضة المعزولة من مصادر مختلفة، فقد درس كل من Kosanic وRancovic (2010) الفاعلية الحيوية للمستخلصات الأسيتونية والميتانولية والمائية للأنواع *Lecanora. atra* و*L. muralis* في الزجاج تجاه ستة أنواع من الجراثيم: *Bacillus subtilis, B. mycoide*s, *Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia*، ولم تُظهر الخلاصة المائية أي فاعلية، في حين كانت الخلاصة الأسيتونية والميتانولية فعالة وفقاً لنوع الجرثوم المختبر. أما Karagoz وآخرون (2009) فقد قاموا باختبار الفاعلية المضادة للجراثيم لبعض مستخلصات الأشن المائية والإيتانولية تجاه ست سلالات جرثومية معيارية: *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Klebsiella pneumonia, Staphylococcus aureus, Staph. epidermis*

وأظهرت المستخلصات ومنها مستخلصات النوع *L. muralis* مدىً متنوعاً من الفاعلية، وكان المستخلص المائي أفضل من الإيتانولي.

وجرى التحقق في هذا البحث من الفاعلية الحيوية للمستخلص الأسيتوني للنوع *L. epibryon* تجاه ثلاث عزلات جرثومية ممرضة للمرة الأولى. فقد أظهر هذا المستخلص فعالية تثبيطية لنمو الجراثيم المختبرة، ويعود الاختلاف في التأثير بين العزلات الجرثومية الثلاث المختبرة إلى الجرثوم المختبر وتركيز المستخلص. إذ كان جنس *Salmonella* sp. الأكثر حساسية تجاه التراكيز المختلفة من المستخلص الأسيتوني، بينما كان جنس *Klebsiella* sp. الأقل حساسية، وقد يعود ذلك إلى أن جراثيم *Salmonella* sp. مجردة من المحفظة والأبواغ، في حين تمتلك خلايا *Klebsiella* محفظة كبيرة جداً (الكبب، 1995)، غير أن جنس *Pseudomonas* sp. الذي يُعدّ معنّداً تجاه عدد كبير من الصادات الحيوية قد تأثر عند التراكيز المنخفضة على نحو ضعيف وازداد معدّل تأثره بالمستخلص الأسيتوني معنوياً ($sig<0.05$) بارتفاع التركيز، وقد يُعزى هذا التأثير إلى أن *L. epibryon* ينتمي إلى رتبة Lecanorales التي تمتلك أعلى درجة من التنوع الكيميائي ولاسيما المواد المفيدة وظيفياً، مثل صفوف depsides و depsidones الكيميائية (Cohen, 1995)، وهي مركبات أظهرت عبر الدراسات فاعليتها الحيوية المثبطة للميكروبات، فالمركب atranorin الذي ينتمي إلى الصف الكيميائي depsides يُعدُّ ساماً للفطريات (Dayan and Romagni 2001)، وله فاعلية تثبيطية منخفضة تجاه جرثوم *Mycobacterium tuberculosis* (Honda *et al*., 2010)، وكذلك الأمر بالنسبة إلى مركبات xanthones التي توجد في العديد من أنواع *Lecanora* (Karunaratne *et al*., 2005) فهي تملك فاعلية تثبيطية منخفضة تجاه ذلك الجرثوم (Honda *et al*., 2010)، كما أن معظم xanthones تمتلك مجموعات وظيفية فينولية وتُظهر مدىً واسعاً من النشاطات الحيوية والدوائية كمضادات للسرطان والالتهاب والأكسدة، ومضادات للجراثيم والفطريات (Markovic and Mavojlovic 2010)، أمَّا المركبات terpenoids فهي مضادات ميكروبية (Dayan and Romagni 2001). وفي بحث أجراه Bhattarai وآخرون (2008) على مجموعة من الأشن القطبية أثبت أن الجنس *Lecanora* يمتلك أعلى محتوى من المركبات الفينولية. وتعدُّ هذه المركبات فاعلة حيوياً تجاه الأحياء الدقيقة المتنوعة (Muller, 2001).

ووفقاً لما سبق، فإن النتائج تدلُّ على الدور المحتمل الذي يمكن أن يؤديه النوع *L. epibryon* كمضاد جرثومي، وتؤكد إمكان متابعة الدراسة عليه من الناحية الكيميائية، لاستخلاص المركبات الفعالة منه، وتنقيتها، ومعرفة تركيبها الكيميائي، بهدف إجراء الدراسات الصيدلانية والسريرية اللازمة، للانتقال إلى تطبيقها في الأوساط الحية مباشرة، وذلك لمعالجة العديد من الأمراض الناتجة عن الجراثيم الممرضة التي باتت تطوّر مقاومة تجاه العديد من الصادات الحيوية المستعملة حالياً.

REFERENCES المراجع

حشاش الكبب، حسام الدين. (1995). علم الأحياء الدقيقة الطبية وعلم المناعة، مراجعة لامتحان البورد.

Baytop T. (1999). Therapy with Medicinal plants in Turkey (Past and Present). Istanbul, University, Istanbul, 1-233.

Bhattarai H. D., Paudel B., Hong S. G., Lee H. K., Yim J. H. (2008). Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents of lichen from Antractica. J. Nat. Med. 62: 481-484.

Cansarana D., Kahya D., Yurdakulol E., Atakol O. (2006). Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of Anatolia and antimicrobial activity. Z. Naturforsch. C, 61: 773-776.

Choi H.S., Yim H.J., Lee K.H.K., Pyo S. (2009). Immunomodulatory effects of Polar lichens on the function of macrophages in vitro. Mar Biotechnol, 11:90-98.

Choudhary M. I., Azizuddin Jalil S., Atta-Ur-Rahman. (2005). Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen, *Usnea longissima*. Phytochemistry, 66: 2346–2350.

Cocchietto M., Skert N., Nimis P.L., Sava G. (2002). A review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenchaften, *89*: 137-146.

Cohen A. P. (1995). The quinonoid pigment of the lichens *Nephroma laevigatum* and *Heteroderma obscurata*. PHD in the Faculty of graduate studies (Department of Botany) The university of British Columbia.

Dayan F.E., Romagni J. G. (2001). Lichens as a potential source of pesticides. Pesticides outlook, 229-232.

Dembitsky M.V and Tolstikov G. (2003). Halogenated phenol compounds in lichens and fungi. Chemistry for Sustainable Development, 11: 557-565.

Fournet A., Barrios A. A., Munoz V. (1994). Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 41: 19-37.

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 poly*morpha and *Umbilicaria nylanderiana*. Phytomedicine, 13: 515–521.

Guttova A.; Tonsberg T.; Lackovicova A.; Backor M. (2007). The identity of (Lecanoracea) describedfrom Slovakia. Mycotaxonm 101:247-250.

Halama P., Haluwin V.A.N C. (2004). Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. BioControl, 49: 95–107.

Honda N. K., Pavan F. R., Coelho R. G., de Andrade Leite S. R., Micheletti A. C., Lopes T. I. B., Misutsu M. Y., Beatriz A., Brum R. L., Leite C. Q. F. (2010). Antimycobacterial activity of lichen substances. Phytomedicine, 17:328-332.

Hoskeri H. J; Krishna V.; Amruthavalli C. (2010). Effects of extracts from lichen *Ramalina pacifica* against clinically infectious bacteria. http://www.sciencepub.net/nature.

Huneck S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. Naturwissenschaften, 86: 559–570.

www.Sigma-aldrich.com. IN VITRO TOXICOLOGY ASSAY KIT MTT BASED Stock No. TOX-1, Product information

Johns H. M. (1987). Bestimmung Buch, Farne- Moose – Flechten, BLV Verlag, Munchen, 3 Auflage, P: 171-253.

Karagoz A., Dogruoz N., Zeybek Z., Aslan A. (2009). Antibacterial activity of some lichen extracts. Journal of Medicinal Plants Research Vol 3(12), pp. 1034-1039.

Karunaratne V., Bombuwela K., Kathirgamarathar S., Thadhani M. V. (2005). Lichens: A chemically important Biota. J.Natn.Sci. Foundation SriLanka, 33(3): 169-186.

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

Lauterwein M., Oethinger M., Belsner K., Peters T., Marre R. (1995). In vitro activity of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, *39*: 2541-2543.

Lawrey J. D. (1986). Biological role of lichen substances. Bryologist, 89: 11-122.

Lawrey J. D. (1995). The chemical ecology of lichen mycoparasites: a review. Canadian Journal of Botany, 73: S603-S608.

Lopez A., Hudson J. B., and Towers G. H. N. (2001). Antiviral and antimicrobial activity of Colombial medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, Vol. 77: 189-196.

Markovic Z. S., Manojlovic N. T. (2010). Analytical characterization of lichexanthone in lichen: HPLC, UV spectroscopic, and DFT analysis of lichexanthone extracted from Laurera benguelensis (Mull. Arg.) Zahlbr. Monatsh Chem, 141:945–952

Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65:55-63.

Muller K. (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. Appl Microbiol Biotechnol 56:9–16.

Rankovic B., Misic M., Sukdolak S., Milosavljevic D. (2007). Antimicrobial Activity of the Lichens *Aspicilia cinerea, Collema cristatum, Ochrolechia androgyna, Physcia aipolia* and *Physcia caesia.* Italian Journal of Food of Science, 19: 461-469.

Schubert, R. (1983). In Werner Rothmaler Exkursionsflora Niederepflanzen, Volk und Wissen Volkseigener Verlag, 2 Auflage, Berlin, P: 525-625.

Scirpa P., Scambia G., Masciullo V., Battaglia F., Foti E., Lopez R., Villa P., Malecore M., Mancuso S. (1999). A zinc sulphate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesion by human papillomavirus. Minerva ginecologica, 51: 255–260.

Souza G.C.de., Haas A.P.S., Poser G.L., Von Schapoval E.E.S., Elisabetsky E. (2004). Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. Journal of Ethnopharmacology, Vol.90: 135-143.

Tay T., Turk A.O., Yilmaz M., Turk H., Kivanc M. (2004). Evaluation of the Antimicrobial Activity of the Acetone Extract of the Lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-Usnic Acid, Norstictic Acid, and Protocetraric Acid Constituents. Z. Naturforsch. 59c, 384-388.