

Türkiye’deki Farklı Bölgelerden İzole Edilen Likenlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri

Özlem OSMANAĞAOĞLU (*), Atilla YILDIZ (**), Sefa C. SAÇILIK (*)

ÖZET

Bu çalışmada farklı bölgelerden toplanan *Letaria vulpina*, *Pseudovernia furfuraceae* var. *furfuraceae* ve *Evernia divericata* liken örneklerinden elde edilen aseton ve kloroform ekstraktlarının Gram-pozitif çomaklar, Gram-pozitif koklar, Gram-negatif çomaklar ile *Candida albicans* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Gerek aseton gerekse kloroform ile hazırlanan ekstraktlarda Gram-pozitif kok ve çomaklara karşı inhibitör etki elde edilirken, Gram-negatif çomaklar ve *Candida albicans*’a karşı herhangi bir aktivite gözlenmemiştir. Çalışmamızda disklere emdirilen farklı ekstrakt dozları ile zon çaplarındaki artış oranları arasında herhangi bir korelasyon kurulamaz iken, ekstraksiyon için kloroform yerine aseton kullanılması durumunda inhibitör aktivitesinin göstergesi olan zonların daha büyük çaplarda elde edilebileceği gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Likenler, antimikrobiyal aktivite

SUMMARY

Antimicrobial Activity of Lichens Collected from Different Regions of Turkey

In this study, the antimicrobial activity of acetone and chloroform extracts of lichens, such as *Letaria vulpina*, *Pseudovernia furfuraceae* var. *furfuraceae* and *Evernia divericata* were tested against different Gram-positive cocci and bacilli, Gram-negative bacilli as well as the yeast, *Candida albicans*. The lichen extractions prepared by both acetone and chloroform showed inhibitory activity against Gram-positive cocci and bacilli. However, no such activity was observed against Gram-negative bacilli and *Candida albicans*. There is no correlation between different extract concentrations absorbed to discs and increments in zone diameters. The diameter of inhibitory zones were found to be larger when acetone is used instead of chloroform in extraction procedure.

Keywords: Lichens, antimicrobial activity

GİRİŞ

Liken metabolitlerinin değişik mikroorganizmalar, mayalar ve algler üzerine antagonist (antibiyotik) etki gösterdiği uzun yıllardan beri bilinmektedir (1), Denenen liken örneklerinin %50’sinden fazlasının antibiyotik etki gösterdiği, en etkili maddelerin ise usnik asitler, pulvunik asit türevleri (örneğin vulpinik asit) ve alifatik asitler olduğu ve bu maddelerin de özellikle Gram-pozitif bakterilere ve bazı funguslara antagonist aktivite gösterdiği bildirilmiştir (2). Bunlara ilaveten likenlerin antiherbivor(3, 4) ve antitümör (5) aktivite göstermeleri de diğer önemli özelliklerdendir. Ülkemizde liken florasına yönelik çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmasına karşılık, likenlerin

kimyası veya mikrobiyolojisi ile ilgili çalışmalar çok az sayıdadır. Bu konuda yapılan çalışmalar arasında *Cladonia foliacea* (Huds) Willd’den kloratranorin izolasyonu (6), *Evernia prunastri* ve *Ramalina farinacea* (L.) Ach.’den elde edilen ekstraktların Gram-pozitif bakterilere karşı etkileri (7), *Pseudovernia furfuraceae* (L.) Zopf var. *furfuraceae*’nın antimikrobiyal etkisi (8), Türkiye’deki *Hypogymnia* (Nyl.) Nyl. cinsine ait türlerin kimyasal ve taksonomik değerlendirilmesi (9) ve likenlerde var olan primer ve sekonder maddelerin özellikleri ile ilgili çalışmalar sayılabilir.

Bu çalışmada Türkiye’deki değişik bölgelerden toplanan *Letaria vulpina*, *Pseudovernia furfuraceae* var. *furfuraceae* ve *Evernia divericata* likenlerinden elde edilen aseton ve kloroform ekstraktlarının farklı mikroorganizmalar üzerine antagonist aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

(*) Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06500, Teknikokullar, Ankara

(**) Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06100, Tandoğan, Ankara

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan liken örnekleri 1995-1996 yılları arasında Kızılcahamam ve Çubuk ormanlık alanlarından toplanmıştır.

Ekstraktların hazırlanması: Kurutulan liken örneklerinden 0.1 g tartılarak, içerisinde 5 ml kloroform veya 5 ml aseton bulunan tüplere ilave edilmiş ve oda ısısında 20-25 dakika inkübe edilmiştir. Santrifüjde 15000 rpm'de çevrildikten sonra 0.45µm'lik membran filtreden (Sartorius) geçirilen ekstraktlardan 6 mm çapındaki steril kağıt disklere 50 µl, 75 µl ve 100 µl kloroform veya aseton ekstraktları emdirilmiştir. Kontrol diskler ise sadece ekstraktların içerdiği oranlarda aseton veya kloroform ile muamele edilmiştir. Bütün diskler hava akımı yardımı ile kurutulduktan sonra antibiyograma geçilmiştir.

Antibiyogram: Kirby-Bauer tarafından önerilen disk-difüzyon yöntemine göre yapılmıştır. (10). Kısaca, Mueller-Hinton sıvı besiyerinde McFarland 0.5 bulanıklılığına ayarlanan bakteri kültürlerinden steril eküvyonlar ile alınan örnekler Mueller-Hinton katı besiyerine inoküle edilmiştir. İnokülasyondan sonra aynı test mikroorganizması için aseton, kloroform ekstraktları emdirilmiş diskler ve kontrol diskleri yerleştirilmiştir. 37° C'de 1 gece inkübe edilen kültürlerdeki disklerin etrafındaki zon çapları

kaydedilmiştir. Denemeler üç tekrarlı yapılmıştır.

BULGULAR

Tablo 1'de değişik liken örneklerinden elde edilen aseton ve kloroform ekstraktlarının değişik mikroorganizmalar üzerine gösterdiği inhibitör etki zon çapları olarak belirtilmiştir. Tabloda verilen değerler, üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının ortalamalarıdır.

Çalışmamızda kullanılan liken örneklerinden hiçbirisi gerek *Candida albicans* gerekse Gram-negatif bakteriler üzerine antibakteriyel etki göstermemiştir. Test edilen Gram-negatif bakteriler şunlardır: *Shigalle flexneri* (ATCC 12022), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Alcaligenes faecalis* (ATCC 8750), *Enterobacter aerogenes* (klinik izolat), *Escherichia coli* (klinik izolat), *Proteus vulgaris* (ATCC) 6380), *Aeromonas caviae* (klinik izolat), *Klebsiella pneumoniae* (klinik izolat) ve *Pseudomonas aeruginosa* (klinik izolat)

Çalışmamızda disklere emdirilen ekstrakt dozu (50, 75 ve 100µl) artışı ile zon çapı büyüklüğü arasında herhangi bir korelasyon kurulamamıştır. Bunun aksine ekstraksiyon için kloroform yerine aseton kullanılması durumunda daha geniş zon çapları elde edildiği gözlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1: Değişik liken örneklerinin ekstraktları ile hazırlanan disklerin etrafındaki inhibisyon zonu çapları

	Aseton Ekstraksiyonu				Kloroform Ekstraksiyonu		
	1	2	3	K	1	2	3
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 10716	12*	10	18	0	10	8	16
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11	10	17	0	10	8	14
<i>Bacillus cereus</i> (izolat)	12	11	17	0	9	9	15
<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 2362	10	11	16	0	8	8	16
<i>Corynebacterium xerosis</i> ATCC 373	15	14	17	0	8	8	14
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14	13	13	0	12	8	10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	13	12	12	0	9	8	10
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	12	12	17	0	8	8	12
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	10	10	14	0	8	8	11

*

TARTIŞMA

Likenler tarafından oluşturulduğu bilinen yaklaşık 200 madde yağlı asitler ve laktonlar, zeorin grubu bileşikler, pulvik asit türevleri, kumaron türevleri, depsidler, depsidonlar ve antrokinon türevleri olmak üzere yedi grupta toplanmaktadır (2, 11). Likenler tarafından sentezlenen bu maddelerin likenlerde büyük oranda bulunması ve aynı özellikteki maddelere diğer bitki gruplarında rastlanmayışı, likenlere ayrı bir önem kazandırmaktadır (9). Likenlerin içerdiği ve antibiyotik etkisi taşıyan bu kimyasal maddelerin çok yavaş gelişen likenleri doğadaki mikroorganizmalara karşı dirençli kılarak, doğada likenler için koruyucu bir rol taşıdığı belirtilmektedir (2). Gerek şimdiki çalışmamızda gerekse daha önceden yapılmış olan çalışmalarda liken metabolitlerinin Gram-pozitif bakterilere karşı antagonist aktivite gösterdiği saptanmıştır. Gram negatif bakterilerin bu metabolitlerden etkilenmemesinin ise, bu grup bakterilerin hidrofobik veya amfipatik moleküllere çok az geçiren olan bir dış zar yapısına sahip olmasından dolayı olabileceği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. (12, 13).

Bu çalışmada aseton kullanılarak elde edilen liken ekstraktlarının Gram-pozitif bakterilerle yapılan deneylerde oluşan inhibisyon zon çapları, kloroform kullanılarak elde edilen zon çaplarına oranla daha büyük bulunmuştur. Elde edilen bu bulgu ekstraksiyon işlemi esnasında kloroform yerine aseton kullanıldığında daha iyi neticeler alınabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmamızda kullanılan *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 metisiline dirençli bir suştur. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) son 30 yıldır gerek nosokomial gerekse toplum kaynaklı infeksiyonlar arasında önemli ölçüde tehlike sinyalleri veren bir patojen olmuştur (14, 15). MRSA infeksiyonlarının tedavisinde tek seçeneğin

vankomisin olması, yeni alternatifler aranması için temel bir nedendir. Diğer çalışmalara ek olarak araştırmamızda incelenen 3 liken örneğinin, klinik açıdan oldukça önemli olan MRSA üzerinde de antagonist aktivite gösterdiğinin saptanması dikkat çekici bir bulgudur.

KAYNAKLAR

1. Burkholder PR, Evans AW, Mcveigh I, Thornton HK: Antibiotic activity of lichens, *Botany* 30: 250 (1944).
2. Vartio KO: Antibiosis in Lichens. Academic Press, P 547, New York (1973).
3. Lawrey JD: Biology of Lichenized Fungi, New York, (1984).
4. Lawrey JD: Biological role of lichen substances, *The Bryologist* 89: 111-(1986).
5. Takai M, Ueraha Y, Beisler JA: Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents, *J Med Chem* 22: 1380 (1979).
6. Güven KC, Reisch J, Güvener B, Zeybek U: *Cladonia Foliacea* (Huds.) Wildld'den metil B-orsinkarboksilat ve klaratranorin izolasyonu hakkında, *ACTA Pharmaceutica Turcica* 28: 61 (1991).
7. Tamer AÜ, Özdemir A, Türe C: Likenlerin antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma, *Anadolu Üniv. Fen-Edebiyat Derg* 3: 49 (1991).
8. Öztürk Ş, Güvenç Ş: Farklı bölgelerden toplanan liken örneği *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea*'nin antimikrobiyal etkisinin karşılaştırılması, *Tr J Botany* 19: 145 (1995)
9. Zeybek N: Likenler ve sanayide önemi, *Anadolu Üniv. Eczacılık Fakültesi Yayınları* 1: 91 (1983).
10. Bauer AW, Kirby Wmn, Sherris JC, Turck M: Antibiotic susceptibility testing by a standartized simple disc method, *Am J Clin Pathol* 45: 493 (1966).
11. Jahns HM: Collins guide to the ferns, mosses and lichens of Britain and northern and central europe Collins Grafton Street, London (1980).
12. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS: *Microbiology*, 3 rd ed. Philadelphia (1980).
13. Lawrey JD: Lichen secondary compounds: evidece for a correspondence between antiherbivore and antimicrobial function, *The Bryologist* 92: 326 (1989).
14. Barber M: Methicillin-resistant staphylococci, *J Clin Pathol* 14: 385 (1961).
15. Saravolata LD, Markowitz N, Arking L, Pohlod D, Fisher E: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemic observations during a community-acquired outbreak, *Am Intern Med* 96: 11 (1982).