مقاله اصیل

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ی اتانولی گلسنگ Ramalina hyrcana Sipman برروی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

محمد بکائیان[1]، فرامرز دهمرده *[2]، محمد سهرابی[3]، سعیده سعیدی[4]

[1] استادیار مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، زاهدان، ایران

[2] کارشناس ارشد زیست شناسی علوم گیاهی- سیستماتیک گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

[3] استادیار سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

[4] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، زاهدان، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:** زابل ، دانشگاه علوم پزشکی زابل، گروه زیست شناسی، فرامرز دهمرده

E-mail: faramarz.dahmardeh@gmail.com

وصول:۹۳/۱۲/۱۷، اصلاح:۹۴/۱/۲۵، پذیرش:۹۴/۳/۳

چکیده

زمینه و هدف: بیماری‌های عفونی، یکی از عوامل مهم مرگ و میر در جهان است. به‌علت مقاومت تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی به آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از داروهای طبیعی و گیاهی برای کنترل این عوامل رو به افزایش است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌ی گلسنگ Ramalina hyrcana Sipman علیه چند باکتری گرم مثبت و گرم منفی است.

مواد و روش‌ها: عصاره‌ی اتانولی گلسنگ مورد نظر با استفاده از دستگاه روتاری تهیه شد. ۹ سویه‌ی استاندارد از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در محیط آب‌گوشت غذایی کشت داده شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به روش میکرودایلوشن تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی گلسنگ R. hyrcana در غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ی باکتری‌های گرم مثبت و منفی است. نتایج نشان داد که عصاره‌ی این گلسنگ در همه‌ی غلظت‌ها مهارکننده باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است و بعد از استافیلوکوکوس اورئوس کمترین غلظت مهارکننده مربوط به باکتری‌های هافنیا و اسینتو باکتر می‌باشد (۱۲/۵ppm).

نتیجه‌گیری: براساس نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق وسایر گزارش‌های موجود در این زمینه، می‌توان عصاره‌ی اتانولی گلسنگ R. hyrcana را به‌عنوان عامل کنترل‌کننده‌ی بیولوژیک معرفی نمود. با این‌حال، برای استفاده ازعصاره‌های گلسنگ‌های مختلف در جهت کاربرد بالینی، آنالیز شیمیایی عصاره‌ها و تحقیقات بالینی لازم و ضروری می‌باشد.

واژگان کلیدی: *اثر ضدباکتریایی، عصاره‌ی اتانولی، گلسنگ، Ramalina hyrcana*

مقدمه

درمان بیماری‌های ناشی از باکتری‌ها به‌خاطر پیدایش سویه‌هایی از این میکروارگانیسم‌ها که به داروها مقاوم هستند، درحال تبدیل شدن به یک موضوع نگران کننده است. مقاومت میکروبی یک پدیده‌ی ژنتیکی می‌باشد که در آن ژن‌هایی از میکروارگانیسم‌ها، مکانیسم‌های بیوشیمیایی را رمز می‌کنند که این مکانیسم‌ها از عملکرد داروها جلوگیری می‌کنند. مقاومت میکروبی گاهی به‌علت

تکامل طبیعی میکروارگانیسم‌ها به وجود می‌آید. ولی گاهی این مقاومت در نتیجه‌ی استفاده‌ی بیش از حد از مواد ضدّ میکروبی دراقدامات پزشکی، دامپزشکی و کشاورزی می‌باشد. ازاین‌رو، جست‌وجوی آنتی‌بیوتیک-های جدید از منابع طبیعی به‌عنوان یک جایگزین برای داروهای تجاری افزایش یافته است (۱).

اصطلاح «گلسنگ» به یک ارتباط همزیستی میان یک قارچ رشته‌ای (مایکوبیونت) و حداقل یک موجود فتوسنتزکننده (فوتوبیونت) اشاره دارد که این شریک فتوسنتزی کلروفیل‌دار می‌تواند یک جلبک سبز، سیانوباکتری و یا هردوی آنها باشد (۲). اولین بار بُرخولدِر و همکاران وجود مواد آنتی‌بیوتیکی در گلسنگ-ها را گزارش کردند. پس از اینکه پنی‌سیلین از قارچ پنیسیلیوم کشف شد، فعالیت ضدباکتریایی بسیاری از گلسنگ‌ها نیز به مرور زمان مورد بررسی قرار گرفت (۳). متابولیت‌های ثانویه گلسنگ‌ها در صنعت داروسازی به-عنوان ترکیباتی ضدباکتریایی و ضدویروسی مورد استفاده قرار می‌گیرند (٤). تاکنون در حدود بیش از ۱۰۵۰ ترکیب ثانویه از گلسنگ‌ها، جداسازی و مورد شناسایی قرارگرفته‌است (۵، ٦).

ترکیبات ثانویه‌ی گلسنگ‌ها معمولاً به‌صورت کریستال‌های کوچک بر روی دیواره‌های سلولی (سطح خارجی) هیف‌های قارچی و سلول‌های فوتوبیونت قرار می‌گیرند (۵، ۷). این مواد شیمیایی با وجود آن که در آب نامحلول‌اند، ولی می‌توانند در حلال‌های آلی حل شوند. مقدار آنها بین ۱ دهم درصد و ۱۰ درصد وزن خشک تال و گاهی‌اوقات به بیش از ۳۰ درصد می‌رسد (۵، ۸، ۹). بیش از ۵۰ درصد متابولیت‌های ثانویه‌ی شناخته شده از گلسنگ‌ها دارای عملکردهای ضدباکتریایی علیه بیماری-های انسانی می‌باشند (۷). مواد شیمیایی تولید شده به وسیله گلسنگ‌ها مورد توجه محققین برای بیش از ۱۰۰ سال بوده‌اند و اطلاعات درباره ساختار، منشاء زیستی و اهمیت فیلوژنتیکی آنها با کوشش زیادی در این دوره گردآوری شده است. پیشرفت در تکنیک‌های تجزیه و تحلیلی و روش‌های آزمایشگاهی منجر به شناسایی تعداد زیادی از مواد گلسنگی شده است (۸). اکثر موادگلسنگی شناخته شده، اوسنیک اسید به دو شکل انانتیومری (۱۰)، ترکیبات فنولیک، آنتراکوئینون‌ها، دی‌بنزوفوران‌ها، دپسید-ها، دپسیدون‌ها، دپسون‌ها، تری‌ترپن‌ها، گامالکتون‌ها و مشتقات پولوینیک اسید هستند و چندین فعالیت بیولوژیکی از جمله ضدویروسی، آنتی‌بیوتیکی، آنتی-توموری، حساسیّت‌زایی، بازدارنده‌ی رشد گیاهان و مهار-کننده‌ی آنزیم‌ها دارند (۸، ۱۱، ۱۲). با توجه به این گزارش‌ها، در مطالعه‌ی حاضر اثرات ضدمیکروبی گونه‌ی R. hyrcana که کمتر مورد بررسی قرارگرفته است، مورد مطالعه قرارگرفت. هدف از این تحقیق، بررسی اثر ضد-باکتریایی عصاره‌ی اتانولی گلسنگ R. hyrcana علیه چندین باکتری گرم مثبت و گرم منفی بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی نمونه گلسنگی

گونه‌ی گلسنگی R. hyrcana در آذرماه ۱۳۹۲ و در طی نمونه‌برداری‌های انجام شده در از اطراف شهر زیرآب از توابع شهرستان سواد کوه (استان مازندران) جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده، پس از انتقال به آزمایشگاه مورد شناسایی قرار گرفتند که شناسایی آنها براساس شکل ظاهری، آناتومی و تست‌های شیمیایی انجام گرفت (شکل ۱).

تهیه‌ی‌عصاره‌ی اتانولی گلسنگ

ابتدا تال گلسنگ R. hyrcana کاملاً با آب مقطر مورد شست‌وشو قرارگرفت و سپس در دمای اتاق (آزمایشگاه) به‌مدت یک هفته قرارداده شد تا خشک گردد. جهت تهیه‌ی عصاره اتانولی گلسنگ مورد نظر از پودرخشک شده‌ی آن استفاده شد. بدین منظور، ابتدا ٤ گرم از پودر مذکور، وزن و در۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول حل شد. عصاره‌ی به‌دست آمده در ادامه توسط کاغذ صافی

واتمن (شماره‌ی ۱)، فیلتر و سپس جهت جداسازی حلال، در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد در دستگاه روتاری قرارداده شد. عصاره‌ی حاصل‌شده درظروف دربسته و در فریزر منفی ۸۰ تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد (۱۳).

سویه‌ی باکتری و تهیه‌ی محیط کشت

باکتری‌های مورد استفاده به‌صورت استاندارد تهیه شده است و شامل باکتری‌های گرم مثبت Staphylococcus aureus ATCC®25923، S. saprophyticus ATCC®15305، Streptococcus pyogenes ATCC®19615 و باکتری‌های گرم منفی Streptococcus pneumonia ATCC 49619، Serratia marcescens ATCC 274، Proteusmirabilis ATCC 35659، Acinetobacter baumannii ATCC 19606، Hafnia alvei ATCC 51873، Enterococcus faecalis ATCC 29212 بوده که از شرکت آرین مهر (ایران) خریداری شده است.

بعد از آماده‌سازی اولیه یک کلنی از باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط آب‌گوشتی تریپتیک سوی (TSB, Merck, Germany) کشت داده و به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از این ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه رشد کرده‌ی هر باکتری به محیط کشت منجمد آگار تریپتیک سوی انتقال داده و به‌مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرارگرفت. مشخصات گونه‌های باکتریایی مورد استفاده در جدول شماره‌ی ۱ آمده است.

تعیین فعالیت آنتی‌بیوتیکی

تمام سویه‌های خالص باکتری با روش کربی ـ بائر تعیین آنتی‌بیوگرام شده و حساسیّت آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم (۳۰µg)، اریترومایسین (۱۵µg)، سفکسیم (۳۰µg) و تتراسیکلین (۳۰µg) مورد ارزیابی قرارگرفت. پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قطر هاله‌ی بازدارنده اندازه‌گیری شد و آنگاه حساسیت و مقاومت سویه‌ها، تعیین و نتایج آن با جدول استاندارد NCCLS مقایسه گردید.

تهیه‌ی سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند

برای تهیه‌ی سوسپانسیون میکروبی یک روز قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره‌ی مقداری از کلنی باکتری به محیط کشت شیب‌دار آگار مغذی (مرک آلمان) منتقل شد. پس از رشد سلول‌های باکتری روی سطح محیط کشت، سطح آن با محلول نرمال سالین، شسته و سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل‌گردید. مقداری از سوسپانسیون باکتریایی داخل لوله استریلِ دردار حاوی نرمال سالین، ریخته و کدورت آن با اسپکتروفتومتر درطول موج ۵۳۰نانومتراندازه‌گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول ۵ دهم مک فارلند، با نرمال سالین رقیق گردید. غلظت نهایی سوسپانسیون تولیدی به مقدار$۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu تعیین گردید.

آزمون ضدمیکروبی عصاره

حساسیّت جدایه‌های باکتری دارای مقاومت چند-گانه نسبت به عصاره‌ی اتانولی گلسنگ با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک بررسی شد. به هفت چاهک از پلیت‌های میکروتیتر میزان ۱۰۰ میکرولیتر ازمحیط مایع مغذی مولر هینتون (MHB) اضافه شد. به چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده‌ی عصاره با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه کرده و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام گرفت. از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت، خارج و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی $۱۰^{۸}$ واحد در میلی‌لیتر معادل ۵ دهم مک فارلند اضافه شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت قرارگرفت. اولین چاهکی که از رشد باکتری پس از قراردادن در انکوباتور جلوگیری شده، به‌عنوان غلظت بازدارنده (MIC) منظورگردیده است. برای اطمینان از چاهک‌های شفاف، ۱۰ میکرولیتر برداشته به محیط مولر هینتون آگار منتقل شده‌است و پس از ٢٤ ساعت اولین رقتی که توانسته‌بود ۹۹/۹ درصد باکتری را

از بین ببرد، به‌عنوان حداقل غلظت‌کشنده نشان داده شد که براساس تعداد کلنی‌های باکتری مشخص گردیده‌است.

یافته‌ها

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی گلسنگ R. hyrcana در غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ی باکتری‌های گرم مثبت و منفی است. نتایج نشان داد که عصاره‌ی گلسنگ در همه‌ی غلظت‌ها مهارکننده‌ی استافیلوکوکوس اورئوس است و بعد از استافیلوکوکوس اورئوس کمترین غلظت مهارکننده مربوط به باکتری‌های هافنیا و اسینتو باکتر می‌باشد (۱۲/۵ppm) (جدول۱).

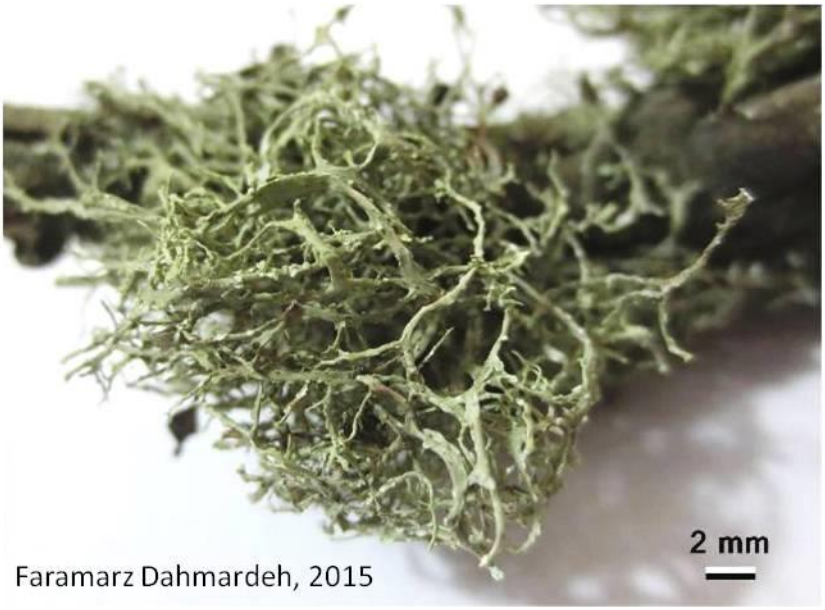
بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی اتانولی گونه گلسنگی R. hyrcana مهارکننده‌ی باکتری-های گرم مثبت و منفی می‌باشد. این خاصیّتِ مهارکنندگی به‌خاطر حضور دو ماده‌ی اوسنیک اسید وsekikaic acid می‌باشد که قبلاً وجود آنها در این گونه مورد تأیید قرارگرفته است (۱٤). اوسنیک اسید یکی از متابولیت‌های ثانویه گلسنگی می‌باشد که به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرارگرفته است (۱۵). این اسید به دو شکل انانتیومری در طبیعت وجود دارد، اما هرگز این دو شکل، با یکدیگر در یک گلسنگ وجود ندارند (۱۰). اوسنیک اسید فعالیت

جدول۱: نتایج حاصل از اثرات ضدمیکروبی عصاره‌ی گلسنگ در برابر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

باکتری‌های استاندارد	حداقل غلظت مهارکنندگی (ppm)	الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی
Staphylococcus aureus	عدم رشد	E,CE,TE
Streptococcus pyogenes	۲۵	-
Streptococcus pneumoniae	۵۰	E,CE,CF
Hafnia alvei	۱۲/۵	E,TE
Streptococcus saprophyticus	۵۰	E,CF,TE
Acinetobacter baumannii	۱۲/۵	CE,TE
Enterococcus faecalis	۲۵	E,CE
Proteus mirabilis	۲۵	E,TE
Serratia marcescens	۲۵	CE

E= Erythromycin, CE= Cefixime ,CF= Ceftazidime, TE= Tetracyclin



شکل ۱: نمای ظاهری گونه Ramalina hyrcana Sipman

ضدباکتریایی به‌ویژه علیه باکتری‌های گرم مثبت از خود نشان می‌دهد (١٦) که این نقش آنتی‌بیوتیکی را ازطریق مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو انجام می‌دهد (٤).

ولدبیگی و مرادی خواص ضدباکتریایی عصاره‌ی استونی و متانولی سه گونه‌ی گلسنگی Megaspora Valadb. & A. Nordinrimisorediata، Fulgensia Elenkinfulgens (Sw.) و Placidium Breusssemaforonense (Breuss) را علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، بررسی و گزارش کردند که عصاره‌ی استونی گلسنگ‌های فوق و عصاره‌ی متانولی گونه M. rimisorediata فاقد اثر ضدمیکروبی هستند. نتایج به‌دست آمده همچنین بیانگر این بود که از بین باکتری‌های گرم مثبت، عصاره‌ی متانولی P. semaforonense به‌ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را بر روی استافیلوکوک اپیدرمیس و انتروکوکوس فکالیس و ازمیان باکتری‌های گرم منفی به‌ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را بر روی پروتئوس میرابیلیس و کلبسیلا پنومونیه دارد. اعمال عصاره‌ی متانولی F. fulgens بر روی باکتری-های گرم مثبت نشان داد که این عصاره، تاثیری بر روی باکتری انتروکوکوس فکالیس ندارد، ولی بر روی استافیلوکوک اپیدرمیس، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوک اورئوس تاثیری قابل توجه دارد و این عصاره در بین باکتری‌های گرم منفی به‌ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را بر روی باکتری اشرشیا کلی و انتروباکتر آئروژنز داشت (١٧).

نتایج تحقیقات کاراگوز و همکاران نشان داد که عصاره‌ی اتانولی گونه‌ی گلسنگی Ramalina farinacea (L.) Ach. بهترین اثرمهاری را به‌ترتیب علیه سویه‌های باکتریایی Staphylococcus aureus، Bacillus subtilis و Staphylococcus pidermidis دارد (١٨). در مطالعه‌ی شاپوری و همکاران، نتایج نشان داد که MIC عصاره‌ی استونی گلسنگ Xhantoria elegance SP برای بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس ٢١٧/٥ میلی‌گرم بر میلی-لیتر و عصاره‌ی اتانولی به‌ترتیب ٤٧ و ٩٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است (١٩). تیپّس‌وامی و همکاران اثر ضد-باکتریایی عصاره‌ی اتانولی گونه‌ی گلسنگی Usnea longissima Ach. را علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قراردارند و گزارش نمودند که عصاره-ی اتانولی این گونه، اثر ضدباکتریایی معناداری علیه باکتری گرم مثبت Staphylococcus aureus و باکتری‌های گرم منفی Pseudomonas aeruginosa، Klebsiella pneumoniae، Shigella dysenteriae، Salmonella typhi دارد (٢٠). پویدل و همکاران اثر ضدباکتریایی عصاره‌ی خام و ٥ ترکیب جدا شده از گونه‌ی Ramalina terebrata Hook. f. & Taylor (شامل usnic acid، usimine A، usimine B، usimine C و ramalin) را مورد مطالعه قراردادند که تمامی این تست‌ها اثر ضدباکتریایی علیه سویه‌ی Bacillus subtilis داشتند و از این میان، تنها عصاره‌ی خام و اوسنیک اسید دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه‌ی Staphylococcus aureus را از خود نشان دادند (٢١). در پژوهشی دیگر، سی‌سودیا و همکارانش گزارش نمودند که عصاره‌ی هگزان تهیه شده از گلسنگ Ramalina roesleri (Hochst. ex Schaer.) Nyl. علیه جدایه‌های باکتریایی Staphylococcus aureus و Streptococcus mutans دارای اثر بازدارندگی بسیار فعال می‌باشد (٢٢).

هوشری گزارش‌نمود که عصاره‌ی متانولی Ramalina pacifica Asahina هر دوی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را مهارمی‌کند (٢٣). Everniastrum crrhatum (Fr.) Hale ex Sipman یک گلسنگ برگی است که به میزان زیادی در نواحی گرمسیری هیمالیا، بخش مرکزی هند و ارتفاعات مرتفع جنوب هند رشد می‌کند. عصاره‌ی این گونه‌ی گلسنگی فعالیت آنتی-باکتریال علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و فعالیت ضد قارچی علیه Aspergillus nigra و Aspergillus fumigates را نشان داده است. تجزیه و تحلیل فیتو-

شیمیایی عصاره‌ی این گونه‌ی گلسنگی، وجود آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها و ترپنوئیدها را مشخص کرده است (۸).

با توجه به نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، مشخص گردید که عصاره‌ی اتانولی گلسنگ R. hyrcana دارای اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان یک منبع طبیعی برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق، به‌کار گرفته شود. با این حال استفاده‌ی بالینی از این گونه گلسنگی، نیازمند مطالعات بیشتر و جامع‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل طرح پژوهشی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان به شماره‌ی ٦٨٨٠ مورخ ۱۳۹۳/۹/۹ می‌باشد. لذا بدینوسیله نویسندگان مقاله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان به‌خاطر حمایت از این پژوهش و همچنین از خانم طیبه اختر به‌دلیل دراختیار گذاشتن نمونه‌ی گلسنگی جهت این مطالعه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Ramos DdBM, Gomes FS, Napoleão TH, Paiva PMG, Silva MDC, Barroso Coelho LCB. Antimicrobial Activity of Cladonia verticillaris Lichen Preparations on Bacteria and Fungi of Medical Importance. Chinese Journal of Biology. 2014; 1-7.
2. Lutzoni F, Miadlikowska J. Lichens. Current Biology. 2009; 19(13):R502-R3.
3. Sati S, Joshi S. Antibacterial activity of the Himalayan lichen Parmotrema nilgherrense extracts. British Microbiology Research Journal. 2011; 1(2): 26-32.
4. Nash TH. Lichen biology. Cambridge University Press: 2008.
5. Lüttge U, Beyschlag W, Büdel B. Francis D, editors. Progress in botany. New York: Springer.2012.
6. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, et al. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. Int JMol Sci. 2011; 12(8): 5428-48.
7. Kuo TM, Gardner H. Lipid biotechnology. Florida: CRC Press: 2002.
8. Gayathri D, Swamy CT. Lichens: a novel and potential source as antimicrobials for human use. J Phytol. 2012; 4(1): 38-43.
9. Galun M. CRC handbook of lichenology. Florida: CRC Press: 1988.
10. Dailey RN. Toxicity of Xanthoparmelia Chlorochroa and the Lichen Substance (+)-usnic Acid in Ruminants: ProQuest: 2008.
11. Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA. Monitoring with lichens—monitoring lichens. Springer: 2002.
12. Piccolo A. Humic substances in terrestrial ecosystems. Elsevier. 1996.
13. Devi GK, Anantharaman P, Kathiresan K, Balasubramanian T. Antimicrobial activities of the lichen Roccella belangeriana (Awasthi) from mangroves of Gulf of Mannar. Indian J Geo-Mar Sci.2011; 40(3): 449-53.
14. Lumbsch HT, Chaves-Chaves JL, Umaña-Tenorio L, Lücking R. One hundred new species of lichenized fungi: a signature of undiscovered global diversity. Phytotaxa. 2011; 18: 1-127.
15. Shukla V, Upreti D, Bajpai R. Lichens to Biomonitor the Environment, Springer, 2013.
16. Mehrotra R, Aneja K. An introduction to mycology. New Age International: 1990.
17. Valadbeigi T, Moradi H. An investigation of antibacterial effect of methanol and acetone extracts in some lichens in Ilam. Biological Journal of Microorganism. 2013; 2(5): 43- 50. [Persian]
18. Karagoz A, Dogruoz N, Zeybek Z, Aslan A. Antibacterial activity of some lichen extracts. J Med Plants Res. 2009; 3(12): 1034-9.
19. Shapouri R, Nasiri Semnani Sh, Alizadeh H. Antimicrobial effect of Xhantaria elegance sp. extracts on Brucella abortus and Brucella melitensis in vitro and in animal models. J Rostamineh Zabol Univ Med Sci. 2013; 5 (3): 39-46. [Persian]
20. Thippeswamy B, Naveenkumar KJ, Bodharthi JG, Shivaprasad SR. Antimicrobial activity of ethanolic extract of Usnea longissima. J Exp Sci. 2011; 2(12):1-3.
21. Paudel B, Bhattarai HD, Lee HK, Oh H, Shin HW, Yim JH. Antibacterial activities of Ramalin, usnic acid and its three derivatives isolated from the Antarctic lichen Ramalina terebrata. ZNaturforsch C. 2010; 65(1-2):34-8.

22. Sisodia R, Verma S, Rani A, Dureja P. Antibacterial and antioxidant activity of lichen species Ramalina roesleri. Natural product research. 2013; 27(23):2235-9.
23. Hoskeri HJ, Krishna V, Amruthavalli C. Effects of extracts from lichen Ramalina pacifica against clinically infectious bacteria. Researcher. 2010; 2: 81-5.

Original Article

An Investigation of Antimicrobial Effects of Ethanol Extract of the Lichen Ramalina hyrcana Sipman on Human Disease-causing Bacteria

Mohammad Bokaeian.,
Assistant Professor, Infection Diseases and Tropical Medicine Research Center. Zahedan University of Medical Sciences. Zahedan, Iran.

**** Faramarz Dahmardeh.,***
M. Sc of biology, Plant science-Plant systematic, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

Mohammad Sohrabi.,
Assistant Professor of Iranian Research Organization for Sciences and Technology, Tehran, Iran

Saeide Saeidi.,
M. Sc of Microbiology, Infection Diseases and Tropical Medicine Research Center. Zahedan University of Medical Sciences. Zahedan, Iran

Received:08/03/2015**, Revised:**14/04/2015**, Accepted:**24/05/2015

Corresponding Author:
Faramarz Dahmardeh,
Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol,
Zabol, Iran.
E-mail:
faramarz.dahmardeh@gmail.com

Abstract

Background: Infectious diseases are an important cause of mortality in the world. Because of resistance of some human pathogenic bacteria to antibiotics, use of natural and herbal medicine is increasing to control these factors. The aim of this study is to investigate the antibacterial effects of Ramalina hyrcana Sipman lichens against many Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Materials and Methods: The lichen ethanol extract was prepared by using a rotary machine. Nine standard strains of Gram- positive and Gram -negative bacteria were cultured in nutrient broth. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the micro dilution method.

Results: The results of this study showed that the lichen R. hyrcana extract in different concentrations inhibited both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The results showed that the lichen extract of all concentrations inhibited of Staphylococcus aureus. After S. aureus bacteria inhibition, the minimum inhibitory concentrations are for Hafnia and Acinetobacter (12.5 ppm).

Conclusion: According to the results and other reports in this area, lichen R. hyrcana extract could be introduced as a biological control agent. However, for the use of different lichen extracts for clinical application, the chemical analysis of extracts and clinical research is necessary.

Keywords: *Antimicrobial activity, Ethanol extract, Lichen, Ramalina hyrcana*