

***P. furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea* ve *Parmelina tiliaceae* (Hoffm.) Ach. Liken Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi**

Sinem AYDIN*, Kadir KINALIOĞLU*

* Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 28100, GİRESUN
Sorumlu yazar: ozdogansnm@mynet.com

Özet

Bu çalışmada, *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* ve *Parmelina tiliaceae* likenlerinin değişik çözücülerle hazırlanmış ayrı ayrı ve kombine ekstraktlarının gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Deneysel sonuçlarında, liken ekstraktlarının gram pozitif bakterilere etki ettiği ancak gram negatif bakterilere etki etmediği gözlemlenmiştir. Kombine edilmiş liken ekstraktlarının birbirlerinin antimikrobiyal aktiviteleri üzerindeki antogonistik ve sinerjistik etkileri de araştırılmış ve *Parmelina tiliaceae* likeninin *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* likeni üzerine antogonistik etki gösterdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, Sinerjistik, Antogonistik, *Parmelina tiliaceae*, *Pseudevernia furfuracea* var. *Furfuracea*,

Antimicrobial Activity of the Lichen Extracts of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea* and *Parmelina tiliaceae* (Hoffm.)

Abstract

In this study, antimicrobial activity of single or combine extracts of *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* and *Parmelina tiliaceae* which were prepared in different solvents were investigated against gram positive and gram negative bacteria. Extracts of lichens have shown antimicrobial activity against gram positive bacteria but they have no antimicrobial activity against gram-negative bacteria in test results. In addition, antogonistic and synergistic effects of combined extracts of lichen were investigated. It was seen that extracts of *Parmelina tiliaceae* have antogonistic effect on extracts of *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea*.

Keywords: Antimicrobial activity, Synergistic, Antogonistic, *Parmelina tiliaceae*, *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea*

Giriş

Antibiyotiklerin aşırı kullanımı nedeniyle pek çok mikroorganizma antibiyotiklere direnç kazanmıştır. Antibiyotik direnci küresel bir sorun haline gelmiştir. Bu nedenle de yeni antibiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni antibiyotiklerin araştırılması farklı kaynaklardan antimikrobiyal maddelerin değişik mikroorganizmalar üzerine test edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Yeni antibiyotikler elde etmenin bir diğer yolu da, tıbbi bitkilerle ilgili tecrübelerden yararlanmaktır (Lauterwein ve ark., 1995).

Kemotörapatiklerin başarısızlığa uğraması ve antibiyotiğe dirençli patojenik mikroorganizmaların enfeksiyonları, antimikrobiyal aktiviteleri açısından pek çok bitki sekonder metabolitinin araştırılmasına neden olmuştur (Jigna ve Chanda, 2007). Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) tarafından gerçekleştirilmiş bir çalışmada, dünya üzerinde hastalıkları tedavi etmede kullanılan tıbbi bitki türlerinin sayısının yaklaşık 20.000 kadar olduğu belirtilmiştir (Aslan ve ark., 1999).

Likenler bir mantar (mikobiont) ve bir ya da iki algden (fotobiont) meydana gelen simbiyotik birlikteliklerdir. Hava kirleticilerine karşı çok hassas olup havası kirli bölgelerde sayıları azalır yada tamamen yok olurlar. Likenler parfüm endüstrisinde fiksatif olarak kullanılırlar. Ayrıca alkol üretiminde, hayvan ve insanlar için besin kaynağı olarak ve ilaç endüstrisinde de kullanılırlar.

Likenler, ilaç endüstrisinde kullanılan pek çok biyolojik aktif metabolit içermektedir. Likenler, bu antibiyotik etkili bileşikleri patojenik mikroorganizmalardan korunmak amacıyla üretirler. Antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı likenler, antibiyotik kaynağı olarak pek çok araştırmacının ilgisini çekmiştir (Rankovic ve ark., 2009).

Likenler, yavaş üremelerinden kaynaklanan zayıf rekabet dezavantajlarını ürettikleri antimikrobiyal maddeler sayesinde telafi ederler. Özellikle aromatik yapılı sekonder metabolitleri, en güçlü maddelerini oluşturmaktadır (Aslan ve ark.,1999).

Liken ekstratları yüzyıllardır halk arasında kullanılmaktadır. Milattan sonra 18. yy' da liken ekstratları Mısır'da tıbbi amaçlı kullanılmıştır. Likenlerdeki farmasötik araştırmalar, 1950'lerde antimikrobiyal bileşiklerin bulunmasıyla başlamıştır (Lauterwein ve ark., 1995).

Son zamanlarda, araştırmalar liken metabolitleri ve onların antimikrobiyal aktiviteleri üzerine yoğunlaşmıştır. Yaklaşık 300 liken metaboliti araştırılmıştır (Aslan ve ark., 1999).

Bu çalışmanın amacı, *P. furfuracea* var. ve *P. tiliaceae* likenlerinin farklı çözücülerle hazırlanmış tek ve/veya kombine ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini ve kombine edilmiş iki liken türü ekstraktının birbirlerinin antimikrobiyal aktiviteleri üzerindeki antoganistik ve sinerjistik etkilerini belirlemektir.

Materyal ve Metod

Test Mikroorganizmaları

Liken örneklerinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için 5 gram(-) ve 5 gram(+) bakteri kullanıldı. Çalışmada kullanılan bakteriler şunlardır: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Enterobacter cloaceae* ATCC 13047 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Bakteriyal kültürler Nutrient Agarda büyütülmüş bakterilerden alınan tek koloninin 5 ml Müller Hinton Broth'a inoküle edilerek 1 gece çalkalayıcı su banyosunda 37°C'de bekletilmesiyle hazırlanmıştır (Türk ve ark, 2003). *Listeria monocytogenes* ise 30°C'de inkübe edilerek hazırlanmıştır.

Liken Örneklerinin Toplanması ve Tanımlanması

Liken örnekleri Giresun ili Dereli ilçesi Aymaç mevkiinden toplanmıştır. Örnekler toplandıktan sonra 48 saat oda sıcaklığında kurutulmuştur. Örneklerin tayin edilmesinde çeşitli flora kitaplarından yararlanılmıştır (Purvis ve ark., 1992).

Liken Örneklerinin Ekstraksiyonu

P.furfuracea var. *furfuracea* ve *P. tiliaceae*: Liken örnekleri oda sıcaklığında 48 saat kurutulduktan sonra toz haline getirilmiştir. Liken örneklerinin ekstraksiyonunda kloroform ve etanol çözücülerini kullanılmıştır. 10 gr liken ve 100 ml kloroform soxhlet cihazında 7 saat ekstraksiyona bırakılmıştır. Benzer şekilde 10 gr liken ve 100 ml etanol soxhlet cihazında 7 saat ekstraksiyona bırakılmıştır.

Ekstraktlar Whatman (No:1) filtre kâğıdıyla filtre edildikten sonra 40 °C'de döner buharlaştırıcıda çözücüsü uçana kadar bekletilmiştir. Katı maddeler ileriki testler için dondurucuda - 80° C'de bekletilmiştir (Rankovic ve ark., 2009).

Test Ekstraktlarının Hazırlanması ve Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

P. furfuracea var. *furfuracea*'nın kuru ekstraktlarının etanol, dietil eter, kloroform ve asetonda ayrı ayrı 15 mg/500 ml konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan her ekstrakt 0.45 mikrometre çapında Millipore filtreyle filtre edilmiştir. Benzer şekilde, *P. tiliaceae*'nin kuru ekstraktlarının etanol, dietil eter, kloroform ve asetonda ayrı ayrı 15 mg/500 ml konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan her ekstrakt 0.45 mikrometre çapında Millipore filtreyle filtre edilmiştir.

Kombine ekstraktların hazırlanması

Bütün *P. furfuracea* var. *furfuracea* - *P. tiliaceae* likenleri ve farklı solventler 15'er mg/500 ml oranında karıştırılarak son konsantrasyon 30 mg/ml olacak şekilde ekstraktlar elde edilmiştir.

Agar Kuyu Difüzyon Deneyi

10⁸ CFU/ml bakteri içeren 200 mikrolitre süspansiyon Müller Hinton Agar(MHA) üzerine yayılmıştır. 10⁸ CFU/ml bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland Standard Konsantrasyonuna göre spektrofotometrede ölçülmüştür. MHA üzerinde 6 mm kuyucuklar açılmış (Boyanova ve ark., 2005), ve bu kuyucuklara ayrı ayrı 30 mikrolitre *P. furfuracea* var. *furfuracea* ekstraktı; *P. tiliaceae* ekstraktı, çözücü ve *P. tiliaceae* + *P. furfuracea* var. *furfuracea* kombine ekstraktı konmuştur. Bu her bir çözücü için tekrarlanmıştır. Petriler 37 °C'de 24 saat bekletilmiştir ve inhibisyon zonlarının çapı milimetrik olarak ölçülmüştür. Tüm testler iki tekrarlı yürütülmüştür.

Tartışma ve Sonuç

P. furfuracea var. *furfuracea* ve *P. tiliaceae* likenlerinin çeşitli ekstraktlarının (Dietil eter ekstraktı, Aseton ekstraktı, Etanol ekstraktı, Kloroform ekstraktı) antimikrobiyal aktivitelerini göstermek amacıyla yapılan deneylerin sonuçları aşağıdaki tablolarda görülmektedir (Tablo 1–4).

Tablo 1. Liken örneklerinin dietil eter ekstraktının oluşturduğu inhibisyon zonları (mm).

Mikroorganizmalar	<i>P.furfuracea</i> <i>var.furfuracea</i>	<i>Parmelina</i> <i>tiliaceae</i>	<i>Pseudevernia furfuracea</i> var. <i>furfuracea</i> + <i>Parmelina tiliaceae</i>	Kontrol
<i>Bacillus subtilis</i>	15	12	14	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	0	13	0
<i>Salmonella enterica serovar</i> <i>thphymurium</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24	15	21	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	13	10	11	0
<i>Enterobacter cloaceae</i>	0	0	0	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0	0	0	0

Tablo 2. Liken örneklerinin aseton ekstraktının oluşturduğu inhibisyon zonları(mm)

Mikroorganizmalar	<i>P.furfuracea</i> <i>var.furfuracea</i>	<i>Parmelina</i> <i>tiliaceae</i>	<i>Pseudevernia furfuracea</i> var. <i>furfuracea</i> + <i>Parmelina tiliaceae</i>	Kontrol
<i>Bacillus subtilis</i>	15	11	14	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	0	18	0
<i>Salmonella enterica serovar</i> <i>thphymurium</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24	13	16	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	18	13	17	0
<i>Enterobacter cloaceae</i>	0	0	0	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0	0	0	0

Tablo 3. Liken örneklerinin etanol ekstraktının oluşturduğu inhibisyon zonları (mm).

Mikroorganizmalar	<i>P.furfuracea</i> <i>var.furfuracea</i>	<i>Parmelina</i> <i>tiliaceae</i>	<i>Pseudevernia furfuracea</i> var. <i>furfuracea</i> + <i>Parmelina tiliaceae</i>	Kontrol
<i>Bacillus subtilis</i>	13	0	10	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	0	12	0
<i>Salmonella enterica serovar</i> <i>thphymurium</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25	15	17	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	22	16	18	0
<i>Enterobacter cloaceae</i>	0	0	0	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0	0	0	0

Tablo 4. Liken örneklerinin kloroform ekstraktının oluşturduğu inhibisyon zonları(mm)

Mikroorganizmalar	<i>P.furfuracea</i> <i>var.furfuracea</i>	<i>Parmelina</i> <i>tiliaceae</i>	<i>Pseudevernia furfuracea</i> var. <i>furfuracea</i> + <i>Parmelina tiliaceae</i>	Kontrol
<i>Bacillus subtilis</i>	17	0	16	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	13	14	0
<i>Salmonella enterica serovar</i> <i>thphymurium</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	23	12	13	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	21	17	22	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0	0	0	0

Sonuçların gösterdiği üzere, *P. furfuracea* var. *furfuracea* 'den hazırlanan tüm ekstraktlarının gram(-) bakterilere hiç etkisi olmamasına rağmen, gram(+) bakterilerin tümüne karşı (*E. faecalis* hariç) etkilerinin olduğu gözlenmiştir. *P. tiliaceae* likeni de gram(-) bakterilere karşı hiçbir aktivite göstermezken gram(+) bakterilerin büyük bir kısmına karşı aktivite göstermiştir. Bu iki likenin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri kıyaslandığında, *P. furfuracea* var. *furfuracea* likeninin *P. tiliaceae*'den daha aktif olduğu görülmüştür.

Liken maddeleri gram(+) bakterilere antimikrobiyal aktivite gösterdikleri halde, gram(-) bakterilere karşı hiç bir etki göstermemektedir. Bu özellik gram(-) bakterilerin hidrofobik ya da amfipatik moleküllere çok az permeabl olan bir dış membrana sahip olmalarındandır (Gücin ve ark., 1997). Kontrol amacıyla kullanılan ve sadece çözümleri içeren kuyucukların etrafında hiçbir inhibisyon zonu gözlenmemiştir.

Çalışmamızda; *P. furfuracea* var. *furfuracea*'nin aseton ekstresi *S. epidermidis*'e karşı 24 mm inhibisyon zonu oluştururken Gücin ve ark. (1997) yaptığı çalışmada ise *P. furfuracea* var. *furfuracea*'nin aseton ekstresi *S. epidermidis*'e karşı 11 mm inhibisyon zonu oluşturduğu saptanmıştır. Çalışmamızda, *P. furfuracea* var. *furfuracea*'nin kloroform ekstresi *S. epidermidis*'e karşı 23 mm zon oluştururken, aynı ekstre Gücin ve ark. (1997) yaptığı çalışmada *S. epidermidis*'e karşı 11.5 mm zon oluştururken, bu farklılığın nedeni; likenin yetiştiği çevre itibari ile içerdiği kimyasal maddelerin miktarlarının değişmesinden kaynaklanmaktadır. Farklı bölgelerde yetişen likenlerde yetiştirme ortamına bağlı olarak aktif madde içerikleri ve miktarları değişebilmektedir.

Öztürk ve Güven (1995) tarafından yürütülen çalışmada *P. furfuracea* var. *furfuracea* likeninin mikroorganizmalar üzerine farklı miktarlarda uygulanmasının zon miktarını nasıl etkilediğine bakılmıştır. 20 ve 50 mikrolitre *P. furfuracea* var. *furfuracea* kloroform ekstraktından *S. aureus*'a karşı herhangi bir aktivite gözlemlenmemesine karşın, çalışmamızda 30 mikrolitre *P. furfuracea* var. *furfuracea* kloroform ekstresiyle *S. aureus*'a karşı 18 mm'e varan zonlar gözlemlenmiştir. Bu farklılığın nedeni; yukarıda da bahsedildiği gibi likenin yetiştiği çevre itibari ile içerdiği kimyasal maddelerin miktarlarının değişmesinden kaynaklanmaktadır.

P. furfuracea var. *furfuracea*'nın test mikroorganizmalarına karşı gösterdiği en geniş zon; *P. furfuracea* var. *furfuracea*'nın etanol ekstraktının *S. epidermidis*'e karşı oluşturduğu 25 mm çapındaki zondur. Bu zon ayrıca çalışmada rastlanılan en geniş zon'dur.

Duman (2007)'in *P. tiliaceae* likeni ile yaptığı çalışmada, bu likenin aseton ekstraktının *S. aureus*'a etki göstermediği saptanmıştır. Benzer şekilde çalışmamızda bu bakteriye karşı herhangi bir aktivite saptanmamıştır. Duman (2007) yaptığı çalışmada; aseton ekstraktının *B. subtilis*'e karşı 9 mm çapında bir zon oluşturduğunu göstermiştir. Çalışmamızda ise aseton ekstraktının *B. subtilis*'e karşı 11 mm çapında zon oluşturduğu gözlemlenmiştir.

P. tiliaceae likeninin kloroform ekstraktının *L. monocytogenes* bakterisine karşı 17 mm çapında zon oluşturduğu saptanmıştır. Bu zon *P. tiliaceae* likeninin test mikroorganizmalarına karşı gösterdiği en geniş çaptaki zondur.

Antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilen liken örneklerinin antogonistik ve sinerjik etkilerine bakıldığında şu sonuçlar karşımıza çıkmaktadır; *P. tiliaceae* ile *P. furfuracea* var. *furfuracea*'nın dietil eter ekstraktlarından kombine edilen karışımın *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi üzerine antogonistik etki yaptığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, *P. tiliaceae* ile *P. furfuracea* var. *furfuracea*'nın aseton ekstraktlarından kombine edilen karışımın *S. epidermidis* suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesinde antogonistik etki yaptığı gözlemlenmiştir.

P. tiliaceae likeninin etanol ekstraktı ile *P. furfuracea* var. *furfuracea* etanol ekstraktı karışımının *B. subtilis*, *S. aureus* ve *S. epidermidis* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesinde antogonistik etki gözlenmiştir.

P. tiliaceae likeninin kloroform ekstraktının *P. furfuracea* var. *furfuracea* kloroform ekstraktının *S. epidermidis* bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitesi üzerine antogonistik etki yaptığı gözlenmiştir.

Kullanılan çözücülere baktığımızda her çözücünün likenin antimikrobiyal aktivitesini farklı oranlarda etkilediği görülmektedir. Araştırma sonuçları literatür çalışmalarıyla kıyaslandığında; bu araştırmada elde edilen inhibisyon zonlarının literatür çalışmalarındaki zonlardan daha farklı olduğu görülmüştür. Antimikrobiyal etkinin farklı olmasının nedeni; aktivitenin sadece ekstrenin içerdiği maddeye bağlı olmayıp, kültür vasatına, inokülasyon tipine ve miktarına ve kültür yaşına da bağlı olması şeklinde tanımlanabilir(Aslan ve ark., 1999).

Antimikrobiyal aktiviteye sahip liken türlerinin araştırılmasına yönelik çalışmamızdaki bulguların ileride likenlerle yapılacak detaylı farmasötik çalışmalara bir basamak oluşturması amaçlanmıştır.

Kaynaklar

- Aslan, A., Güllüce, M., Öğütçü, H., 1999. Bazı Likenlerin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Bir Araştırma. *Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi*, 22(2): 19–26
- Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adıgüzel, A., Şahin, F., Özkan, H. 2006. Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliaceae*, *Dermatocarpon miniatum*, *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri* and *Neofuscella pulla*’ *Pharmaceutical. Biology*, 44 (4): 247–252.
- Boyanova, L., Gergova, G., Nikolov, R., Derejian, S., Lazarova, E., Katsarov, N., Mitov, I., Krastev, Z. 2005. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 481–483
- Duman, C.D. 2007. Türkiye’de Bazı Liken Türlerinden Usnik Asitin HPLC Yöntemi ile Değerlendirilmesi ve Antimikrobiyal Aktiviteleri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 63(3): 17–21
- Gücin, F., Dülger, B., Aslan, A. 1997. *Pseudevernia furfuraceae* (L.) Zopf Antimikrobiyal Aktivitesi. *Ekoloji*, 7: 22–24.
- Jigna, P., Chanda, V.S., 2007. In Vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants. *Turkish Journal of Botany*, 31: 53–58.

- 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.
- Öztürk, Ş., Güvenç, Ş. 1995. Farklı Bölgelerden Toplanan Liken Örneği *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. Var. *furfuracea*'nin Antimikrobiyal Etkisinin Karşılaştırılması. *Turkish Journal of Botany*, 19: 145–148.
- Purvis, O.W., Coppins, B.J., Hawksworth, D.L., James, P.W., Moore, D.M. 1992. *The Lichen Flora of Great Britain and Ireland*. Natural History Museum, British Lichen Society, 710 pp.
- Rankovic, B., Mısıc, M., Sukdolak, S. 2009. Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Biologia*, 64 (1): 53–58.
- Türk, A.Ö., Yılmaz, M., Kıvanç, M., Türk, H. 2003. The Antimicrobial Activity of The Lichen. *Cetraria aculeata* and Its Protolichesterinic Acid Constituents' *Z. Naturforsch*, 58: 850–854.