

Bazı Liken Örneklerinin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

Fadime KIRAN, Atıla YILDIZ, Özlem OSMANAĞAOĞLU

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

ÖZET

Amaç: Sentetik ilaçların uzun süreli kullanımlarının yan etkilere sahip olduğu ve dirençlilik oluşturduğu bilinen bir gerçektir. Bu durum özellikle bulaşıcı hastalıkların tedavisinde önemli bir sorun teşkil etmektedir. Gelişen bu olumsuz etkiler, sentetik ilaçlara alternatif olarak şifalı bitkilerin çeşitli hastalıkların tedavilerinde kullanılabilme olasılığını ortaya koymuştur. Bu çalışmada çeşitli liken örneklerinin antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve antimikrobiyal ajanlar olarak kullanım potansiyelleri belirlenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Antimikrobiyal aktivite spektrumunun tespiti amacıyla kullanılan mikroorganizmalar, klinik ve gıda kaynaklı intoksikasyon ve enfeksiyonlarda etkili olan ve tehlike oluşturabilen gram pozitif ve gram negatif bakteriler arasından seçilmiştir. İlaveten mantarları temsilen *Aspergillus niger* RSKK 483, mayaları temsilen ise *Candida albicans* ATCC 26555 kullanılmıştır. Çankırı'nın (Türkiye) çeşitli bölgelerinden toplanan *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri*, *Lobaria pulmonaria* ve *Pseudevernia furfuracea* liken örneklerinin kloroform ve aseton ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri, disk difüzyon tekniğinin kullanımı ile tespit edilmiştir.

Bulgular: Liken ekstraktları gram pozitif bakterilere karşı oldukça güçlü bir etki göstermiştir. *Evernia divaricata* en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip liken olarak belirlenmiştir. Özellikle vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis* ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı yüksek aktivite sergilemiştir. *Pseudevernia furfuracea* ise yalnızca *Bacillus cereus* ATCC 9139, *Bacillus subtilis* ATCC 21332 ve *Bacillus sphaericus* RSKK 382 suşları üzerinde etkili olmuştur. Ayrıca, ekstraksiyon için kloroform yerine aseton kullanılması hâlinde antimikrobiyal aktivitenin maksimum oranda elde edilebileceği belirlenmiştir.

Sonuç: Çalışmada kullanılan liken örnekleri doğal antimikrobiyal etkiye sahiptirler. Ancak ilerleyen aşamalarda antimikrobiyal aktivitenin kaynağı olan doğal metabolitin belirlenmesi ve saflaştırılması gerekmektedir. Bu işlemleri takiben liken ekstraktlarının farmasötik alanlara dâhil edilmesi olası olabilir.

Anahtar kelimeler: Liken, disk difüzyon, antimikrobiyal aktivite

SUMMARY

Determination of Antimicrobial Properties of Some Lichen Samples

Objective: It is a known fact that the long term use of synthetic drugs has side effects and may lead to the development of drug resistance. This situation constitutes a major problem in the treatment of infectious diseases. These adverse effects have led to the use of medicinal plants as an alternative to synthetic drugs for the treatment of different diseases. In this study, the antimicrobial activities of various lichen samples were investigated and potential usages as new antimicrobial agents were determined.

Materials and Methods: The microorganisms used for the investigation of the antimicrobial activity spectrum, were chosen from clinical and food origin gram- positive and gram- negative bacteria which cause intoxication and infections. Additionally, *Aspergillus niger* RSKK 483 was used as a representative of the fungi and *Candida albicans* ATCC 26555 of the yeasts. The antimicrobial activity of acetone and chloroform extracts of lichen samples i.e. *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri*, *Lobaria pulmonaria* and *Pseudevernia furfuracea*, collected from different areas of Çankırı (Turkey), was determined using disc diffusion assays.

Results: Lichen extracts showed a relatively strong antibacterial activity against gram- positive bacteria. The highest antimicrobial activity was detected for *Evernia divaricata*, especially against vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Extracts of *Lobaria pulmonaria* exhibited activity only against *Bacillus cereus* ATCC 9139, *Bacillus subtilis* ATCC 21332 and *Bacillus sphaericus* RSKK 382. Furthermore, maximum antibacterial activity was determined by the use of acetone extracts in place of chloroform.

Conclusion: Lichen samples used in this study exhibited antibacterial activity. However, identification and purification of the metabolite which is responsible for this antimicrobial activity, are required to include lichen extracts as the treatment alternatives in the pharmaceutical area.

Key words: Lichen, disc diffusion, antimicrobial activity

Alındığı tarih: 16.04.2013

Kabul tarihi: 19.09.2014

Yazışma adresi: Fadime Kiran, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Tandoğan 06100 Ankara

e-posta: fkiran@science.ankara.edu.tr

GİRİŞ

Son yıllarda çeşitli insan, hayvan ve bitki hastalıklarının tedavisinde ve kontrolünde doğal kaynaklı yeni preparatların kullanımına olan ilgi giderek artmaktadır. Sentetik ilaçların uzun süreli kullanımının yan etkilere sahip olduğu ve en önemlisi dirençlilik oluşturduğu ise bilinen bir gerçektir. Bu olumsuz etkiler, sentetik ilaçlara alternatif olarak şifalı bitkilerin çeşitli hastalıkların tedavilerinde kullanılabilceğini ortaya koymuştur^(1,2). Dünya Sağlık Örgütü'nün yapmış olduğu açıklamaya göre günümüzde tıbbi alternatif olarak kullanılan 20.000'den fazla bitki türü bulunmaktadır⁽³⁾. Bunlardan yaklaşık 9000 kadarı ise Türkiye florasına kayıtlı bitki türleridir⁽⁴⁾. Likenler, bu amaçla kullanılan ve ülkemizde zengin florasıyla dikkat çeken önemli bir grup olup, fotosentetik bir ortak (alg ya da bir siyanobakter) ve mantarların (mikobiont) simbiyotik ilişkisi sonucu oluşan eşsiz bir bitki topluluğudur⁽⁵⁾. Dünyanın birçok yerinde yayılış gösteren 20.000 kadar taksonu bulunmaktadır⁽⁶⁾.

Likenler endüstride ve tıpta çeşitli amaçlarla ve çok yönlü olarak kullanılmaktadır. Bazı liken örneklerinin tarihten günümüze gıda, boya, alkol ve parfüm üretiminde kullanıldığı bilinmektedir⁽⁷⁾. Likenlerin özellikle geleneksel tıp alanında çeşitli enfeksiyon hastalıklarının tedavilerinde kullanımı oldukça eski dönemlere dayanmaktadır. Tedavi amaçlı kullanımlarının temeli mikobiont metabolizmadan elde edilen liken ikincil biyolojik metabolitlere dayanmaktadır^(8,9). Test edilen liken örneklerinin %50'sinden fazlasının antibiyotik etki gösterdiği, en etkili maddelerin ise usnik asitler, pulvunik asitler ve difatik asitler olduğu tespit edilmiştir. Bu maddelerin ise özellikle gram pozitif bakterilere, bazı maya ve mantarlara karşı aktivite gösterdiği bildirilmiştir⁽¹⁰⁾. Bununla beraber, biyolojik olarak aktif enzimlerin, polisakaritlerin ve yağ asitlerinin de potansiyel farmasötik etkiye sahip olabilecekleri rapor edilmiştir⁽⁸⁾. Gerçekleştirilen bir-

çok çalışma, liken metabolitlerinin belirtilen bu antimikrobiyal etkilerine ilaveten antimikotik, antiviral, antioksidant, antikanserojenik ve anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğunu kanıtlamıştır⁽¹¹⁻¹³⁾.

Ülkemizde liken florasına yönelik çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmasına rağmen, likenlerin biyolojik aktiviteleri ve ekonomik uygulamalarına yönelik çalışmalar oldukça az sayıdadır. Sıklıkla karşılaşılan literatür verileri, likenlerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi üzerine odaklanmaktadır. Ancak antimikrobiyal etki liken türlerine, liken örneklerinin toplandıkları vejetasyona ve ürettiği oldukları maddelere göre değişebileceğinden dolayı her çalışmadan umut verici farklı sonuçların alınabilmesi olasıdır. Bu çalışmada, Çankırı ilinin (Türkiye) çeşitli bölgelerden toplanan *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri*, *Lobaria pulmonaria* ve *Pseudevernia furfuracea* likenlerinden elde edilen aseton ve kloroform ekstraktlarının çeşitli test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Kullanılan Liken Örnekleri ve Mikroorganizmalar: Çalışmamıza dâhil edilen liken örnekleri (*Evernia divaricata*, *Evernia prunastri*, *Lobaria pulmonaria* ve *Pseudevernia furfuracea*) Çankırı ormanlık alanlarından liken toplama kurallarına uygun şekilde toplanmıştır. Laboratuvar ortamında oda sıcaklığında 48 saat süresince kurutulan bu örneklerin bir kısmı laboratuvar çalışmaları için ayrılmış bir kısmı ise Ankara Üniversitesi Herbariyumu için herbariyum materyali haline getirilerek koruma altına alınmıştır.

Liken örneklerinin antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenebilmesi amacıyla kullanılan mikroorganizmalar, son yıllarda klinik ve gıda kaynaklı intoksikasyonlarda ve enfeksiyonlarda

etkili olan ve tehlike oluşturabilen gram pozitif ve gram negatif bakteriler arasından seçilmiştir. İlâveten mantarları temsilen *Aspergillus niger* RSKK 483, mayaları temsilen ise *Candida albicans* ATCC 26555 kullanılmıştır. Standart test mikroorganizmaları Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonundan (RSKK), Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) ve Bölgesel Araştırma Laboratuvarı Koleksiyonu'ndan (NRLL, USA), klinik izolatlar Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Mikrobiyoloji Laboratuvarından, diğer izolatlar ise Ankara Üniversitesi Mikrobiyal Genetik Laboratuvarından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan kültürler ve bu kültürlerin gelişme koşulları Tablo 1'de belirtilmiştir.

Liken Ekstraktlarının Hazırlanması: Aseptik koşullarda ve oda sıcaklığında kurutulmuş 1 g liken örneği havanda homojenize edilerek toz hâline getirilmiştir. Liken örneklerinden 0.1 g alınarak 5 ml kloroform ve 5 ml aseton bulunan

tüplere ilave edilmiş ve oda ısısında 12 saat bekletilmiştir. Liken kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla 15000 devirde 20 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlar Whatman (No:1) filtre kâğıdı kullanılarak filtre edilmiş ve 40°C'de döner buharlaştırıcıda çözücü madde uçana kadar bekletilmiştir⁽¹⁴⁾. Son filtrat (20 mg/ml) 0.45 µm'lik membran filtreden (Sartorius, Almanya) geçirilerek 6 mm çapındaki steril antibiyogram disklerine 100 µl (2 mg/ml) olacak şekilde emdirilmiş ve aseptik koşullarda oda ısısında hava akımıyla kurumaları beklenmiştir.

Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi: Antimikrobiyal aktivitenin belirlenebilmesi amacıyla standart disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır⁽¹⁵⁾. Çalışmada kullanılan bakteriler Tablo 1'de belirtilen besiyerlerinde ve uygun gelişim koşullarında geliştirilmiştir. 6000 devirde 10 dakika santrifüj işlemini takiben steril serum fizyolojik ile iki kez yıkanmış ve aynı

Tablo 1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve gelişim koşulları.

| Mikroorganizma | Gelişim koşulları |
|--|---------------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> RSKK 483 | Patates dekstroz besiyeri, 27°C 3 gün |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 9139 B | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Bacillus sphaericus</i> RSKK 382 | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Carnobacterium divergens</i> NCDO 2306 | MRS besiyeri, 30°C 18 saat |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 26555 | Triptik soy besiyeri, 35°C 18 saat |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i> NRLL 3502 | MRS besiyeri, 30°C 18 saat |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | MRS besiyeri, 30°C 18 saat |
| <i>Enterococcus faecalis</i> GATA | MRS besiyeri, 30°C 18 saat |
| <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057 | MRS besiyeri, 30°C 18 saat |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Escherichia coli</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Listeria innocua</i> M40 | Triptik soy besiyeri, 35°C 18 saat |
| <i>Listeria innocua</i> B186/26B | Triptik soy besiyeri, 35°C 18 saat |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 | Triptik soy besiyeri, 35°C 18 saat |
| <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe | Triptik soy besiyeri, 35°C 18 saat |
| <i>Proteus vulgaris</i> RSKK 232 | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Salmonella enterica</i> serotype Typhimurium SL1344 | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Salmonella enteritidis</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Salmonella typhi</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Shigella flexneri</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Staphylococcus aureus</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Staphylococcus carnosus</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| Metisilin duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> GATA | Luria Bertani besiyeri, 37°C 18 saat |

Tablo 2. Çalışmada kullanılan liken ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi ♦.

| Mikroorganizma | A* | B* | C* | D* | A† | B† | C† | D† |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 9139 B | 20±1.62 | 19±2.47 | 9±0.55 | 11±0.90 | 20±0.55 | 15±0.76 | 5±0.40 | 7±0.25 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 | 18±1.51 | 12±0.75 | 8±0.75 | 10±1.25 | 17±0.15 | 11±0.83 | 4±0.15 | 8±0.40 |
| <i>Bacillus sphaericus</i> RSKK 382 | 14±1.57 | 11±2.41 | 9±1.40 | 8±0.98 | 9±1.05 | 7±0.15 | 5±0.95 | 9±0.70 |
| <i>Carnobacterium divergens</i> NCDO 2306 | 11±1.33 | 6±1.29 | 8±0.85 | 0±0.00 | 9±0.55 | 5±0.35 | 7±0.37 | 0±0.00 |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i> NRLL 3502 | 22±2.71 | 20±1.51 | 16±1.23 | 0±0.00 | 18±1.20 | 14±1.55 | 11±0.25 | 0±0.00 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 26±2.31 | 19±1.35 | 18±1.40 | 0±0.00 | 19±0.52 | 14±0.95 | 8±1.22 | 0±0.00 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> GATA | 24±3.27 | 20±2.45 | 14±2.15 | 0±0.00 | 23±1.65 | 21±1.05 | 17±1.03 | 0±0.00 |
| <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057 | 22±1.15 | 18±0.57 | 17±2.55 | 0±0.00 | 17±1.04 | 13±0.45 | 9±0.74 | 0±0.00 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | 21±1.17 | 16±0.54 | 18±3.30 | 0±0.00 | 16±0.90 | 19±0.90 | 8±0.25 | 0±0.00 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> GATA | 18±2.21 | 17±0.38 | 23±1.50 | 0±0.00 | 17±0.50 | 12±1.45 | 11±0.30 | 0±0.00 |
| <i>Staphylococcus carnosus</i> GATA | 25±1.42 | 20±0.45 | 18±2.30 | 0±0.00 | 17±0.40 | 16±0.40 | 10±0.55 | 0±0.00 |
| Metisilin duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i> GATA | 19±2.20 | 14±1.21 | 13±1.25 | 0±0.00 | 15±1.05 | 11±0.60 | 9±0.48 | 0±0.00 |
| Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> GATA | 18±1.41 | 12±0.54 | 11±2.05 | 0±0.00 | 14±0.60 | 9±0.92 | 7±0.27 | 0±0.00 |

♦ Disk difüzyon testi neticesinde elde edilen inhibisyon zonları (mm)

*Aseton ekstraksiyonu, †Kloroform ekstraksiyonu

A: *Evernia divaricata*, B: *Evernia prunastri*, C: *Lobaria pulmonaria*, D: *Pseudovernia furfuracea*
Değerler; 3 tekrarın ortalamasını ve ± standart sapmayı göstermektedir.

çözeltide son konsantrasyonu McFarland 0.5 bulanıklığına göre (yaklaşık 10^8 kob/ml) ayarlanarak çalışmalara dâhil edilmiştir. Steril eküvyon kullanımıyla uygun katı besiyeri yüzeyine yayılan bakteri süspansiyonu üzerine daha önceden hazırlanan 6 mm çapındaki diskler uygun ve eşit aralıklarla yerleştirilmiştir. Streptomisin (10 µg/disk) pozitif, steril distile su, aseton ve kloroform ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Disklerin yerleştirildiği petriyeler uygun koşullarda inkübe edilmiş ve inkübasyon sonucunda disklerin çevresinde meydana gelen inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür⁽⁴⁾. Denemeler üç bağımsız tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

Hesaplamalar ve İstatistik Analizler: İstatistiksel analizler için SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) istatistik analiz programı kullanılmıştır. Veriler varyansın tek yön analizi olan ANOVA, Tukey posthoc testi ve bağımsız t-testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm istatistik analizlerinde $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri*, *Lobaria pulmonaria* ve *Pseudovernia furfuracea* likenlerinden elde edilen aseton ve

kloroform ekstraktlarının insanlarda klinik ve gıda kökenli enfeksiyonlara neden olan bakteriler ile *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* üzerindeki antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Üç tekrarlı olarak düzenlenen deney sonuçlarının ortalama değerleri dikkate alındığında; 4 farklı türe ait liken örneklerinden elde edilen aseton ve kloroform ekstraktlarının, çalışmada kullanılan gram pozitif bakterilerden *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp.'nin çeşitli türleri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, aseton ekstraktlarının 6-26 mm arasında, kloroform ekstraktlarının ise 5-23 mm arasında inhibisyon zon çapı sergilediği tespit edilmiştir (Tablo 1). Çalışmada kullanılan likenlerin aseton ekstraktları özellikle *Enterococcus* spp.'nin çeşitli türlerine karşı kloroform ile hazırlanan ekstraktlarına göre daha büyük inhibisyon zonu göstermiştir. Ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). En yüksek inhibisyon ise *E. divericata* liken örneğinin aseton ekstraktında 26 ± 2.31 mm inhibisyon zon çapı ile *E. faecalis* ATCC 29212 şusuna karşı tespit edilmiştir. Şekil 1'de aseton ile hazırlanan liken ekstraktlarının metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri gösterilmiştir. Benzer şekilde en yüksek aktivite 18 ± 1.41 mm inhibisyon zon

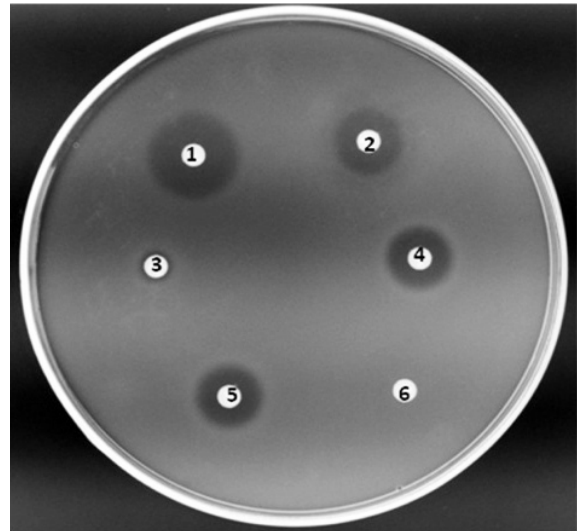
çapı ile *E. divaricata* liken türünde tespit edilmiştir. *Evernia cinsine* ait diğer tüm liken örneklerinin ise özellikle *Bacillus* spp. türlerinde diğer liken örneklerine göre daha etkin olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Buna karşılık, *P. furfuracea* türü *Bacillus* türleri dışında hiçbir patojen üzerinde etkinlik sergilememiş ve test edilen diğer liken örnekleri ile karşılaştırıldığında en düşük etkiye sahip liken olarak belirlenmiştir ($p<0.05$). Negatif kontrol amacıyla kullanılan disklerin çevresinde herhangi bir inhibisyon zonu gözlemlenmemiştir (Şekil 1). Pozitif kontrol olarak kullanılan streptomisin (10 µg/disk) antibiyotiklerinin ise, dirençli olduğu belirlenen *Enterococcus* spp.'nin çeşitli suşları hariç, diğer suşlara karşı 14-21 mm arasında inhibisyon zonu sergilediği tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Likenlerin antibiyotik özellikleri yıllardan beri bilinmektedir. Çalışmamızdan elde edilen veriler, kullanmış olduğumuz likenlerin, özellikle son yıllarda sıklıkla karşılaşılan ve klasik gıda enfeksiyonu olarak bilinen listeriosis etmeni *Listeria monocytogenes* ve salmonellosis etmeni *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ve Typhi gibi gıda kaynaklı izolatlarla karşı aktivite sergilemediğini göstermiştir. Buna karşılık, İlçim ve ark.⁽¹⁶⁾ *Parmelia furfuracea* liken türlerinin *L. monocytogenes* üzerinde antagonistik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz *Pseudovernia furfuracea* liken türü ise yalnızca *Bacillus* spp. türleri üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ancak araştırılan liken örneklerinin tamamında, gram negatif bakteriler ve mayalar üzerinde herhangi bir aktivite tespit edilememiştir. Hücre duvarı farklılıklarından dolayı gram pozitif bakterilerin, gram negatif bakterilere ve mantarlara göre daha hassas olması ile açıklanabilecek bu sonuç birçok araştırmadan elde edilen veriler ile benzer bulunmuştur⁽¹²⁻¹⁹⁾. Buna rağmen, Rowe ve ark.⁽²⁰⁾ Türkiye florasına ait *E. prunastri*, *P. furfuracea*

ve *Alectoria capillaris*'in *C. albicans*'a karşı etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Likenlerle ilgili olarak günümüze kadar yapılan çalışmalar, antimikrobiyal etkinin liken türlerine, bu türlerin içerdikleri metabolitlere, kullanılan çözücü içeriklerine ve test mikroorganizmalarına bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir⁽¹⁷⁾. Bu bilgi literatür verilerinden farklı bulunan bu sonuçların, kullanmış olduğumuz liken türlerinden ve mikroorganizmalardan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, elde edilen inhibisyon zonlarının literatür çalışmalarındaki çap büyüklüklerinden farklı olması likenlerin farklı metabolitler içerebilmeleri ile ilişkilendirilmiştir. Liken türleri aynı olsa bile, yetiştiği çevresel ortama bağlı olarak içerdikleri metabolitlerin çeşitlerinin ve miktarlarının değişebilme durumu da sonuçlar arasındaki bu farklılıkları açıklayabilmektedir⁽¹⁸⁾.

Mikroorganizmaların zamanla birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirdikleri bilinen bir gerçektir. Bu durum özellikle bulaşıcı hastalıkların tedavisinde önemli bir sorun oluşturmaktadır. Yıllardır kullanılmaları sonucunda antibiyotiklere karşı mikrobiyal direncin artma sorununda



Şekil 1. Çalışmada kullanılan ve aseton ile hazırlanan liken ekstraktlarının metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri [1: *Evernia divaricata*; 2: *Evernia prunastri*; 3: *Pseudovernia furfuracea*; 4: *Lobaria pulmonaria*; 5: Streptomisin (10 µg/disk); 6: Aseton (negatif kontrol)]

dolayı antibiyotiklere alternatif ürünler üzerine çalışmalar başlamıştır. Bu durum, antibiyotiklere karşı farklı ürünlerin geliştirilmesine neden olmuştur. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar ise likenlerinde dâhil olduğu farklı doğal kaynaklardan yeni antimikrobiyal madde üretiminin önemli bir girişim olabileceğini göstermektedir⁽¹⁾. Çalışmamızda dikkat çeken en önemli sonuç; özellikle *E. divaricata* liken türünün metisilin direçli *S. aureus* ve vankomisin dirençli *E. faecalis*'e karşı sergilemiş olduğu aktivitedir. Metisiline dirençli *S. aureus* gerek nozokomiyal gerekse toplum kaynaklı enfeksiyonlar arasında önemli ölçüde tehlikeli bir patojendir⁽²¹⁾. Özellikle çoklu ilaç dirençli *S. aureus* suşlarının, gerek sağlık sistemleri üzerindeki etkisi gerekse tedavideki başarısızlıkları oldukça ciddi sorunlara neden olmaktadır. Bu açıdan çalışmamızdan elde edilen sonuçlar insan sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir⁽²²⁾. Literatür araştırmaları bu etkinin özellikle evernik asit, lobarik asit ve usnik asit gibi liken asitlerinden kaynaklanabileceğini göstermektedir⁽²¹⁾.

Çalışmamızdan elde edilen veriler sonucunda, kullanmış olduğumuz liken türlerinin doğal antimikrobiyal etkiye sahip oldukları ve dolayısıyla başarılı bir şekilde özellikle klinik alanda çeşitli enfeksiyonların engellenmesinde kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. İlave çalışmalar, etkili bileşenlerin likenlerden saf olarak elde edilmesi ve antimikrobiyal etkiye ilaveten antioksidant ve antikanserijenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla planlanmaktadır. Sonuç olarak, liken ekstraktlarının aktif biyolojik metabolitleri, ilaç endüstrisindeki sentetik ilaçlara alternatif olup, doğal antibiyotik kaynaklı tedavi edici ajanlar olarak umut vermektedir.

KAYNAKLAR

1. **Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ogütçü H, Sengül M, Adigüzel A.** Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxicedrus* L. *J Ethnopharmacol* 2003; 85:231-5.
2. **Kosanić M, Ranković B, Stanojković T.** Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species. *Sci Food Agric* 2011; 92:1909-16. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.5559>
3. **Karthikaidevi G, Thirumaran G, Manivannan K, Anantharaman P, Kathiresan K, Balasubaramanian T.** Screening of the antibacterial properties of lichen *Roccella belangeriana* (Awasthi) from *Pichavaram Mangrove* (*Rhizophora* sp.). *Adv Biol Res* 2009; 3:127-31.
4. **Gulluce M, Aslan A, Sokmen M, et al.** Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine* 2006; 13:515-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2005.09.008>
5. **Bates ST, Cropsey GW, Caporaso JG, Knight R, Fierer N.** Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77:1309-14. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02257-10>
6. **Obob G, Ademosun AO.** Comparative studies on the ability of crude polyphenols from some nigerian citrus peels to prevent lipid peroxidation-In vitro. *Asian J Biochem* 2006; 1:169-77. <http://dx.doi.org/10.3923/ajb.2006.169.177>
7. **Kırmızıgül S, Koz O, Anıl H, İclil S.** Isolation and structure elucidation of novel natural products from Turkish lichens. *Turk J Chem* 2003; 27:493-500.
8. **Johnson CJ, Bennett JP, Biro SM, et al.** Degradation of the disease-associated prion protein by a serine protease from lichens. *PLoS One* 2011; 6:e19836. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019836>
9. **Manojlovic NT, Vasiljevic PJ, Maskovic PZ, Juskovic M, Bogdanovic-Dusanovic G.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 452431.
10. **Halama P, Van Haluwin C.** Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl* 2004; 49:95-107. <http://dx.doi.org/10.1023/B:BICO.0000009378.31023.ba>
11. **Manojlovic NT, Vasiljevic PJ, Gritsanapan W, Supabphol R, Manojlovic I.** Phytochemical and antioxidant studies of *Laurera benguelensis* growing in Thailand. *Biol Res* 2010; 43:169-76. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602010000200004>
12. **Kosanić M, Ranković B, Stanojković T.** Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of 3 *Umbilicaria* species. *J Food Sci* 2012; 77:T20-5. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02459.x>
13. **Pavlovic V, Stojanovic I, Jadranin M, et al.** Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes. *Food Chem Toxicol* 2013; 51:160-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.043>
14. **Ranković B, Mišić M, Sukdolak S.** Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Biologia* 2009; 64:53-8. <http://dx.doi.org/10.2478/s11756-009-0007-9>

15. **NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)**. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-forming Filamentous Fungi: Proposed Standard M38-P. NCCLS, 1998. Wayne, PA, USA.
16. **İlçim A, Dıġrak M, Baġcı E**. Bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması. *Tr J Biology* 1998; 22:119-25.
17. **Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Nikolić M, Tošić S, Stojčić D**. Lichens as source of versatile bioactive compounds. *Biologica Nyssana* 2011; 2:1-6.
18. **Kosanić M, Ranković B, Stanojković TP**. Antioxidant, antimicrobial, and anticancer activities of three *Parmelia* species. *J Sci Food Agric* 2012; 92:1909-16. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.5559>
19. **Yang Y, Anderson EJ**. Antimicrobial activity of a porcine myeloperoxidase against plant pathogenic bacteria and fungi. *J Appl Microbiol* 1999; 86:211-20. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00652.x>
20. **Rowe JG, Saez MT, Garcia MD**. Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de quelques lichens du sud de l'Espagne. *Annales Pharma Fr* 1989; 47:89-94.
21. **Kokobun T, Shiu WK, Gibbons S**. Inhibitory activities of lichen-derived compounds against methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Planta Med* 2007; 73:176-9. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957070>
22. **Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, et al**. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. *Clin Infect Dis* 2003; 36:429-39. <http://dx.doi.org/10.1086/346207>