

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**BİLECİK İLİNDEN TOPLANAN LİKENLERİN TANILANMASI VE BU
TÜRLERDEN ELDE EDİLEN ÖZÜTLERİN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN
VE SİTOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞULE AYBÜKE YAVUZ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ÜLKÜYE DUDU GÜL

BİLECİK, 2021

10374578

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**BİLECİK İLİNDEN TOPLANAN LİKENLERİN TANILANMASI VE BU
TÜRLERDEN ELDE EDİLEN ÖZÜTLERİN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN
VE SİTOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞULE AYBÜKE YAVUZ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ÜLKÜYE DUDU GÜL

BİLECİK, 2021

10374578

BEYAN

“Bilecik İlinden Toplanan Likenlerin Tanılanması ve Bu Türlerden Elde Edilen Özütlerin Antimikrobiyal, Antioksidan ve Sitotoksik Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı yüksek lisans tez projesinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel ahlak kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Bu tez çalışmasında hiç bir projeden destek alınmamıştır.			
DESTEK ALINMIŞTIR		DESTEK ALINMAMIŞTIR	X
Destek alındı ise;			
Destekleyen Kurum:			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)			
2- TÜBİTAK			
Diğer.....			

ŞULE AYBÜKE YAVUZ

ÖN SÖZ

Tez çalışmam boyunca danışmanlığımı yürüten, bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen, değerli danışman hocam Doç. Dr. Ülküye Dudu GÜL'e sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez deneylerimiz kapsamında yürütülen liken ekstraksiyonu çalışmalarında tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Semra İLHAN ve Emine İRDEM'e, antikanser aktivite deneylerinde tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK'e saygılarımla teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgilerinden yararlandığım Özge KAYGUSUZ ile Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN'a ve Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim dahil olmak üzere hayatımın her anında maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan değerli annem Zehra YAVUZ'a, babam Ali Cevat YAVUZ'a, ablam Elif Didem ÖZEL ve ailesine, kardeşim Bahadır Erdem YAVUZ ile eşi Gamze YAVUZ'a, yol arkadaşım Mustafa DİKİCİAŞIK'a ve kıymetli YEŞİLYURT ailesine sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda, laboratuvar çalışmalarım ve hayatımın her anında yanımda olup destek veren, beni hiç yalnız bırakmayan değerli arkadaşlarım Merve AŞIK'a, Gizem ERTEKİN'e, Hazel KARADAĞ'a, Sevinç KARAÇAM'a, Ayten KUMAŞ'a ve Gizem BAYAZIT'a teşekkür ederim.

ŞULE AYBÜKE YAVUZ

ÖZET

BİLECİK İLİNDEN TOPLANAN LİKENLERİN TANILANMASI VE BU TÜRLERDEN ELDE EDİLEN ÖZÜTLERİN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE SİTOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Mevcut ilaçların toksik etkili olması, antibiyotik direncinin gün geçtikçe artması nedeniyle doğal ve sentetik olmayan biyoaktif maddelerin keşfi ve ilaç sentezinde kullanılma potansiyellerinin belirlenmesi günümüzde oldukça önemli hale gelmiştir. Bu bağlamda likenler tarafından sentezlenen, biyoaktif özellikli sekonder bileşikler büyük ilgi görmektedir. Bu çalışma kapsamında Bilecik ilinden toplanan likenlerin moleküler tanımlaması yapılarak likenlerden elde edilen özütlerin antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktiviteleri belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla Agar Disk Difüzyon ve Mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. En yüksek antimikrobiyal aktivite *Pseudoevernia furfuracea* olarak tanımlanan liken türü ile gerçekleşmiştir ve kullanılan mikroorganizmalardan en duyarlı olan tür *E. coli* olarak belirlenmiştir. Antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacıyla DPPH giderme aktivitesi test edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitede olduğu gibi *Pseudoevernia furfuracea* liken türü en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir. Antikanser aktivitenin belirlenmesi amacıyla (3,4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi kullanılmıştır. En yüksek antikanser aktivite ise *Evernia prunastri* liken türü ile gerçekleşmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar göstermektedir ki liken özütleri antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktiviteye sahiptir. Sonuç olarak, doğal ve seçici toksisite gösteren yeni bileşiklerin sentezinde likenlerin kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir.

Anahtar Kelimeler: Liken, Özüt, Antimikrobiyal, Antioksidan, Sitotoksik aktivite

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF LICHEN SAMPLES COLLECTED FROM BILECIK AND DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC PROPERTIES OF THE EXTRACTS OBTAINED FROM THESE SPECIES

Due to the toxic effect of existing drugs and increasing antibiotic resistance, the discovery of natural and non-synthetic bioactive substances and the determination of their potential for use in drug synthesis have become very important today. In this context, secondary compounds that bioactive properties synthesized by lichens are of great interest. In the scope of this study, antimicrobial, antioxidant and anticancer activity of lichen extracts were determined by molecular identification of lichens collected from Bilecik province. Agar disc diffusion and microdilution methods were used to determine antimicrobial activity. The highest antimicrobial activity occurred with the lichen species identified as *Pseudoevernia furfuracea*, and the species most susceptible in used microorganisms has been identified as *E. coli*. DPPH removal activity has been tested to determine antioxidant capacity. As with antimicrobial activity *Pseudoevernia furfuracea* lichen species showed the highest antioxidant activity. For the purpose of determining anticancer activity (3,4,5-dimethylthiazol-2-il) -2-5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) method was used. The highest anticancer activity occurred with the lichen species *Evernia prunastri*. The results obtained within the scope of the thesis study show that lichen extracts have antimicrobial, antioxidant and anticancer activity. As a result, lichens have a high potential to be used in the synthesis of new compounds with natural and selective toxicity.

Key Words: Lichen, Extract, Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxic activity

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Likenlerin Özellikleri	3
2.2. Liken Metabolitleri.....	4
2.3. Likenlerin Kullanım Alanları.....	6
2.3.1. Endüstri Alanında Likenlerin Kullanılması.....	6
2.3.2. Gıda Alanında Likenlerin Kullanılması	7
2.3.3. Tıp Alanında Likenlerin Kullanılması.....	8
2.3.4. Likenlerin Kullanıldığı Diğer Alanlar	9
2.4. Likenlerin Antimikrobiyal Özellikleri.....	9
2.5. Likenlerin Antioksidan Özellikleri	13
2.6. Likenlerin Antikanser Özellikleri	16
2.7. Likenlerin Tanımlanması.....	19
2.7.1. Likenlerin ITS Dizi Analizi ile Tanımlanması	19
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Likenler	23
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	24
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri.....	24
3.1.4. Kullanılan Hücreler	24
3.2. Metod	26
3.2.1. Likenlerin ITS Dizi Analizi ile Tanımlanması	26

3.2.2. Likenlerden Özüt Elde Edilmesi.....	27
3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Testleri	28
3.2.4. Antioksidan Aktivite Testleri.....	29
3.2.5. Antikanser Aktivite Testleri.....	30
4. BULGULAR	32
4.1. Likenlerin ITS Dizi Analizi ile Tanımlanması	32
4.2. Likenlerden Özüt Elde Edilmesi	33
4.3. Likenlerin Antimikrobiyal Aktivitesi	34
4.4. Likenlerin Antioksidan Aktivitesi	52
4.5. Likenlerin Antikanser Aktivitesi.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
KAYNAKÇA	65
EKLER.....	76
ÖZGEÇMİŞ	78

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Antioksidan maddelerin sınıflandırılması	13
Tablo 2.2. Antikanser aktivite deneylerinde kullanılan liken türleri, hücre hatları ve uygulama yöntemleri.....	18
Tablo 2.3. ITS bölgelerinin çoğaltılmasından kullanılan primer dizileri	20
Tablo 3.1. Kullanılan hücreler ve büyüme özellikleri	25
Tablo 3.2. Hedef gen bölgelerinin amplifikasyonu için gerçekleştirilen PCR koşulları	26
Tablo 4.1. Stok liken özütlerinin kodları	33
Tablo 4.2. Agar disk difüzyon yöntemi ile elde edilen zon çapları.....	43
Tablo 4.3. Liken özütlerinin bakteriler üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları ..	48
Tablo 4.4. Liken özütlerinin mayalar üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları.....	52
Tablo 4.5. Liken özütlerinin DPPH* giderme aktivitesi	53
Tablo 4.6. Liken özütlerin IC ₅₀ değerleri	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Likenlerin sınıflandırılması.....	4
Şekil 2.2. Liken sekonder metabolitlerinin biyosentez yolları.....	5
Şekil 2.3. Mantarların ribozomal DNA bölgesi	19
Şekil 3.1. Tez çalışmasında kullanılmak üzere toplanan likenlerin doğadaki görüntüsü	23
Şekil 3.2. Tez çalışmasında kullanılan likenlerin laboratuvarındaki görüntüsü	23
Şekil 3.3. Soxhlet cihazı ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminin görüntüsü	27
Şekil 3.4. Rotary evaporatör cihazı ile gerçekleştirilen çözücünün buharlaştırılması işleminin görüntüsü	28
Şekil 4.1. ITS gen bölgelerinin PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	32
Şekil 4.2. <i>E. faecalis</i> türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü	34
Şekil 4.3. <i>B. subtilis</i> türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü	35
Şekil 4.4. <i>S. aureus</i> türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü	36
Şekil 4.5. <i>S. epidermidis</i> türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü	37
Şekil 4.6. <i>E. coli</i> türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü.....	38
Şekil 4.7. <i>S. marcescens</i> türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü	39
Şekil 4.8. <i>K. pneumoniae</i> türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü	40
Şekil 4.9. <i>P. aeruginosa</i> türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü.....	41
Şekil 4.10. <i>C. albicans</i> türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü	42
Şekil 4.11. <i>C. krusei</i> türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü.....	42
Şekil 4.12. <i>C. parapsilosis</i> türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü	43
Şekil 4.13. <i>S. aureus</i> türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü	44
Şekil 4.14. Liken özütleri ve tetrasiklinin <i>S. aureus</i> türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi	44
Şekil 4.15. <i>S. epidermidis</i> türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü	45
Şekil 4.16. Liken özütleri ve tetrasiklinin <i>S. epidermidis</i> türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi	45
Şekil 4.17. <i>E. coli</i> türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü.....	46

Şekil 4.18. Liken özütleri ve tetrasiklinin <i>E. coli</i> türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi	46
Şekil 4.19. <i>K. pneumoniae</i> türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü.....	47
Şekil 4.20. Liken özütleri ve tetrasiklinin <i>K. pneumoniae</i> türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi	47
Şekil 4.21. <i>C. albicans</i> türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü.....	49
Şekil 4.22. Liken özütleri ve flukonazolun <i>C. albicans</i> türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi	49
Şekil 4.23. <i>C. krusei</i> türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü.....	50
Şekil 4.24. Liken özütleri ve flukonazolun <i>C. krusei</i> türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi ..	50
Şekil 4.25. <i>C. parapsilosis</i> türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü.....	51
Şekil 4.26. Liken özütleri ve flukonazolun <i>C. parapsilosis</i> türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi	51
Şekil 4.27. 10 ppm liken özütü ve standart madde içeren örneklerin görüntüsü	52
Şekil 4.28. 20 ppm liken özütü ve standart madde içeren örneklerin görüntüsü	53
Şekil 4.29. Liken özütleri ve standart maddenin DPPH* giderme aktivitesi.....	54
Şekil 4.30. EM özütünün MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları % canlılık değerleri	56
Şekil 4.31. EEA özütünün MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları % canlılık değerleri	56
Şekil 4.32. Doksorubisin'in MCF-7, MDA-MB-231 ve 3T3 hücre hattı üzerindeki % canlılık değerleri.....	57

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

%: Yüzde

µg: Mikrogram

ATCC: American Type Culture Collection

bç: Baz çifti

BHT: Bütil Hidroksi Toluen

°C: Santigrat derece

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DPPH: 1,1-difenil-2-pikril hidrazil

g: Gram

ITS: Internal Transcribed Spacer

L: Litre

mg: Miligram

ml: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolar

MTT: (3,4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür

nm: Nanometre

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

ppm: parts per million

rDNA: Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit

rpm: Revolutions per minute

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

TAE: Tris Asetikasit EDTA

UV: Ultraviyole

µl: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Bir yeşil alg (Chlorophyta) ya da mavi-yeşil (Cyanophyta) alg türünün (fotobiyont) bir fungus türü (mikobiyont) ile kurduğu simbiyotik ilişki sonucunda, fizyolojik ve morfolojik olarak her iki organizmadan da farklı özellikler gösteren, liken adı verilen organizmalar oluşmuştur (Öztürk, 1995: 74; Gül vd., 2020: 1). Likenin meydana gelmesini sağlayan simbiyotik ilişkinin, yaklaşık olarak 600 milyon yıl önce başladığı düşünülmektedir (Oksanen, 2006: 725). İlk kez liken terimi, M. Ö. 4. yüzyılda Yunan botanikçi Theophrastos tarafından kullanılmıştır. Ancak likenlerin alg ve mantarların bir araya gelmesiyle ortaya çıkan yeni bir organizma olduğu ilk kez, Alman botanikçi Schwenderer tarafından ifade edilmiştir (Öztürk, 1995: 74). En uygun liken sınıflandırılması ise ilk kez, likenoloji biliminin önde gelen isimlerinden biri olan İsveçli Eric Acharius tarafından yapılmıştır (Karamanoğlu, 1971: 53). Dünya üzerinde yaklaşık olarak 20.000 liken türü, Türkiye florasında ise literatüre kayıtlı 1500'den fazla liken türü vardır (Aslan vd., 2006: 249; Ranković vd., 2007: 723; Güvenç vd., 2012: 727; Çobanoğlu, 2012: 4).

Likenler, kendisini oluşturan alg ve fungus türlerinin bile yaşayamayacağı zorlu çevre koşullarında, ürettikleri sekonder metabolitler sayesinde yaşayabilirler (Karamanoğlu, 1971: 56; Negi, 2003: 53; Manojlovic vd., 2012: 3). Likenler tarafından sentezlenen bileşikler primer ve sekonder metabolit olarak üretilir ve likenler tarafından sentezlenen yaklaşık 1000 çeşit sekonder metabolit bulunmaktadır (Mitrović vd., 2011: 5428). Likenler tarafından sentezlenen bileşiklerin sitotoksik, antiprotozoal, antiviral, antifungal, antibakteriyal, antitümör, antipiretik, antienflamatuvar, antialerjik ve analjezik gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu bildirilmiştir (Nash, 1996: 113; Ranković vd., 2007: 725; Kryukov vd., 2008: 321; Ranković vd., 2008: 1240; Paudel vd., 2008a: 1269; Muggia, 2009: 88; Mitrović vd., 2011: 5430; Güvenç vd., 2012: 728; Manojlovic vd., 2012: 5).

Eski çağlardan beri çok çeşitli alanlarda kullanılan likenlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi için yürütülen çalışmalar günümüzde büyük ilgi görmektedir. Gerek toksik etkili ilaçların canlı organizmalarda oluşturduğu hasar gerekse antibiyotik direnci nedeniyle mevcut ilaçların yetersiz kalması gibi sebepler, yeni ilaçların sentezinde kullanılabilecek potansiyele sahip bileşiklerin keşfini oldukça önemli hale getirmiştir. Likenler ise çok sayıda sekonder metabolit üretme kapasiteleri sayesinde, biyoaktif maddelerin araştırıldığı pek çok çalışmada substrat olarak kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, Bilecik ilinden toplanan liken türlerinin moleküler tanımlamalarının yapılması ve bu likenlerden elde edilen özütlerin antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktivitelerinin belirlenmesidir.



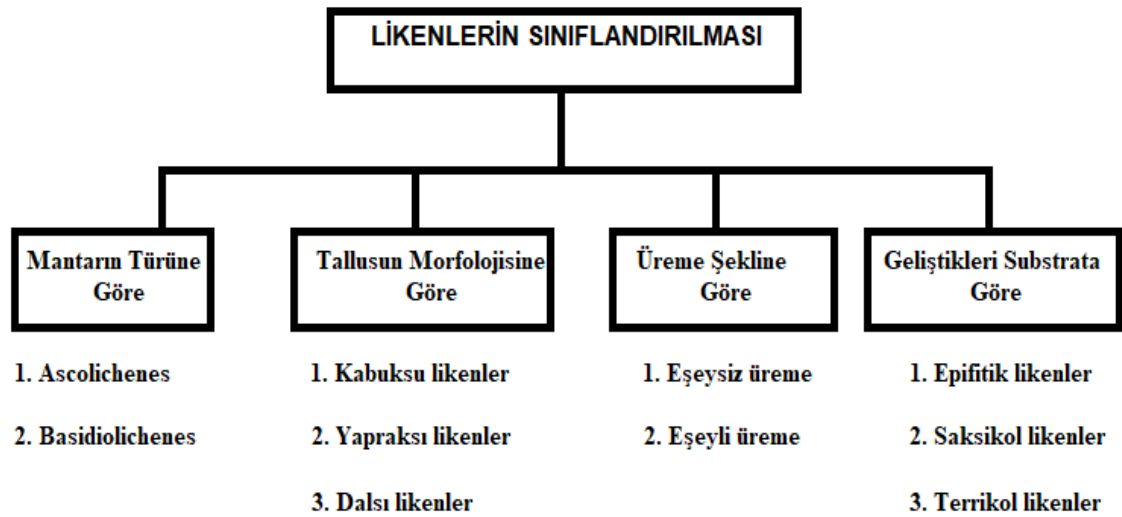
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Likenlerin Özellikleri

Fotobiyont ve mikobiyontların simbiyotik ilişkisi sonucunda meydana gelen likenler kök, gövde, dal ya da yaprak gibi yapılardan oluşmazlar ve bir likeni oluşturan yapının tamamı tallus olarak adlandırılır. Tallusun yapısı büyük oranda fungus (mantar) hifleri tarafından belirlenir çünkü genellikle dominant olan ortak mantarlardır (Tanker vd., 2007: 296). Likenler, alg ve mantarların yapıya katılma biçimine göre homomerik ve heteromerik likenler olarak adlandırılır (Handel-Mazetti, 1909: 19; Öztürk, 1995: 75). Homeomerik likenlerde alg ve mantar yapıya tek tabaka halinde homojen olarak katılırken heteromerik likenlerin yapısında tabakalaşma görülür. Heteromerik likenlerde algler, korteks ile orta tabaka arasında yer alır ve diğer tabakalarda mantar hifleri sıkı ya da gevşek dizilmiş halde bulunur. Likenlerde alg hücrelerinin oluşturduğu yapı Gonidia tabakası, mantar hiflerinin oluşturduğu yapı ise Medulla tabakası olarak adlandırılır (Öztürk, 1995: 76). Simbiyotik ilişkiye katılan alg hücreleri fotosentetik organizmalardır ve fotosentez sonucu oluşan ürünleri mantar hücreleri ile paylaşırlar. Liken yapısını tamamlayan mantarlar ise bulunduğu ortamdaki basit organik molekülleri endositoz ile hücre içine alabilen organizmalar olup ortamdan aldığı besin tuzlarını ve suyu alg hücreleri ile paylaşırlar. Bunun yanı sıra mantar hücrelerinin, fotosentez ürünleri için depo görevi gördüğü ve liken tallusunu yaşayacağı yere sabitleme işlevi olduğu düşünülmektedir (Karamanoğlu, 1971: 61; Gül vd., 2020: 2).

Likenlere en çok, ormanlar gibi temiz havanın bolca bulunduğu bölgelerde rastlanır. Temiz havanın yanı sıra likenler nem ve ışığın çok olduğu ortamlarda iyi gelişim gösterirler. Likenler -24 °C’de fotosentez yapabilmelerinin yanı sıra aylar boyunca susuz kalabilir ve 70 °C’de dahi yaşamlarını sürdürebilirler. Bu sayede kutuplarda ve çöllerde bile yaşamlarını sürdürebilen türleri bulunmaktadır. Likenler bu zorlu çevre koşullarına dayanıklı olmalarına rağmen kirli hava şartlarına dayanıklı değildirler. Bu sebeple büyük şehirlerde ve endüstrinin geliştiği bölgelerde liken florası oldukça azdır (Tanker vd., 2007: 297).

Likenler, yapıya katılan mantarın türüne göre, tallus morfolojisine göre, üreme şekillerine göre ve üzerinde geliştikleri substrata göre olmak üzere 4 farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Likenlerin sınıflandırılması Şekil 2.1.’de gösterilmiştir.



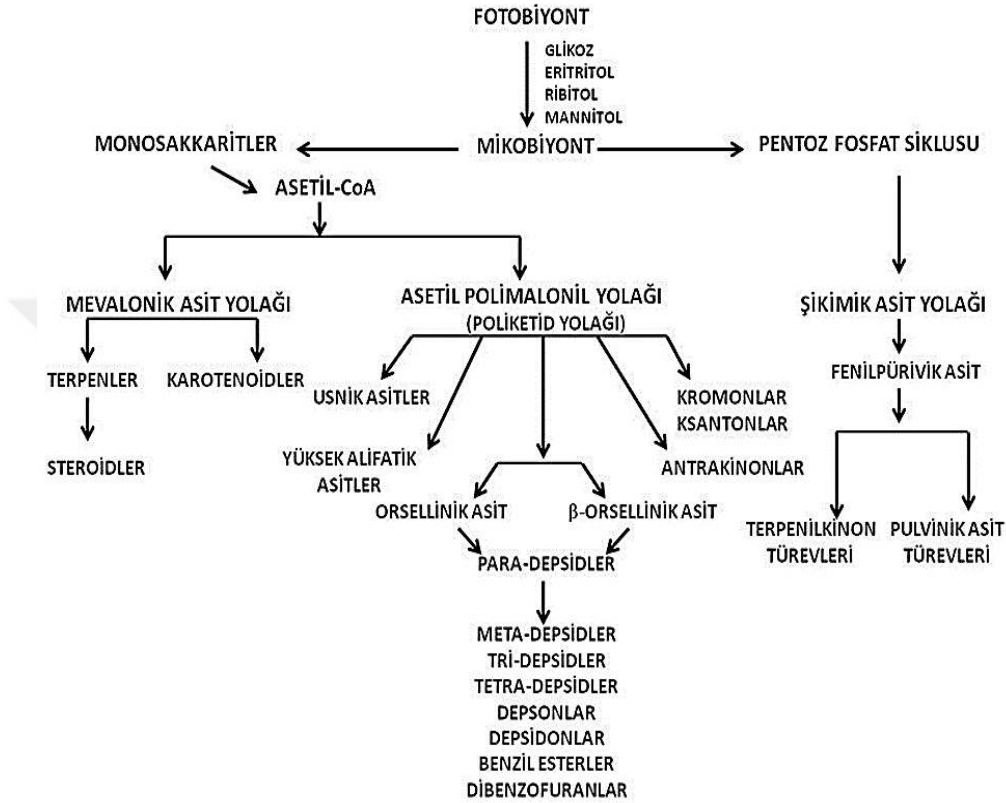
Şekil 2.1. Likenlerin sınıflandırılması

2.2. Liken Metabolitleri

Hücre içi kökenli olarak da adlandırılan primer metabolitler, alg ya da fungus tarafından sentezlenen ve likenler için spesifik olmayan maddelerdir (Shrestha ve Clair, 2013: 230). Sitoplazmik proteinler, aminoasitler, polisakkaritler, vitaminler ve karotenoidler primer metabolitlerdendir (Shrestha ve Clair, 2013: 230). Bu metabolitler genellikle suda çözünür ve ekstraksiyonları kaynar su ile gerçekleştirilir (Stocker-Wörgötter, 2008: 188).

Sekonder metabolitler ise simbiyotik ilişki sayesinde sentezlenen ve likenler için karakteristik olan maddelerdir (Müller, 2001: 11). Bu bileşiklerin çoğu ne yalnız algler ne de yalnız mantarlar tarafından üretilebilir. Liken yapısı içerisinde bulunan organik maddelerin çoğunu sekonder metabolitler oluşturur ve bu metabolitler yalnızca mikobiyontlar tarafından sentezlenmektedir (Öztürk, 1995: 77; Müller, 2001:11; Shrestha ve Clair, 2013: 331). Usnik asit, parietin, atranorin ve fungalmelanin gibi metabolitler kortekste lokalize olurken, fizodolik asit, fizodik asit ve protoketrarik asit gibi metabolitler dış yüzeydeki modüller tabakada ekstraselüler kristaller olarak lokalize olurlar (Molnár ve Farkas, 2010: 160). Sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu genellikle organik çözücüler ile gerçekleştirilir (Stocker-Wörgötter, 2008: 188).

Liken metabolitleri biyosentez yollarına göre de Poliketit yol ya da Asetil – polimalonat yolu, Mevalonik asit yolu, Şikimik asit yolu, Fikobiyontların fotosentetik ürünleri olmak üzere dört grup altında incelenmektedir (Elix ve Stocker-Wörgötter, 2008: 106). Liken sekonder metabolitlerinin biyosentez yolları Şekil 2.2.’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Liken sekonder metabolitlerinin biyosentez yolları

Kaynak: (Elix ve Stocker-Wörgötter, 2008: 106)

Liken türlerinin çoğu tallus kuru ağırlıklarının %30’una kadar, düşük molekül ağırlıklı, aromatik ve alifatik sekonder metabolitler üretebilmektedir (Huneck, 1999; Stocker-Wörgötter, 2008: 190). Ancak aynı tür likenlerin bile farklı ekosistemlerde, mevsimlerde ve coğrafi koşullarda ürettikleri sekonder matabolitlerin miktarı ve türü değişiklik gösterebilmektedir (Aoussar vd., 2020: 1). Poliketit türevli aromatik bileşiklerden ksantonlar, depsitler, dibenzofuranlar ve depsidonların yanı sıra steroidler, terpenler, esterler, pulvinik asit, laktonlar, şeker alkoller, aminoasit türevleri ve karotenoidler gibi çok çeşitli diğer bileşikler likenler tarafından sentezlenmektedir (Şekerli vd., 2017: 96). Bazı liken türlerinin A, C ve D vitaminlerini, lignin, pektin ve nişasta gibi polisakkaritleri, çeşitli protein, yağ, mineraller ile liken asitlerini sentezlediği bildirilmiştir (Öztürk, 1995: 75).

Sekonder bileşiklerin türevi olarak sentezlenen liken asitleri sayısının ise 200'e yakın olduğu düşünülmektedir. Pulvinik asit türevleri, protolikesterinik asit, depsit grubu türevi olan evernik asit, dibenzofuran türevi olan usnik asit, depsidon türevi olan lobarik, fisodik, fumarprotosetrarik asitler ve tridepsid türevi olan giroforik asit en önemli liken asitlerindendir (Asahina, 1933: 64; Tanker vd., 2007: 299; Özyiğitoğlu vd., 2017: 151; Luzina ve Salakhutdinov, 2018: 478).

2.3. Likenlerin Kullanım Alanları

Metabolizmaları sonucunda oluşturdukları bileşik çeşitliliği nedeniyle likenler endüstri, gıda, tıp ve çeşitli diğer alanlarda büyük öneme sahiptir.

2.3.1. Endüstri Alanında Likenlerin Kullanılması

Likenlerden özellikle kozmetik sanayiinde oldukça faydalanılmaktadır. Makyaj malzemesi, parfüm, şampuan ve cilt bakım ürünleri yapımında likenlerin önemli bir rolü vardır. Örneğin; UVB ışığı absorbe etmeleri ve antioksidan aktiviteleri nedeniyle pek çok koruyucu bakım kremlerinde likenler kullanılmaktadır (Müller, 2001: 13). Ayrıca likenler, koku emici ve tutucu özellikleri nedeniyle birçok parfümün içeriğine dahil edilmektedir (Schneider, 1898: 64). Likenlerin parfüm endüstrisinde çok sık kullanılmasının bir diğer önemli nedeni ise büyük bileşenler içermeleri sayesinde kolay buharlaşmamaları ve böylece fiksator role sahip olmalarıdır (Çobanoğlu, 2012: 6). Kozmetik ve özellikle parfüm endüstrisinde en çok kullanılan likenler *Parmotrema chinense*, *Parmotrema kamtschadalis*, *Parmotrema perforatum*, *Rocella fuciformis*, *Lobaria pulmonaria*, *Evernia prunastri*, *Evernia mesomorpha* ve *Pseudovernia furfuracea*'dır (Huneck, 1999; Çobanoğlu vd., 2004: 86).

Tekstil endüstrisinde ise *Lobaria pulmonaria*, *Cetraria islandica* ve *Alectoria sarmentosa* liken türleri ile *Bryoria*, *Xanthoria*, *Parmelia* ve *Alectoria* liken cinsleri kullanılmaktadır (Çobanoğlu vd., 2004: 86).

Likenlerin endüstride kullanım alanlarından bir diğeri ise alkol üretimi olmuştur. *Cladonia reingiferina*, *Cetraria islandica*, *Lobaria pulmonaria* türleri ve çeşitli diğer likenlerden alkol üretiminde yararlanılmıştır (Schneider, 1898: 135; Karamanoğlu, 1971: 63). Öncelikle likeninlerin glikoza dönüşmesi amacıyla likenler, hidroklorik asit ya da sülfürik asit ile karıştırılır ve sonra fermente edilerek alkol elde edilir (Schneider, 1904: 154).

Ayrıca boya sanayiinde ve pH indikatörü olan turnusol kağıdı üretiminde de çeşitli liken türleri kullanılmaktadır. Örneğin; *Rocella* ve *Ochrolechia* cinsine ait çeşitli liken türleri ile *Parmelia* ve *Gysophora* liken cinslerinin fermentasyonu sonucunda turnusol kağıdı ve orsey adı verilen boyar madde üretilir (Karamanoğlu, 1971: 63).

2.3.2. Gıda Alanında Likenlerin Kullanılması

Likenlerin kullanım alanlarından bir diğeri ise yiyecek ve içecek üretimi olmuştur. Eski çağlardan günümüze kadar çeşitli kültürlerin likenleri gıda olarak kullandığı bilinmektedir. İnsanlar tarafından bilinçli ya da bilinçsiz olarak tüketilmesinin yanı sıra böcekler, salyangozlar, geyikler, develer, mandalar ve sincaplar gibi pek çok hayvan da likenleri besin kaynağı olarak kullanmıştır (Öztürk, 1995: 78). Bazı likenler hoş bir aroma ve lezzete sahip olsa da birçok liken türünde bulunan kompleks polisakkaritlerin sindirimi insanlar için oldukça zordur. Bunun yanı sıra vulpunik ve usnik asit gibi asidik metabolitler üreten liken türlerinin toksik etkilere sahip, lezzetlerinin acı, sindirimlerinin ise zor olduğu bilinmektedir. Likenlerdeki bu acı tadın giderilmesi için kül ve suda yıkandıktan sonra yağ ile kaynatılması gibi çeşitli ön işlemler uygulanabilmektedir (Kuhnlein ve Turner, 1996: 418).

Cetraria islandica tarih boyunca gıda kaynağı olarak en sık kullanılan liken türü olmuştur. İskandinav ülkelerinde öğütülerek toz haline getirilen liken, patates püresi ve çeşitli unlarla karıştırılarak ekmek yapımında kullanılmıştır (Schneider, 1898: 161). Bu liken türünün Fransa'da çikolata yapımında, pastacılık sektöründe ve diyabetik ekmek üretiminde kullanıldığı bildirilmiştir (Öztürk, 1995: 78). Ayrıca ekmek yapımında *Evernia prunastri*, *Pseudovernia furfuracea*, *Lecanora esculenta* türleri de uzun yıllar boyunca lezzetli olmaları nedeniyle çokça tercih edilmiştir (Öztürk, 1995: 79).

Bryoria fremontii likeni aroma katması amacıyla çorba, et, tavuk ve balık gibi temel gıdalarla birlikte pişirilirdi (Kuhnlein ve Turner, 1996: 417). *Umbilicaria* cinsi likenler salatalarla karıştırılarak, *Cladina rangiferina* türü direkt olarak ya da meyvelerle karıştırılarak ve *Parmelia perlatd* türü baharat olarak kullanılmıştır (Karamanoğlu, 1971: 63; Çobanoğlu vd., 2004: 87).

Türkiye'de yaygın olarak görülen *Evernia prunastri*, *Pseudevernia furfuracea* türleri pekmez yapımında, *Byroia capillaris* türü ise un ve çay yapımında kullanılmaktadır (Öztürk vd., 2013: 18; Tas vd., 2017: 13).

Günümüzde gerek besin kaynaklarının artması gerekse bazı liken türlerinin zehirli etkilerinin keşfedilmesi nedeniyle likenlerin gıda olarak kullanılması oldukça azalmıştır.

2.3.3. Tıp Alanında Likenlerin Kullanılması

Likenler çok eski zamanlardan günümüze kadar geleneksel tıp alanında da önemli bir yer edinmiştir. Geleneksel Çin Tıbbı ve Geleneksel Hint Tıbbı incelendiğinde, bağırsak ve böbrek hastalıklarında, cüzzam, tüberküloz ve kuduz gibi enfeksiyon hastalıklarında, yanık ve egzama gibi cilt yaralarında, astım ve benzeri solunum hastalıklarında, geleneksel ilaçlar olarak çeşitli liken türlerinden yararlanıldığı görülmektedir (Malhotra vd., 2008: 2; Bilgin Sökmen vd., 2012: 558; Güvenç vd., 2012: 728; Mitrovic vd., 2014: 938). Eski çağlarda likenlerin tallus yapısıyla benzer morfolojiye sahip hastalıklı organın tedavisinin mümkün olacağı düşünülmüştür. Örneğin; saçları uzatmak için saça benzeyen dalsı tallusa sahip olması nedeniyle *Usnea* cinsi, sarılık hastalığında sarı renkli olduğu için *Xanthoria parietina*, akciğer hastalıklarında tallus yapısı alveollü olduğu için *Lobaria pulmonaria* (akciğer likeni) ve pamukçuk hastalığında siğil benzeri yumrulardan oluşan tallus yapısı nedeniyle *Peltigera apthosa* kullanılmıştır (Karamanoğlu, 1971: 64; Öztürk, 1995: 79; Shukla vd., 2010: 304). Modern tıpta ise tedavi amacıyla kullanılacak olan likenlerin, tallus yapısından ziyade ihtiva ettiği metabolitlerin biyolojik aktiviteleri göz önüne alınmaktadır. Örneğin; *Usnea* cinslerinin gerçekte ağrı kesici ve ateş düşürücü özelliklere sahip olduğu, *Xanthoria parietina* ve *Lobaria pulmonaria* türlerinin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve akciğer hastalıklarına yol açan tüberkülozun tedavisinde ise *Cladonia* cinsi likenlerin kullanılabileceği bildirilmiştir (Atalay vd., 2015: 1756; Tas vd., 2017: 14).

Günümüzde pek çok liken çeşidi hastalıkların tedavisinde direkt olarak ya da ilaç sentezinde etken madde olarak kullanılmaktadır. Hindistan'daki aktarlarda 'Chharila' adı altında pek çok liken türünün ikili veya daha fazla kombinasyonu ile hazırlanmış karışımlar, ateş düşürücü, damar büzücü, karın ve baş ağrıları için iyileştirici olarak satılmaktadır (Shukla vd., 2010: 304). İlaç sentezinde ve kozmetik ürünlerde ham madde olarak *Usnea densirostra*, *Usnea barbata*, *Ramalina thrausta* türü liken özütlerinden faydalanılmaktadır (Ingólfssdóttir, 2002: 730). *Cetraria* ve *Usnea* cinslerinden boğaz pastili, öksürük şurubu ve hapların sentezinde çokça yararlanılmaktadır. Özellikle İzlanda Yosunu olarak da bilinen *Cetraria islandica* 200 yılı aşkın zamandır İzlanda'da yaygın olarak 'İzlanda Scurvy' hastalığının tedavisinde, Türkiye'de ise hemoroid, bronşit, dizanteri ve tüberküloz tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır (Schneider, 1898: 163; Çolak vd., 2014: 879).

Eski çağlarda antibakteriyel olarak kullanılmış olan *Bryoria Brodo-D.Hawksw.* cinsi günümüzde sindirim sistemi düzenleyicisi ve şişkinlik gidericisi olarak, *Letharia vulpina*, iltihap kurutucu olarak, *Lobaria quercizans* Michx. akciğer ve mide hastalıkları tedavisinde, *Parmelia* cinsleri idrar yolu hastalıkları tedavisinde, *Peltigera* Willd. cinsi astım gibi akciğer hastalıklarında, yara, yanık ve çürüklerin tedavisinde ayrıca kuduz hastalığı ilaçlarının yapımında kullanılmaktadır (Çobanoğlu vd., 2004: 88).

2.3.4. Likenlerin Kullanıldığı Diğer Alanlar

Likenler yüzyıllar boyunca endüstri, gıda ve tıp alanlarının yanı sıra farklı alanlarda da substrat olarak kullanılmıştır. Örneğin; biyoindikatör olarak, hava kirliliğinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla likenler "sürekli kontrol sistemleri" olarak tanımlanmaktadır (Loppi vd., 2004: 115). Ayrıca yanıcı madde üretiminde, sigara yapımında ve dekorasyon amacıyla çeşitli liken türleri kullanılmaktadır (Çobanoğlu vd., 2004: 88).

2.4. Likenlerin Antimikrobiyal Özellikleri

Likenler tarafından sentezlenen sekonder metabolitlerin pek çoğu biyolojik olarak aktif maddelerdir. Liken sekonder metabolitlerinin biyolojik aktivite gösterdiği alanlardan biri antimikrobiyal aktivitedir. Günümüzde hastalık etkeni mikroorganizmalarla mücadelede en önemli sorunlardan bir tanesi antibiyotik direnci olduğundan araştırmacılar, alternatif doğal antimikrobiyal kaynak bulmaya yönelmiştir. Ayrıca doğal antimikrobiyal maddelerin yan etkilerinin genellikle olmaması ya da sentetik ilaçlara oranla çok az olması doğadan elde edilebilecek antimikrobiyal madde arayışlarını artırmıştır (Valle Jr vd., 2015: 533). Doğada pek çok alg, bakteri, mantar, bitki ve liken türünün kendilerini savunma amacıyla antimikrobiyal etkili bileşikler sentezlediği bilinmektedir (Gyawali ve Ibrahim, 2014: 413).

Likenler sentezledikleri sekonder metabolit çeşitliliği sayesinde alternatif antimikrobiyal kaynağı olarak değerlendirilmiş ve pek çok çalışmada substrat olarak kullanılmıştır. Likenlerle yapılan çalışmalarda, depsitler, dibenzofuranlar ve depsidonlar gibi fenolik bileşikler ve türevleri sayesinde antimikrobiyal aktivite gösterebildikleri bildirilmiştir (Ranković vd., 2008: 1240; Boustie vd., 2011: 289; Şekerli vd., 2017: 97).

Örneğin; depsid grubundan evernik asit ile dibenzofuran türevi olan usnik asitin karıştırılmasıyla evosin adı verilen, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Corynebacterium diphtheria* patojenlerine kuvvetli etki gösterebilen antimikrobiyal madde elde edilmiştir (Zeybek ve John, 1992: 39). Liken sekonder metabolitlerinden en çok antimikrobiyal aktivite gösterenler özellikle pulvinik asit, usnik asit, lobarik asit, fisodik asit, protolikesterinik asit ve fumarprotosetrarik asit olarak bildirilmiştir (Vartia, 1973: 550; Dülger vd., 1997: 104; Ingólfssdóttir, 2002: 731; Boustie ve Grube, 2005: 273).

Ingólfssdóttir ve arkadaşları (1998) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Mycobacterium tuberculosis*'in inhibisyonu için çeşitli likenlerden elde edilen liken asitleri kullanılmış ve *Camptochaete arbuscula* türünden elde edilen usnik asitin antibakteriyel etkisinin en yüksek olduğu bildirilmiştir (Ingólfssdóttir vd., 1998: 143).

Yapılan bir çalışmada, *Ramalina farinacea* türünden çeşitli çözücülerle elde edilen liken özütlerinin *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus niger* ve *Candida albicans* gibi fungusları, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella typhi* gibi bakterileri inhibe ettiği bildirilmiştir (Esimone ve Adikwu, 1999: 430).

Aseton ile ekstrakte edilen *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* ve *Cladonia portentosa* türü likenlerin funguslara etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, pek çok ekstraktın antifungal aktif olduğu belirlenmiş ve özellikle evernik asitin *Phytophthora infestans* türü patojen fungusu inhibe ettiği bildirilmiştir (Halama ve Van Haluwın, 2004: 101).

Malhotra ve arkadaşları (2008), tarafından yapılan bir çalışmada, çeşitli likenlerden elde edilen evernik asit, usnik asit ve vulpinik asit maddelerinin *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* gibi Gr (+) bakteri türlerinin gelişimini engellediği bildirilmiştir (Malhotra vd., 2008: 4).

Çeşitli patojen mikroorganizmaların inhibisyonunun hedeflendiği bir başka çalışmada, likenlerden elde edilen protosetrarik asit, fumarprotosetrarik asit, stiktik asit ve lekanorik asitin aktiviteleri incelenmiş ve on fungus türü ile on altı bakteri türünde yüksek antimikrobiyal aktivite bildirilmiştir (Ranković vd., 2008: 1241).

Başka bir çalışmada *Escherichia coli*, *Acinetobacter* sp. ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin inhibisyonu için çeşitli liken türlerinin kloroform ve aseton çözücülerini ile elde edilen özütleri kullanılmıştır. Kullanılan özütlerin tamamının, her mikroorganizmada farklı oranlarda antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve çözücü olarak kullanılan asetonun özüt elde etmede daha etkin olduğu bildirilmiştir (Çobanoğlu vd., 2010: 156).

Mersin ilinden toplanan *Squamaria lentigera* liken türü ile yürütülen bir çalışmada liken özütlerinden usnik asit izole edilmiş ve antibakteriyel kapasitesi araştırılmıştır. *Bacillus subtilis* ve *B. megaterium* suşlarının kullanıldığı antimikrobiyal aktivite çalışmaları sonucunda usnik asit için olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Cansaran-Duman ve Halıcı, 2012: 132).

Yapılan bir başka çalışmada ise *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium purpurascens*, *Candida albicans* türlerinin tamamının *Evernia prunastri* liken türünden elde edilen evernik asit ile inhibe olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada *Pseudoevernia furfuracea* liken türünden elde edilen fisodik asitin antimikrobiyal aktivitesinin ise en güçlü olduğu tespit edilmiştir (Kosanić vd., 2013: 116).

Kambar ve arkadaşları (2014), *Ramalina conduplicans* türünün etil asetat, petrol eter ve etanol özütlerini beş çeşit fungus türü ve on beş çeşit bakteri türü için test etmişlerdir. Çalışma sonucunda kullanılan bakterilerin en çok etil asetat özütlerine duyarlı olduğu, üriner sistem bakterilerinin tamamının ise etanol özütleri ile inhibe olduğu, ayrıca kullanılan mikroorganizmalardan en az duyarlı olanın *Klebsiella pneumoniae* olduğu bildirilmiştir (Kambar vd., 2014: 60).

Ramalina nervulosa türü ile yürütülen benzer bir çalışmada çözücü olarak su, petrol eter ve etanol kullanılmıştır. Özütlerin, fungusları bakterilerden daha yüksek oranda inhibe ettiği, ancak en duyarlı türün *Bacillus subtilis* olduğu, ayrıca su özütünün *Pseudomonas aeruginosa* bakteri türünde hiçbir aktivite göstermediği bildirilmiştir (Sundararaj vd., 2015: 202).

Sesal ve arkadaşları (2016), kloroform ve metanol çözücülerini kullanarak *Ramalina canariensis*, *Ramalina fastigiata*, *Ramalina chondrina* ve *Ramalina fraxinea* liken türlerinden özütler elde etmişler ve bu özütlerin antimikrobiyal aktivitelerini *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* türlerine karşı test etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda Gr (-) bakterilerin (*P. aeruginosa* ve *E. coli*) *R. chondrina* ve *R. canariensis* liken türlerinin kloroform özütlerine, maya türünün (*C. albicans*) ise *R. canariensis* türü likenin metanol özütüne karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir (Sesal vd., 2016: 207).

Ramalina capitata türü likenin aseton özütü ile yürütülen bir başka çalışmada ise *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella abony*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus spizizenii* türleri test edilmiştir. Gram (-) bakterilerde (*P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. abony*) aseton özütünün antimikrobiyal etkinlik oluşturmamasına rağmen Gram (+) bakterilerde (*B. spizizenii* ve *S. aureus*) antimikrobiyal aktivite kontrol antibiyotiklere oranla bile daha fazla gözlenmiştir (Zrnzevic vd., 2017: 679).

Candelaria fibrosa, *Parmelia aurulenta*, *Physcia millegrana*, *Cladonia scabriuscula*, *Parmelia caroliniana*, *Parmelia tinctorum*, *Parmelia cetrata*, *Teloschistes flavicans* ve *Parmelia dilatata* liken türlerinden elde edilen metanol özütlerinin *Pseudomonas aeruginosa* bakteri türüne etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *P. cetrata* ve *P. dilatata* liken türlerinin *P. aeruginosa* türünü sırasıyla % 37 ve % 50 oranlarında inhibe edebildiği bildirilmiştir (Nugraha vd., 2019: 43).

Parmelia conspersa ve *Parmelia perlata* türü likenlerin metanol ve aseton özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* türleri üzerinde test edilmiş ve en yüksek aktivitenin *A. niger* fungus türünde *P. perlata* türü likenin aseton özütü ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Manojlović vd., 2020: 10).

Gül ve arkadaşları (2020), *Pseuduevernia furfurace* liken türünün etanol ve metanol özütlerinin antimikrobiyal aktivilerini *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Candida albicans* türleri üzerinde test etmiş ve etanol özütü için en duyarlı suşu *S. aureus*, metanol özütü için ise en duyarlı suşu *C. albicans* olarak bildirmişlerdir (Gül vd., 2020: 7).

2.5. Likenlerin Antioksidan Özellikleri

Canlı organizmaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için olmazsa olmaz elementlerden bir tanesi oksijendir. Ancak organizmaların hemen hepsi, metabolik aktiviteleri sırasında canlı sisteme zarar veren bazı reaktif oksijen türlerini meydana getirmektedir (Koca ve Karadeniz, 2003: 32). Reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species: ROS); hidroksil (OH[•]), süperoksit (O₂^{•-}) gibi radikal ve singlet oksijen (¹O₂), hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi radikal olmayan moleküllerdir ve kimyasal aktiviteleri, normal oksijen moleküllerine oranla oldukça yüksektir (Çavdar vd., 1997: 93; Koca ve Karadeniz, 2003: 32; Mohan vd., 2012: 245). ROS'lar, yeni serbest radikallerin oluşumu ile sonuçlanan zincir reaksiyonlar başlatabilirler.

Serbest radikallerin yapısında bulunan ortaklaşmamış elektronlar nükleik asit, lipid ve proteinler gibi biyomoleküllerle reaksiyona girerek hücrenin yaşam döngüsüne zarar vermektedir (Koca ve Karadeniz, 2003: 33; Mohan vd., 2012: 245). Serbest radikallerin biyomoleküllerle reaksiyona girmesini, onları yakalayıp stabilize ederek engelleyen bileşiklere “antioksidan madde” adı verilir (Koca ve Karadeniz, 2003: 33). Antioksidan maddelerin sınıflandırılması Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Antioksidan maddelerin sınıflandırılması

ENDOJEN ANTİOKSİDAN MADDELER		
ENZİMATİK ANTİOKSİDAN MADDELER	NONENZİMATİK ANTİOKSİDAN MADDELER	
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Ürik asit	<i>a</i> -lipoik asit
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
	Albumin	Seruloplazmin
EKSOJEN ANTİOKSİDAN MADDELER		
İLAC OLARAK KULLANILANLAR	VİTAMİNLER	
Ksantin oksidaz inhibitörleri	Vitamin A (β-karoten)	
Rekombinant süperoksit dismutaz	Vitamin B9 (Folik asit)	
NADPH oksidaz inhibitörleri	Vitamin C (Askorbik asit)	
Trolox-C (Vitamin E analogu)	Vitamin E (<i>a</i> -Tokoferol)	
Endojen antioksidanların aktivitesini artıranlar		
Demir redoks döngüsü inhibitörleri		
Serbest radikal toplayıcılar		
Sitokinler, Barbitüratlar, Demir şelatörleri		

Kaynak: (Karabulut ve Gülay, 2016: 66)

Antioksidan özellikli bileşiklerin oksidanlara etki mekanizması; Süpürme Etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek, Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen atomu ekleyerek, Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Serüloplazmin, hemoglobin ve ağır minerallerin oksidanları kendilerine bağlamasıyla, Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülleri onararak olmak üzere dört yolla gerçekleşmektedir (Gökpinar vd., 2006: 86).

Ancak antioksidan maddeler, serbest radikallerin engellenmesinde, her zaman yeterli olmamaktadır. Organizmalardaki bu oksidan/antioksidan dengesinin oksidan yönüne kaymasıyla meydana gelen hasara “oksidatif stres” denir (Büyüktuncel, 2013: 95). Birçok kanser çeşidi, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, alzheimer, kronik ve dejeneratif hastalıkların ortaya çıkması ve ilerlemesinde oksidatif stresin rolü olduğu düşünülmektedir (Akıllıoğlu ve Yalçın, 2010: 228). Oksidatif stresten korunmak amacıyla doğal (fenolik bileşikler, aminler, karotenler gibi) ya da sentetik antioksidan maddelerin keşfi veya geliştirilmesi, araştırmaların yoğunlaşması gereken konulardandır. Likenler tarafından sentezlenen sekonder metabolitlerin çoğu aromatik yapıları gereği antioksidan madde olma potansiyeline sahiptir (Behera vd., 2005: 991; Paudel vd., 2008b: 605).

Umbilicaria nylanderiana, *Picea glauca*, *Parmelia saxatilis*, *Ramalina polymorpha* ve *Ramalina pollinaria* liken türlerinin metanol özütleri ile yürütülen bir çalışmada, DPPH tekniği ile likenlerin antioksidan kapasiteleri incelenmiş ve yalnızca *U. nylanderiana* liken türünün antioksidan etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Çalışma kapsamında toplam fenolik bileşik miktarları tayin edilmiş ve en çok fenolik bileşik içeren liken türünün *U. nylanderiana* olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında antioksidan aktivite ile toplam fenolik madde miktarı arasında bağlantı olabileceği bildirilmiştir (Gulluce vd., 2006: 518).

Kumar ve arkadaşları (2009), *Ramalina conduplicans* ve *Ramalina hossei* türlerinin metanol özütlerinin farklı konsantrasyonlarının antioksidan aktivitelerini yine DPPH yöntemi ile test etmişler ve her iki liken türünde de farklı konsantrasyonlarda antioksidan etkinlik gözlemlemişler, ancak *R. hossei* liken türünün radikal süpürücü etkisinin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (Kumar vd., 2009: 240).

Bir başka çalışmada ise *Lethariella sernanderi*, *Lethariella sinensis* ve *Lethariella cashmeriana* liken türlerinden kırmızı ve sarı renkli pigmentler elde edilerek antioksidan kapasiteleri incelenmiş ve pigmentlerin antioksidan aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Kinoshita vd., 2010: 85).

Parmotrema tinctorum, *Bulbothrix isidiza*, *Rondeletia peruviana* ve *Centaurea aggregata* liken türlerinin metanol ve aseton özütlerinin antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde içeriklerinin araştırıldığı bir çalışmada, antioksidan aktivitesi en yüksek olan örneğin *B. isidiza* likeninin aseton özütü ve en yüksek radikal süpürücü özelliğe sahip olan örneğin ise *R. peruviana* liken türünün aseton özütü olduğu rapor edilmiştir (Stanly vd., 2011: 2826).

Benzer bir çalışmada, *Ramalina fastigiata*, *Ramalina fraxinea* ve *Ramalina farinacea* liken türlerinin etanol, metanol ve aseton ekstraktları antioksidan aktiviteleri bakımından incelenmiştir. Çalışma sonucunda, en yüksek aktivitenin metanol ile ekstrakte edilen *R. fastigiata* liken türünde gözlemlendiği bildirilmiştir (Şahin vd., 2015: 474).

Sundararaj ve arkadaşları (2015), *Ramalina nervulosa* liken türünden etanol, su ve petrol eteri çözücülerini ile ekstrakte ettikleri örneklerin antioksidan kapasitelerini incelemiş ve tüm ekstraktlarda antioksidan aktivite gözlemlenmiştir. Sonuç olarak liken türünün doğal antioksidan madde üretimi için potansiyel bir substrat olduğu rapor edilmiştir (Sundararaj vd., 2015: 203).

Zrnzevic ve arkadaşları (2017), *Ramalina capitata* liken türünün aseton özütünün antioksidan kapasitesinin, aynı yöntem ile test ettikleri *Umbilicaria crustulosa* liken türünün aseton özütünün antioksidan kapasitesine oranla daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (Zrnzevic vd., 2017: 679).

Parmelia conspersa ve *Parmelia perlata* liken türlerinin metanol ve aseton özütleri ile antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacıyla yürütülen bir başka çalışmada, en yüksek DPPH süpürme aktivitesi gösteren örneğin *P. conspersa* liken türünün metanol özütü olduğu gösterilmiştir (Manojlović vd., 2020: 10).

Aoussar ve arkadaşları (2020), yılın farklı mevsimlerinde topladıkları *Evernia prunastri*, *Pseudovernia furfuracea* ve *Ramalina farinacea* liken türlerinin aseton özütlerinin antioksidan kapasitelerini incelemişlerdir. En yüksek aktivitenin ilkbahar mevsiminde toplanan likenlerde görüldüğü, *P. furfuracea* türünün diğer türlere oranla daha yüksek aktivite gösterdiği ve toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan aktivite arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Aoussar vd., 2020: 4).

2.6. Likenlerin Antikanser Özellikleri

Kanser, mitoz bölünmeyi ve hücre büyümesini kontrol eden genlerin anormal aktivasyonuna yol açan mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Kanserli hücrelerinin sağlıklı hücrelerin büyüme sınırına uymamasının nedeni, hücre büyümesini aktive eden büyüme faktörlerine ihtiyaç duymamasıdır. Ayrıca hücre döngüsünü kontrol eden genlerde meydana gelen mutasyonlar kanser oluşumundaki önemli faktörlerden biridir. (Gutschner ve Diederichs, 2012: 704).

Günümüzde kanser vakalarının artmasıyla birlikte, tedavilerde alternatif olabilecek ilaçların keşfine yönelik çalışmalar da artmıştır. Likenlerin antikanser aktiviteleri ile ilgili çalışmalar, dünyada ve ülkemizde 2011 yılından itibaren yer almaya başlamıştır. Fakat yürütülen çalışmalarda kullanılan liken metabolitleri ve hücre çeşitleri oldukça sınırlıdır (Özenoğlu vd., 2013: 216). Ancak çeşitli liken sekonder metabolitlerinin, pek çok farklı kanser hücre hattı üzerinde test edilmesi ve etki mekanizmalarının araştırılması ile antikanser etkili moleküllerin keşfi gerçekleştirilebilir.

Likenlerin kanser hücrelerine karşı sitotoksik kapasitesi, G2/M, S veya G0/G1 fazlarında hücre döngüsü tutuklamasıyla birlikte apoptoz, nekroz veya otofaji gibi süreçler aracılığıyla sağlanmaktadır (Yurdacan vd., 2019: 203). Likenler ayrıca, sikline bağımlı kinazlar (CDK4, CDK6) veya siklin D1 ile ilişkili olanlar gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla hücre döngüsünün düzenleyicileri olarak görev görür (Singh vd., 2013: 38).

Evernia prunastri, *Cladonia rangiformis*, *Cladonia convoluta*, *Flavoparmelia caperata*, *Platismatia glauca*, *Parmotrema perlatum*, *Usnea rubicunda* ve *Ramalina cuspidata* liken türlerinin sitotoksik aktiviteleri dört insan ve iki fare kanser hücre hatları ile test edilmiş ve liken türlerinin sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Bézivin vd., 2003: 501).

Triggiani ve arkadaşları (2009), *Xanthoria parietina* metanol özütünün fare miyoloma hücrelerinin çoğalmasını belirgin olarak azalttığı bildirmiştir (Triggiani ve ark., 2009: 61).

Koparal ve arkadaşları (2010), *Pseudevernia furfuracea* liken türünden aseton ile elde edilen özütlerin, kanserli hücrelerin anjiyojenezini için önemli bir basamak olan migrasyonu engellediğini rapor etmiştir (Koparal vd., 2010: 756).

Evernia prunastri ve *Pseudoevernia furfuraceae* liken türlerinin aseton özütleri ve liken sekonder metaboliti fizodik asitin FemX ve LS174 hücrelerindeki antikanser aktiviteleri MTT yöntemi ile test edilmiş ve fizodik asit her iki hücre türüne karşı en iyi sitotoksik etkiyi göstermiştir (Kosanić vd., 2013: 116).

Flavocetraria cucullata liken türünün bir aseton özütü ve alt bileşeni usnik asit ile yürütülen bir çalışmada, öldürücü konsantrasyonlarda apoptozu indükleyerek kanser hücreleri üzerinde seçici bir sitotoksikite uygulanmış ve bu özüt ile usnik asitin ölümcül olmayan konsantrasyonları kanser hücrelerinin tümör oluşumunu ve hareketliliğini inhibe ettiği, epitel mezenkimal geçişi (EMT) bastırdığı ve Akt fosforilasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, özütün antikanser aktivitesinin usnik asitten daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Nguyen vd., 2014: 11).

Cladonia convoluta ve *Cladonia rangiformis* liken türlerinin kloroform ve metanol özütlerinin antiproliferatif, sitotoksik ve apoptotik etkileri insan göğüs kanseri hücreleri üzerinde test edilmiş ve bu türlerin kanser tedavileri için önemli adaylar olabilecekleri bildirilmiştir (Coskun vd., 2015: 97).

Usnea strigosa liken türünün etanol özütü ve nortik asit bileşiğinin MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, T-47D, BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerindeki antikanser etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, en iyi inhibisyon MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde görülmüş ve altı meme kanseri hücre hattının hepsinde anti-proliferatif etkiler gözlenmiştir. Öte yandan, insan tümörjenik olmayan MCF-10A hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etki görülmemiştir (Ebrahim vd., 2016: 563).

Roccella montagnei liken türünden metanol ile elde edilen özütün antikanser aktivitesi test edilmiş ve özütün MCF-7 ile FaDu kanser hücre hatlarının büyümesini sırasıyla % 56.55 ve % 64.05 oranda inhibe ettiği belirlenmiştir (Mishra vd., 2017: 726).

Candelaria fibrosa, *Parmelia aurulenta*., *Physcia millegrana*, *Cladonia scabriuscula*, *Parmelia caroliniana*, *Parmelia tinctorum*, *Parmelia cetrata*, *Teloschistes flavicans* ve *Parmelia dilatata* liken türlerinden elde edilen metanol özütlerinin MCF7, WiDr ve HeLa kanser hücre hatları ile Vero sağlıklı hücre hatlarına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, özütlerin tamamının en az iki kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiş ve en iyi antikanser aktivitenin, Hela kanser hücre hattına karşı *Physcia millegrana* liken türünden elde edilen özüt ile gerçekleştiği rapor edilmiştir (Nugraha vd., 2019: 44).

Ramalina leiodea liken türünden aseton ile elde edilen özütün antikanser aktivitesi A549, HeLa ve FaDu kanser hücre hatları ile test edilmiş ve tüm hücre hatlarında sitotoksik aktivite görüldüğü bildirilmiştir (Tatipamula vd., 2020: 382).

Tablo 2.2. Antikanser aktivite deneylerinde kullanılan liken türleri, hücre hatları ve uygulama yöntemleri

LİKEN TÜRÜ	HÜCRE HATTI	YÖNTEM	KAYNAKÇA
Meme kanseri			
<i>Evernia prunastri</i>	LS174	MTT	Manojlović vd., 2012: 1168
<i>Cetraria islandica</i>	SK-BR-3, T-47D	Kristal viyole boyama	Bessadóttir vd., 2014: 1721
<i>Usnea flammea</i> Stirt	MCF-7	MTT	Perico-Franco vd., 2015: 36
<i>Xanthoria parietina</i>	MCF-7, MDA-MB-231	Kristal viyole boyama	Basile vd., 2015: 7873
<i>Parmelia sulcata</i>	MCF-7, MDA-MB-231	MTT, ATP canlılık testi	Ari vd., 2015: 541
<i>Parmotrema tsavoense</i>	MCF-7	Sülforodamin B	Duong vd., 2015: 9688
<i>Lobaria orientalis</i>	MCF-7	Sülforodamin B	Dung, 2016: 313
<i>Hypogymnia physodes</i>	MCF-7, MDA-MB-231, T-47D	MTT, Kristal viyole boyama	Studzińska-Sroka vd., 2016: 2483
<i>Cetraria islandica</i> , <i>Vulpicida canadensis</i>	MCF-7	MTT	Fernández-Moriano vd., 2016: 9
<i>Anaptychia ciliaris</i> , <i>Bryoria capillaris</i> , <i>Cetraria islandica</i>	MCF-7	MTT	Tas vd., 2017: 16
<i>Rocella montagnei</i>	MCF-7	Sülforodamin B	Mishra vd., 2017: 726
<i>Rocella montagnei</i>	MCF-7	Sülforodamin B	Mishra vd., 2017: 726
<i>Cladonia salzmännii</i>	MCF-7	MTT, CBPI	Gonçalves vd., 2018: 9
Kolon kanseri			
<i>Rocella montagnei</i>	DLD-1, SW-620	Sülforodamin B	Mishra vd., 2017: 726
<i>Evernia strumicirrhutum</i>	HCT116	MTT	Pol vd., 2017: 154
<i>Platismatia glauca</i> , <i>Cladonia uncialis</i> , <i>Parmelia sulcata</i> , <i>Hypogymnia physodes</i> , <i>Hypocenomyces calaris</i>	HCT116	MTT	Paluszczak vd., 2018: 120
Cilt kanseri			
<i>Evernia prunastri</i>	FemX	MTT	Manojlović vd., 2012: 1168
<i>Bacidia stipata</i> , <i>Ochrolechia deceptionis</i> , <i>Hypogymnia lugubris</i>	A375	MTT	Cardile vd., 2017: 43
Akciğer kanseri			
<i>Cladonia aggregata</i>	NCI-H292	MTT	Martins vd., 2016: 7
<i>Lagotis brevītuba</i> Maxim.	A549	MTT	Xiang vd., 2017: 1516
<i>Lobarientalones</i>	NCI-H460	Sülforodamin B	Nguyen vd., 2017: 266
Karaciğer kanseri			
<i>Lobaria orientalis</i>	HepG2	Sülforodamin B	Nguyen vd., 2017: 266
<i>Lagotis brevītuba</i> Maxim.	HepG2	MTT	Xiang vd., 2017: 1516
<i>Anaptychia ciliaris</i> , <i>Bryoria capillaris</i> , <i>Cetraria islandica</i>	HepG2/C3A	MTT	Tas vd., 2017: 16

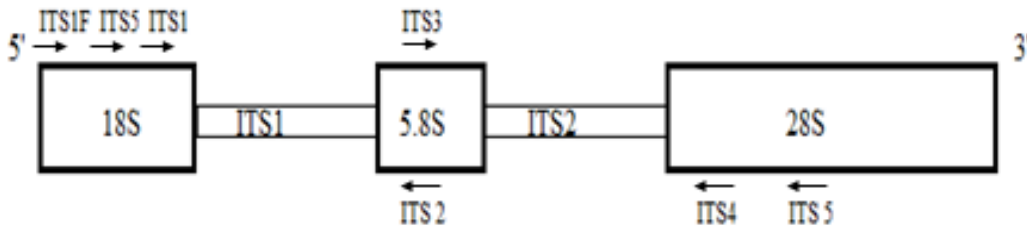
2.7. Likenlerin Tanımlanması

Taksonomi, tüm biyolojik varlıklar için referans bir sistemi sağlayan temel bir disiplindir ve organizmalar birbirinden farklı özellikler taşıdıklarından, ortak özellikleri incelenerek sınıflandırılır ve gruplar halinde düzenlenir (Madigan vd., 2012). Prokaryot taksonomisi genotipik ve fenotipik özellikleri birleştirmektedir. Genotipik özellikler, hücre yapısındaki nükleik asitlerden (DNA, RNA) elde edilirken, fenotipik özellikler ise organizmanın fiziksel ve biyokimyasal karakterlerinden elde edilir.

Ökaryotların filogenetik çalışmalarında nuklear DNA ve mitokondriyal DNA kullanılmaktadır. Moleküler filogenetik çalışmalarda kullanılması avantajlı olan DNA bölgeleri; çekirdek ve mitokondrial DNA ve protein kodlayan bölgelerdir (Bridge vd., 2005). Bunların yanı sıra kloroplast DNA'sı (cpDNA), ribozomal DNA (rDNA), Rubisco, tRNA gibi canlılarda ortak gen bölgeleri olarak kabul edilen evrensel bölgeler de kullanılmaktadır.

2.7.1. Likenlerin ITS Dizi Analizi ile Tanımlanması

Ökaryotik ribozomal DNA (rDNA) gen ailesi, birbiri ardına gelen tekrarlı dizilerden oluşmaktadır. Her bir tekrar dizisi 18S, 5.8S ve 28S rRNA genlerini kodlamaktadır ve bu genler birbirinden ITS (Internal Transcribed Spacer) 1, ITS2, ETS (External Transcribed Spacer) ve IGS (Intergenic Spacer) olarak adlandırılan kodlanmayan dizilerle ayrılmıştır. ITS1 bölgesi; rDNA'nın alt birimlerinden küçük alt ünite (Small Subunit; SSU) ile 5.8S alt birim arasında yer alırken, ITS2 bölgesi; rDNA'nın büyük alt ünite (Large Subunit; LSU) rRNA genleri ile 5.8S alt birim arasında yer almaktadır (Boysen vd., 1996: 175). Mantarların rDNA bölgesi Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Mantarların ribozomal DNA bölgesi

Mantarlara özgü bir primer olan ITS1F primeri rDNA'nın SSU geninin 3' ucunda bulunurken evrensel bir primer olan ITS4 primeri LSU geninin 5' uzundan bulunmaktadır (Gardes ve Bruns, 1993: 114). Evrensel primerler kullanılarak ITS bölgesinin çoğaltılması ve dizi analizine tabi tutulması ile yürütülen moleküler tabanlı çalışmalar türlerin teşhis edilmesinde morfolojik verilere göre kolaylık sağlamaktadır (Cerbah vd., 1998: 347; Eddie vd., 2003: 556). Mantarların ITS bölgelerinin çoğaltılması amacı ile kullanılan primer dizileri Tablo 2.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. ITS bölgelerinin çoğaltılmasından kullanılan primer dizileri

ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGAAGTAA
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

Kaynak: (Innis vd., 1989: 317)

ITS bölgesinin filogenetik çalışmalarda tercih edilmesinin en temel nedenlerinden bazıları, ITS bölgesinin küçük olması (~700 bp) ve bu bölgenin PCR ile çoğaltılma işleminde evrensel tek primer çiftinin yeterli olması, rDNA'nın çok tekrarlı olması sayesinde parçalanmış veya az miktarda DNA içeren örneklerden dahi ITS bölgesinin amplifikasyonunun mümkün olması, ITS dizilerinin yüksek frekanslı mutasyon göstermesi sayesinde morfolojik olarak benzer olan türler arasında veya bir türün farklı suşlarında dahi değişiklik içermesi ve böylece çok çeşitli türler içinden tek bir türün bile ITS dizi analizi yöntemi ile belirlenmesinin mümkün olmasıdır (White vd., 1990: 318; Bruns vd., 1991: 530; Lee ve Taylor, 1992: 637).

Likenlerin moleküler tanımlanması, rDNA bölgesinin direkt olarak likenden izole edilerek yapılabileceği gibi likeni oluşturan mantardan rDNA bölgesinin izolasyonu ile de mümkündür (Duman, 2008; Kranner vd., 2012: 44).

Peltigera aphthosa, *Peltigera malacea*, *Peltigera leucophlebia*, *Peltigera britannica*, *Nephroma arcticum* ve *Nephroma expallidum* türlerinden izole edilen rDNA ITS bölgelerinin çoğaltılması amacıyla mantarlara özgü evrensel bir primer kullanılmış ve 5.8S bölgeleri karşılaştırılmıştır. Likenlerin toplam DNA'sından mantar DNA'sının seçici olarak çoğaltılmasının, mantarların ITS bölgesine özgü primerlerle mümkün olduğu bildirilmiştir (Goffinet ve Bayer, 1997: 233).

Umbilicariaceae familyasına ait liken türlerinin filogenetik analizinin hedeflendiği bir çalışmada, ITS1 ve ITS2 primerleri kullanılarak likenlerden rDNA'nın çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda türler arası benzerlik ve farklılıkların belirlenmesi için ITS dizi analizi yönteminin uygun olduğu rapor edilmiştir (Ivanova vd., 1999: 485).

Grube ve Arup (2001) tarafından yürütülen, nükleer ITS dizi analizi yöntemine dayanan bir çalışmada Physciaceae familyası, *Buellia* ve *Rinodina* cinslerine ait bazı türlerin filogenetik araştırılması sonucunda cins isimleri başarıyla belirlenmiştir (Grube ve Arup, 2001: 67).

Diploicia ve *Diplotomma* cinsi likenlerin filogenetik olarak incelenmesi amacıyla rDNA ITS bölgelerinin dizi analizi yapılmış ve türler arası gen farklılıkları ortaya koyulmuştur. Türler arası genetik uzaklığın belirlenmesinin, farklı popülasyonlarda varyasyon gösteren örneklerin moleküler filogenetik analizi yöntemi ile mümkün olduğu bildirilmiştir (Molina vd., 2002: 516).

Xanthoria aureola ve *Xanthoria parietina* türleri arasındaki genetik farklılıklar rDNA'nın IGS ve ITS bölgelerinin dizi analizi ile başarıyla belirlenmiştir (Lindblom ve Ekman, 2004: 196).

Cansaran ve arkadaşları (2006), *Rhizoplaca* cinsine ait liken türlerinin filogenetik ağacını, ITS dizi analizi ile oluşturmuş ve genetik akrabalıkları belirlemişlerdir (Cansaran vd., 2006: 410).

Benzer analizlerin *Aspicilia* cinsi için gerçekleştirildiği ve genetik akrabalıkların başarıyla belirlendiği bir çalışma ise Aras ve arkadaşları (2007) tarafından bildirilmiştir (Aras vd., 2007: 1156).

Hypogymnia ve *Cavernularia* cinslerinin filogenetik olarak incelenmesi amacıyla ITS primerleri kullanılmış ve hedeflenen bölgenin bu primerler ile çoğaltılabildiği belirlenmiştir (Miadlikowska vd., 2011: 395).

Evernia divaricata ve *Usnea longissima* liken türlerinin genetik varyasyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, benzerlik ve farklılıklar rDNA'nın ITS ve IGS dizi analizleri yapılarak belirlenmiştir (Rolstad vd., 2012: 78).

Kuzey Çin'de toplanan *Peltigera* cinsine ait likenlerin ITS dizi analizi ile tanımlanmasının hedeflendiği bir çalışmada *Peltigera wulingensis* isimli yeni bir tür keşfedilmiştir (Han vd., 2013: 329).

Gasparyan ve arkadaşları (2017), ITS dizi analizi yöntemini uyguladıkları likenlerden, *Ramalina europaea* ve *Ramalina labiosorediata* türlerini, yeni liken türleri olarak literatüre kaydetmişlerdir (Gasparyan vd., 2017: 314)

Kistenich ve arkadaşları (2019), *Cladonia*, *Nephroma*, *Peltigera* ve *Ramalina* cinslerinin her birinden iki adet türden, yaşları 0 ile 155 arasında değişen 56 liken ile ITS dizi analizi yöntemini çalışmışlar ve 56 örnekten 54'nün dizi analizinin başarıyla gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Kistenich vd., 2019: 12).

Bradshaw ve arkadaşları (2020), *Rhizoplaca* cinsine ait 9 türün rDNA'nın ITS, IGS, 28S ve 18S bölgelerinin dizi analizlerini gerçekleştirerek filogenetik ağaçlarını oluşturmuş ve genetik varyasyonlarının belirlenmesinde rDNA'da bulunan bu bölgelerin, evrensel primerler ile çoğaltılmasının uygun olduğunu rapor etmişlerdir (Bradshaw vd., 2020: 8).

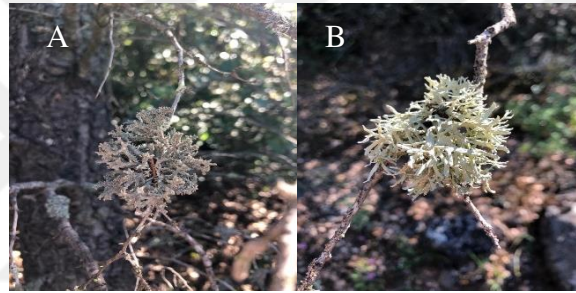
3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Likenler

Tez çalışmasında kullanılan liken örnekleri Bilecik İli Kent Ormanı (Enlem: 40.138386 Boylam: 29.989717)'ndan 27.06.2020 tarihinde toplanmıştır. Likenlerin doğadaki görüntüleri Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Likenler morfolojik özellikleri göz önüne alınarak, moleküler tanımlaması yapılan *Evernia prunastri* liken türleri ve izolat 4 olarak gruplara ayrılmıştır (Şenol vd., 2021: 2).

Morfolojilerine göre sınıflandırılan likenlerin laboratuvar ortamındaki görüntüleri Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Tez çalışmasında kullanılmak üzere toplanan likenlerin doğadaki görüntüsü (A. İzolat 4, B. *Evernia prunastri*)



Şekil 3.2. Tez çalışmasında kullanılan likenlerin laboratuvardaki görüntüsü (A. İzolat 4, B. *Evernia prunastri*)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Liken özütlerinin elde edilmesi amacıyla metanol, etil asetat ve hekzan kullanılmıştır. Elde edilen özütlerin çözündürülmesi ve kontrol çözeltilerin hazırlanması amacıyla Dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde pozitif kontrol olarak Tetrasiklin (TET) ve Flukonazol (FLU) kullanılmıştır. Antioksidan aktivite testinde serbest radikal bileşik olarak 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH), DPPH'nin çözündürülmesi için etanol ve standart madde olarak Bütil hidroksi tolüen (BHT) kullanılmıştır. Hücre canlılığının test edilmesi amacıyla (3,4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve pozitif kontrol olarak Doksorubisin kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

Antimikrobiyal aktivite testlerinde ve bu testlerde kullanılan mikroorganizmaların gelişmesinde bakteriler için Mueller-Hinton Agar (MHA) ve Mueller-Hinton Broth (MHB), mayalar için ise Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) ve Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) besiyerleri kullanılmıştır.

Antikanser aktivite testlerinde ve bu testlerde kullanılan hücre hatlarının geliştirilmesinde 2 mM L-glutamin, % 10 fetal sığır serumu (FBS) ve % 1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyeri kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında kullanılan besiyerlerinin içeriği Ek 1'de gösterilmiştir.

3.1.4. Kullanılan Hücreler

Antimikrobiyal aktivite testlerinde, 4 adet Gram (+) bakteri hücresi [*Enterococcus faecalis* ATCC (American Type Culture Collection) 2942 (*E. faecalis*), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis*), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (*S. epidermidis*)], 4 adet Gram (–) bakteri hücresi [*Escherichia coli* ATCC 05922 (*E. coli*), *Serratia marcescens* ATCC 8100 (*S. marcescens*), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (*K. pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa*)] ve 3 adet maya hücresi [*Candida albicans* ATCC 24433 (*C. albicans*), *Candida krusei* ATCC 6258 (*C. krusei*), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (*C. parapsilosis*)] kullanılmıştır.

Antikanser aktivite testlerinde, fare sağlıklı fibroblast hücreleri [NIH/3T3 sağlıklı hücre hattı (ATCC CRL-1658)] ve iki farklı meme kanseri hücresi [MCF-7 (ATCC HTB-22) ve MDA-MB-231 (ATCC HTB-26)] olmak üzere 3 adet hücre hattı kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında kullanılan hücreler, ATCC kodları, geliştikleri besiyerleri ve optimum büyüme sıcaklıkları Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan hücreler ve büyüme özellikleri

Hücre Adı	Kodu	Geliştiği Besiyeri	Optimum Sıcaklık
<i>E. faecalis</i>	ATCC 2942	MHB, MHA	35 °C
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	MHB, MHA	25-35 °C
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	MHB, MHA	37-40 °C
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	MHB, MHA	30-37 °C
<i>E. coli</i>	ATCC 05922	MHB, MHA	37 °C
<i>S. marcescens</i>	ATCC 8100	MHB, MHA	37 °C
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13883	MHB, MHA	35-37 °C
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	MHB, MHA	37 °C
<i>C. albicans</i>	ATCC 24433	SDB, SDA	33 °C
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	SDB, SDA	33 °C
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	SDB, SDA	33 °C
NIH/3T3	ATCC CRL-1658	RPMI 1640	37 °C
MCF-7	ATCC HTB-22	RPMI 1640	37 °C
MDA-MB-231	ATCC HTB-26	RPMI 1640	37 °C

3.2. Metod

3.2.1. Likenlerin ITS Dizi Analizi ile Tanımlanması

İzolat 4 kodlu liken örneklerinin tür tanımlama deneyleri BM Laboratuvarında (Ankara, Türkiye) yapılmıştır.

İlk olarak likenlerden DNA izolasyonu gerçekleştirmek amacıyla EurX GeneMATRIX Plant & Fungi DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. İzole edilen DNA'ların miktar ve saflık tayini için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (ABD) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri, PCR çalışmalarında universal primer olan ileri (ITSF1; 5'-CGAAGCCAGTGGCCTAACCC-3') ve geri (ITS4; 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Yaklaşık 600 bazlık bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları Tablo 3.2.'de gösterilmiştir. PCR (kyratec thermocycler, Avusturalya) ile elde edilen amplifikasyon sonuçları 1 x TAE tampon ile hazırlanan % 1,5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütülmüş ve etidyum bromür boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmıştır. Liken örnekleri için PCR sonrasında agaroz jelde tek bant elde edilmiş ve PCR işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir. PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılıp, kitin prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır. Sanger Dizileme örnekleri için, Macrogen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA). ITSF1 ve ITS4 primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır. Elde edilen diziler NCBI üzerindeki en yakın türlere göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.2. Hedef gen bölgelerinin amplifikasyonu için gerçekleştirilen PCR koşulları

Bileşen	Stok Kons.	Reak. Kon.	Miktar
PCR Buffer	10X	1X	3.5 µl
MgCl ₂	25mM	1,5 mM	2.1 µl
dNTP mix	20 mM	0,2 mM	0.35 µl
İleri Primer	10 µM	0,3 µM	1.05 µl
Geri Primer	10 µM	0,3 µM	1.05 µl
Taq DNA Polymerase	5U/ µl	2 U	0.21 µl
Kalıp DNA			3 µl
PCR grade su ile 35 µl'ye tamamlanır.			

3.2.2. Likenlerden Özütle Elde Edilmesi

Tanımlanması yapılan liken örnekleri 3 kez distile su ile yıkandı ve 24 saat 50 °C’de kurutuldu. Kuruyan likenler öğütücü yardımı ile toz haline getirildi. Her bir liken grubundan 10 gram tartılıp ISOPAD marka Soxhlet ekstraksiyon cihazında 250 ml metanol, etil asetat ve n-hekzan kullanılarak 8 saat ekstrakte edildi. Soxhlet ile ekstraksiyon deney düzeneği Şekil 3.3.’de gösterilmiştir. Ekstraksiyon sonrası çözücüler vakum altında Heidolph marka Rotary evaporator cihazı ile uzaklaştırıldı (Mothana ve Lindequist, 2005: 179). Çözücülerin Rotary Evaporatör Cihazı ile buharlaştırılması işlemi Şekil 3.4.’de gösterilmiştir. Elde edilen özütler çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edildi.



Şekil 3.3. Soxhlet cihazı ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminin görüntüsü



Şekil 3.4. Rotary evaporatör cihazı ile gerçekleştirilen çözücünün buharlaştırılması işleminin görüntüsü

3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Testleri

Liken özütlerinin her biri 5 mg tartılarak 1 ml % 20'luk DMSO içerisinde çözüldü ve 5 mg/ml (5000 ppm) konsantrasyonlu stok liken çözeltileri hazırlandı. Liken özütlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin test edilmesi amacıyla öncelikle Agar Disk Difüzyon yöntemi (CLSI M02-A12, 2015: 18) uygulandı. Çalışmalarda kullanılan her mikroorganizma optimum büyüme koşullarında 18-24 saat inkübe edildi. Absorbans değerleri spektrofotometrede 600 nm'de ölçüldü ve OD₆₀₀ değerleri 0,1 (10⁷ CFU/ml) olacak şekilde dilüe edildi. Dilüe edilen bakteriler MHA içeren petrilere, mayalar ise SDA içeren petrilere 100 µl damlatıldı ve eküvyon çubuk kullanılarak yayma ekim metodu ile inoküle edildi. Boş steril diskler petrilere eşit aralıklarla ve en fazla 4 adet olacak şekilde yerleştirildi. Stok liken çözeltilerinden mikropipet ile 20 µl alınarak 6 mm çapındaki boş steril disklere emdirildi. Pozitif kontrol diskleri olarak Gram (+) bakteriler için Vankomisin (30 µg), Gram (-) bakteriler için Gentamisin (10 µg) ve maya hücreleri için Flukonazol (5 µg) emdirilmiş diskler kullanıldı. Her mikroorganizma kendi optimum büyüme koşullarına uygun olarak 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda disklerin etrafında oluşan zon çapları milimetrik cetvel yardımıyla ölçüldü. Tüm çalışmalar aseptik şartlara uygun, 2 tekrar olarak yürütüldü ve aritmetik ortalamaları alındı.

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) mikrodilüsyon metodu (CLSI M07-A9, 2012: 17) ile 96 kuyucuklu mikrolakalar kullanarak belirlendi. Kuyucuklar son durumda 100 µl hacim içerecek şekilde hazırlandı. 5000 ppm'lik stok liken çözeltileri kullanılarak ilk kuyucuktaki liken özütü konsantrasyonu 1250 µg/ml olması için hazırlandı. 1:2 oranında seri dilüsyonlar yapılarak sonraki kuyucukların konsantrasyonları sırasıyla 625, 312.50, 156.25, 78.13, 39.06, 19.53, 9.77 ve 4.88 µg/ml'ye ayarlandı. Kuyucuklara, son durumda 5×10^5 CFU/ml mikroorganizma içerecek şekilde, 5 µl mikroorganizma kültüründen inoküle edildi. Aynı işlemler pozitif kontrol olarak, bakteriler için tetrasiklin ve maya hücreleri için flukonazol ile uygulandı. Her mikroorganizma optimum büyüme koşullarına uygun olarak 24 saat inkübe edildi. Sistemler, çok kuyucuklu plaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) ile OD₆₀₀ nm dalgaboyunda ölçüldü. İnkübasyon sonunda üremenin inhibe edildiği en düşük özüt konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi. 96 kuyucuklu mikrolakaların görüntüsü, GeneSys yazılımına sahip G: BOX (Syngene, İngiltere) görüntüleme sistemi kullanılarak alındı. Tüm çalışmalar aseptik şartlara uygun, 2 tekrar olarak yürütüldü ve aritmetik ortalamaları alındı.

3.2.4. Antioksidan Aktivite Testleri

Liken özütlerinin antioksidan aktivite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla DPPH serbest radikal solüsyonu kullanıldı. Stok DPPH solüsyonu hazırlanırken 4 mg DPPH tartıldı ve 10 ml etanolde (10^{-3} M) 30 °C'de, karanlıkta 1 gece boyunca manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. Standart antioksidan bileşiği olarak BHT kullanıldı. Standart antioksidan bileşik ve stok liken özütleri son durumda 10 ve 20 µg/ml derişimlerde olacak biçimde hazırlandı ve toplam hacimleri etanol ile 3 ml'ye tamamlandı. Son olarak her bir gruba 1 ml stok DPPH solüsyonu ilave edildi. Sistemler karanlık ortamda, oda sıcaklığında, 30 dakika boyunca, 100 rpm çalkalamalı ortamda bekletildi ve AN değerleri spektrofotometrede 517 nm dalgaboyunda ölçüldü (Seyhan, 2019: 126). Antioksidan maddelerin DPPH'a proton vermesi sonucunda 517 nm'de absorbans azalır ve bu dalga boyunda ölçülen son absorbans değeri geriye kalan DPPH serbest radikalinin miktarını verir (Blois, 1958: 1200). Eşitlik 1 (E. 1) kullanılarak, örneklerin DPPH giderme aktivitesi (%) hesaplandı.

$$\% \text{ DPPH giderme} = [(AK-AN) / AK] \times 100 \quad \text{E. 1}$$

AK = Kontrol absorbans değeri

AN = Numune absorbans değeri

3 ml etanole 1 ml stok DPPH çözeltisi ilave edilerek hazırlanan çözelti kontrol olarak kullanıldı. Spektrofotometrik ölçümler yapılırken kör olarak ise etanol kullanıldı.

3.2.5. Antikanser Aktivite Testleri

Antikanser aktivite testleri Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji, Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Liken özütlerinin sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla NIH3T3, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları, 2 mM L-glutamin, % 10 FBS ve % 1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde, % 5 CO₂, %95 bağıl nemde ve 37 °C'de inkübatörde büyütülmüştür. Çalışmada kullanılan bileşikler DMSO içinde çözülmüş ve taze olarak hazırlandıktan sonra çalışma konsantrasyonlarına seyreltilmiştir. Kontrol grubu (çözücü kontrolü) % 0.1 DMSO içeren ortam ile hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak doksorubisin kullanılmıştır.

Hücrelerin canlılığı MTT boyası ([3,4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) ile test edilmiştir. Bu yöntem sağlıklı hücrelerin mitokondriyal dehidrojenazı ile MTT'nin mor bir formazan tuzu oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde sarı renkli MTT, canlı hücrelerin mitokondrilerinde mor formazana indirgenmektedir. Bu indirgenme, yalnızca mitokondriyal redüktaz enzimleri aktif olduğunda gerçekleşir. Bu nedenle, dönüşüm doğrudan canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir (Mosmann, 1983: 58). Hücreler, kuyucuk başına 5 x 10³ hücre yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ve farklı özüt konsantrasyonları (500, 250, 125, 62.50 ve 31.25 µg/mL) ile birlikte 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında, 0.5 mg/mL'lik nihai konsantrasyonda kuyucuklara 10 µL MTT boyası ilave edilmiştir. Hücreler 4 saat daha inkübe edilmiş ve daha sonra dökülerek hücre besiyerinden uzaklaştırılmıştır üzerilerine 100 µl DMSO çözeltisi eklenmiştir. Absorbans değerleri, Cytation 3 Hücre Görüntüleme Çok Modlu Okuyucu Cell Imaging Multi-Mode Reader (Bio-Tek) kullanılarak 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Çözücü kontrolü için DMSO % 0.1 oranında kullanılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri hücre canlılıkları olarak kabul edilmiş olup, veriler Microsoft Office Excel programında % hesap şeklinde oluşturulmuştur. Birbirinden bağımsız 3 tekrarlı yapılan deneylerin sonuçlarında, kontrol grubu 100 olarak kabul edilmiş olup diğer bütün konsantrasyonların % değerleri bu değere göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{AN}/\text{AK}) \times 100$$

E. 2

AK = Kontrol absorbans değeri

AN = Numune absorbans değeri

İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin izimi GraphPad Prizm 6.0 analiz programı kullanarak yapılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir.

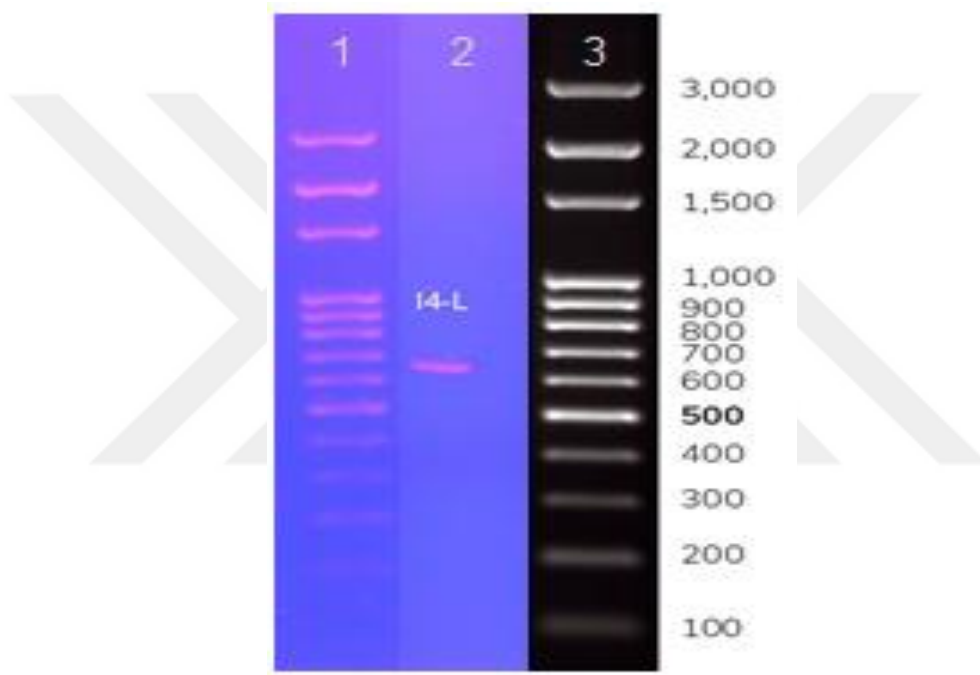
İstatistiksel anlamlılık değerleri $p>0.5$ fark yok, $p<0.05$ (*) fark var, $p<0.01$ (**) anlamlı fark var, $p<0.001$ (***) nemli fark var, $p<0.0001$ (****) ok önemli fark var olarak değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Likenlerin ITS Dizi Analizi ile Tanımlanması

Liken örneklerinin tanımlanması için izolat 4 kodlu liken türüne ITS dizi analiz yöntemi uygulanmıştır. ITS gen bölgesine ait primerler kullanılarak likenlerden elde edilen DNA'lar PCR ile çoğaltılmış ve ürünler agaroz jel elektroforezi ile yürütülmüştür. UV ışığında görüntüsü alınan jelde DNA izolasyonunun başarıyla gerçekleştiği gözlenmiştir. Şekil 4.1.'de PCR ürünlerinin UV ışık altındaki agaroz jel görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.1. ITS gen bölgelerinin PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (1: Marker 3000-100 bç, 2: I4-L; İzolat 4 kodlu likene ait ITS gen bölgesi, 3: Marker-Solis Biodyne 100 bç DNA Ladder)

ITS gen bölgeleri Sanger Dizileme yöntemi ile okunmuş ve sonrasında konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig hale getirilerek NCBI üzerindeki en yakın türe göre hizalanmıştır.

İzolat 4 kodlu liken türüne ait 616 bazlık ITS gen dizisi;

‘TGGTCAATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCG
GAAGGATCATTACCGAGAGAGGGGCTCGCGCTCCCGGGGGTTTCGGCCCCCAA
CTCTTCACCCACTGTGTATCTACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCTCGCCTTCCCGGCT
TCCGGGCGGCGGGCGCCCGTCGGAGGCCCATTAATTCGGTTAAATCAGTGACG
TCCGAGCAAACCTACACAATTAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCA
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCAT
GCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCCCTCAAGCGTAGCTTGGTACTGGGTCCTCGTCC
CCGCGACGTGCCCCGAAAAGCAGTGGCGGTCCGGTGGGACTTTAAGCGTAGTAAA
TCTTATCCCGCTTTGAAAGTTCGCCCCGGCGACCGGCCAGATAACCCCATTTATTCA
ATGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG
GCGGAGGAAA’ olarak belirlenmiştir.

Dizi analizleri sonucunda izolat 4 kodlu örneğin *Pseudevernia furfuracea* liken türü ile dizi eşleşme oranı % 95 ve benzerlik oranı % 100 olarak belirlenmiştir.

4.2. Likenlerden Özüt Elde Edilmesi

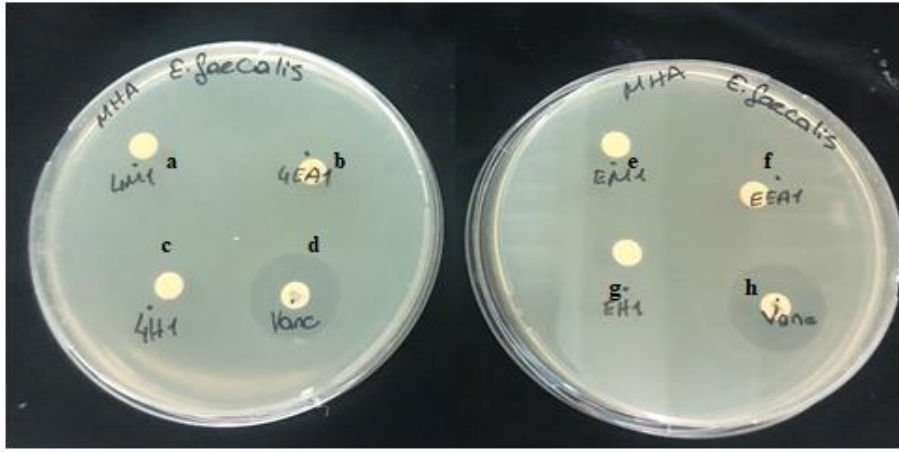
İzolat 4 ve *Evernia prunastri* liken örneklerinden metanol, etil asetat ve hekzan çözücülerini ile elde edilen 6 farklı özütün her biri % 20’lik DMSO ile çözdürüldü ve stok özütler etiketlenerek +4 °C’de muhafaza edildi. Etiketlenerek +4 °C’de stoklanan liken özütlerinin kodları ve miktarları Tablo 4.1.’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Stok liken özütlerinin kodları

Liken örneği	Çözücü	Özüt kodu	Miktar (g)
İzolat 4	Metanol	4M	0,295
İzolat 4	Etil asetat	4EA	0,213
İzolat 4	Hekzan	4H	0,167
<i>Evernia prunastri</i>	Metanol	EM	0,263
<i>Evernia prunastri</i>	Etil asetat	EEA	0,205
<i>Evernia prunastri</i>	Hekzan	EH	0,102

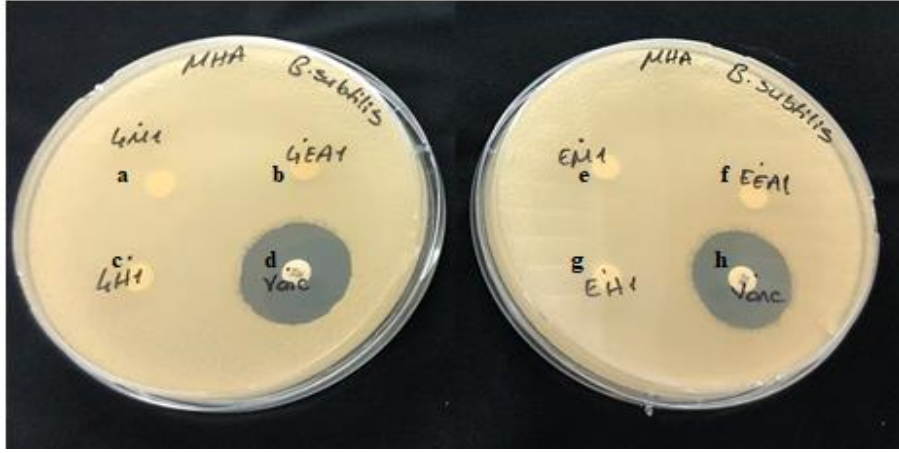
İzolat 4 kodlu liken türünden metanol çözücüsü ile 0.295 g özüt elde edilmiştir ve 4M olarak kodlanmıştır. İzolat 4 kodlu liken türünden etil asetat çözücüsü ile 0.213 g özüt elde edilmiştir ve 4EA olarak kodlanmıştır. İzolat 4 kodlu liken türünden hekzan çözücüsü ile 0.167 g özüt elde edilmiştir ve 4H olarak kodlanmıştır. *Evernia prunastri* liken türünden metanol çözücüsü ile 0.263 g özüt elde edilmiştir ve EM olarak kodlanmıştır. *Evernia prunastri* liken türünden etil asetat çözücüsü ile 0.205 g özüt elde edilmiştir ve EEA olarak kodlanmıştır. *Evernia prunastri* liken türünden hekzan çözücüsü ile 0.102 g özüt elde edilmiştir ve EH olarak kodlanmıştır. Veriler incelendiğinde metanol çözücüsü ile elde edilen özütlerin miktarının etil asetat ve hekzan çözücülerini ile elde edilen özütlerden fazla olduğu görülmektedir.

4.3. Likenlerin Antimikrobiyal Aktivitesi



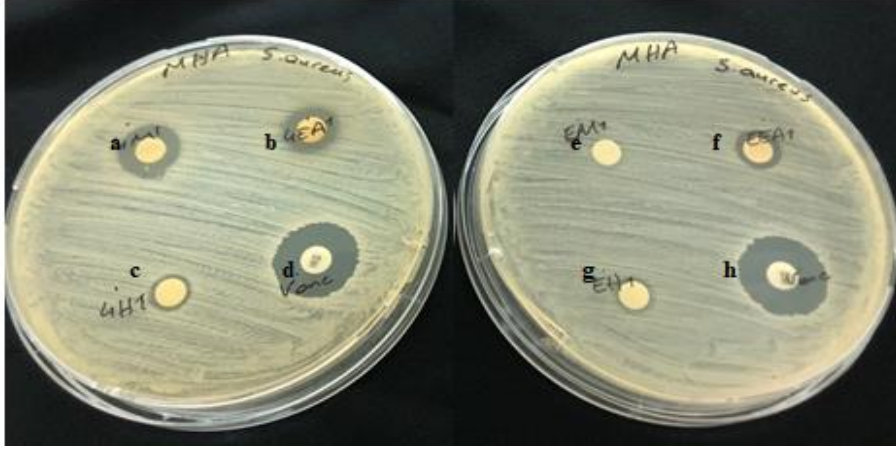
Şekil 4.2. *E. faecalis* türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. Vankomisin, e. EM, f. EEA, g. EH, h. Vankomisin)

Steril boş disklere (Bioanalyse BLK) emdirilmiş 6 çeşit liken özütü ve Vankomisin (Bioanalyse VA 30) antibiyotik diski ile *E. faecalis* türüne karşı uygulanan agar disk difüzyon testi sonucunda, *E. faecalis* bakterisi türünün kullanılan özütlerin tamamına dirençli olduğu ve bu sebeple inhibisyon zonu oluşmadığı görülmektedir (Şekil 4.2.). Pozitif kontrol olarak kullanılan vankomisin (30 µg) diski çevresinde oluşan zon çapı 20.33 mm olarak ölçülmüştür.



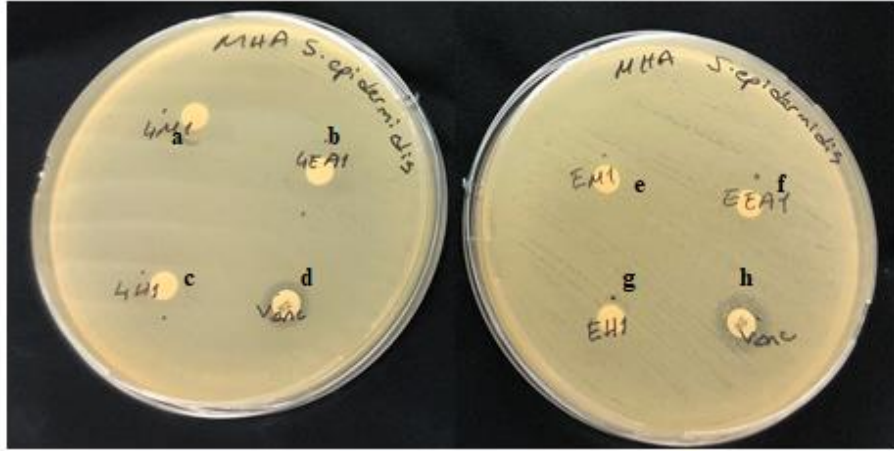
Şekil 4.3. *B. subtilis* türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. Vankomisin, e. EM, f. EEA, g. EH, h. Vankomisin)

Steril boş disklerle (Bioanalyse BLK) emdirilmiş 6 çeşit liken özütü ve Vankomisin (Bioanalyse VA 30) antibiyotik diski ile *B. subtilis* türüne karşı uygulanan agar disk difüzyon testi sonucunda, *B. subtilis* bakteri türünün kullanılan özütlerin tamamına dirençli olduğu ve bu sebeple inhibisyon zonu oluşmadığı görülmektedir (Şekil 4.3.). Pozitif kontrol olarak kullanılan vankomisin (30 µg) diski çevresinde oluşan zon çapı 20.33 mm olarak ölçülmüştür.



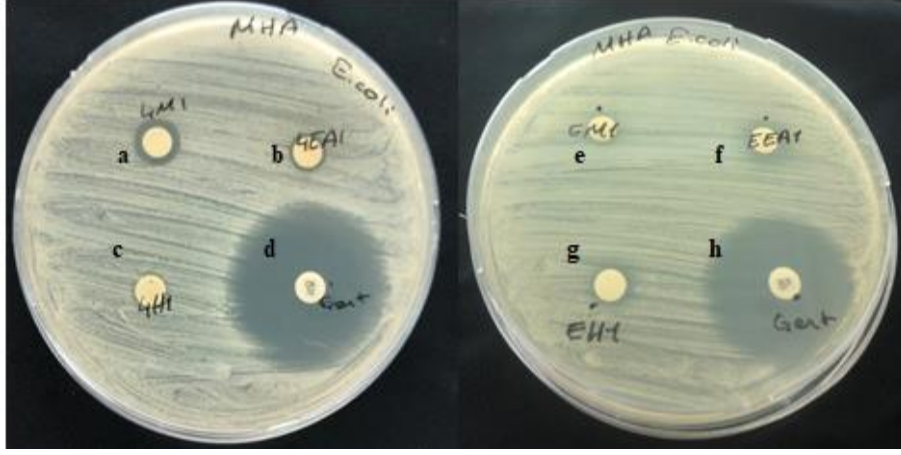
Şekil 4.4. *S. aureus* türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. Vankomisin, e. EM, f. EEA, g. EH, h. Vankomisin)

Steril boş disklere (Bioanalyse BLK) emdirilmiş 6 çeşit liken özütü ve Vankomisin (Bioanalyse VA 30) antibiyotik diski ile *S. aureus* türüne karşı uygulanan agar disk difüzyon testi sonucunda, 4M, 4EA, EEA, 4H ve EH özütleri çevresinde sırasıyla 13 mm, 10.5 mm, 10 mm, 8 mm ve 7.5 mm zon çapı ölçülmüştür. EM özütünün çevresinde ise inhibisyon zonu oluşturamadığı görülmektedir (Şekil 4.4.). Pozitif kontrol olarak kullanılan vankomisin (30 µg) diski çevresinde oluşan zon çapı 16.83 mm olarak ölçülmüştür. İzolat 4 kodlu liken türünden elde edilen tüm özütlerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olması nedeniyle *S. aureus* bakteri türüne karşı etkili olması hedeflenen bileşiklerin sentezinde substrat olarak kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu görülmektedir.



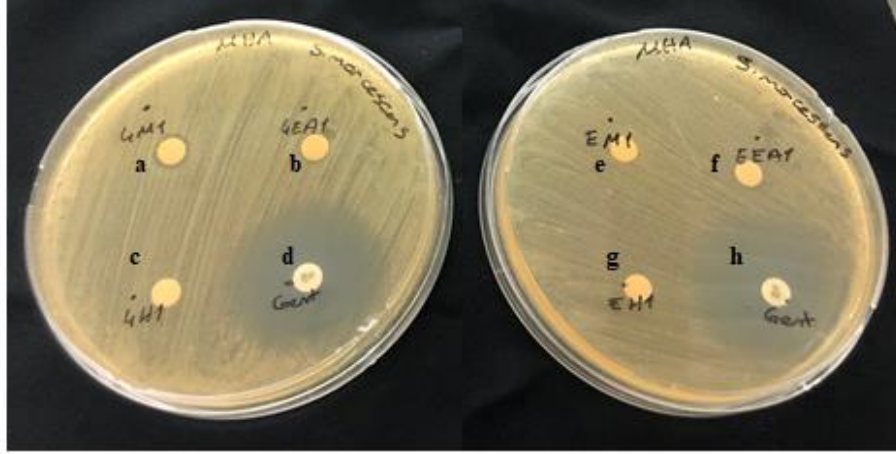
Şekil 4.5. *S. epidermidis* türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. Vankomisin, e. EM, f. EEA, g. EH, h. Vankomisin)

Steril boş disklerle (Bioanalyse BLK) emdirilmiş 6 çeşit liken özütü ve Vankomisin (Bioanalyse VA 30) antibiyotik diski ile *S. epidermidis* türüne karşı uygulanan agar disk difüzyon testi sonucunda, 4EA ve 4H özütleri çevresinde 7.5 mm, EEA özütü çevresinde 7 mm, EH özütü çevresinde 6.5 mm ve pozitif kontrol olarak kullanılan vankomisin (30 µg) diski çevresinde ise 7 mm zon çapı ölçülmüştür (Şekil 4.5.). 4M ve EM kodlu özütlerin emdirildiği disklerin çevresinde inhibisyon zonu oluşmamıştır. Verilere bakıldığında 4EA ve 4H kodlu özütlerin, kontrol diskinin oluşturduğundan daha fazla inhibisyon zonu oluşturduğu yani izolat 4 kodlu liken türünün antibakteriyel madde üretiminde substrat olarak kullanılabileceği görülmektedir. Sonuç olarak *S. epidermidis* bakteri türüne karşı üretilebilecek antimikrobiyal maddelerde etken madde olarak, 4EA ve 4H özütlerinin kullanılma potansiyelleri oldukça yüksektir.



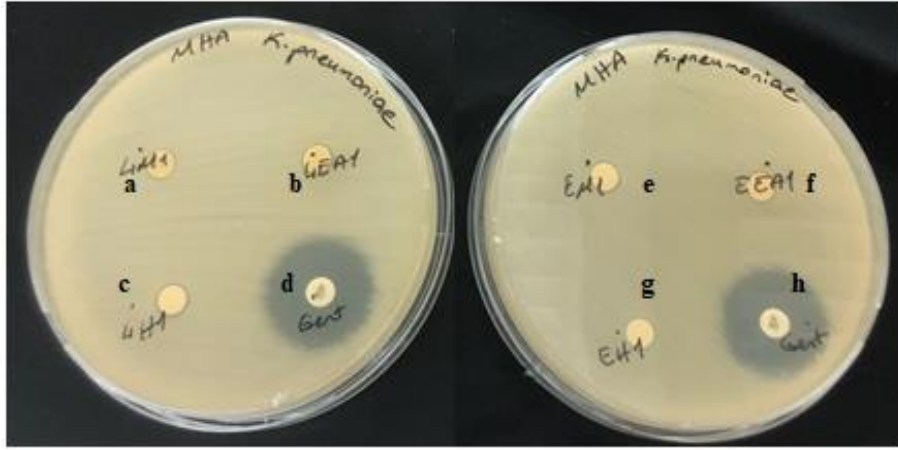
Şekil 4.6. *E. coli* türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. Gentamisin, e. EM, f. EEA, g. EH, h. Gentamisin)

Steril boş disklerle (Bioanalyse BLK) emdirilmiş 6 çeşit liken özütü ve Gentamisin (Bioanalyse CN 10) antibiyotik diski ile *E. coli* türüne karşı uygulanan agar disk difüzyon testi sonucunda, 4M, EEA ve EH özütleri çevresinde 10 mm, 4EA özütü çevresinde 9 mm, 4H özütünün çevresinde 6.5 mm ve pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin (10 µg) çevresinde ise 23.50 mm zon çapı ölçülmüştür (Şekil 4.6.). 4H ve EM kodlu özütlerin emdirildiği disklerin çevresinde inhibisyon zonu oluşmamıştır. *E. coli* bakteri türünün kullanılan liken özütlerinin tamamına duyarlı olduğu ancak hiçbir özütün kontrol diski kadar etkili olmadığı görülmektedir. Verilere bakıldığında izolat 4 kodlu liken ve *Evernia prunastri* liken türlerinin antibakteriyel madde sentezinde kullanılma potansiyeline sahip oldukları, *E. coli* bakteri türünün inhibisyonunu sağlayabilen liken metabolitlerinin en verimli şekilde etil asetat çözücüsü ile ekstrakte edilebildiği görülmektedir.



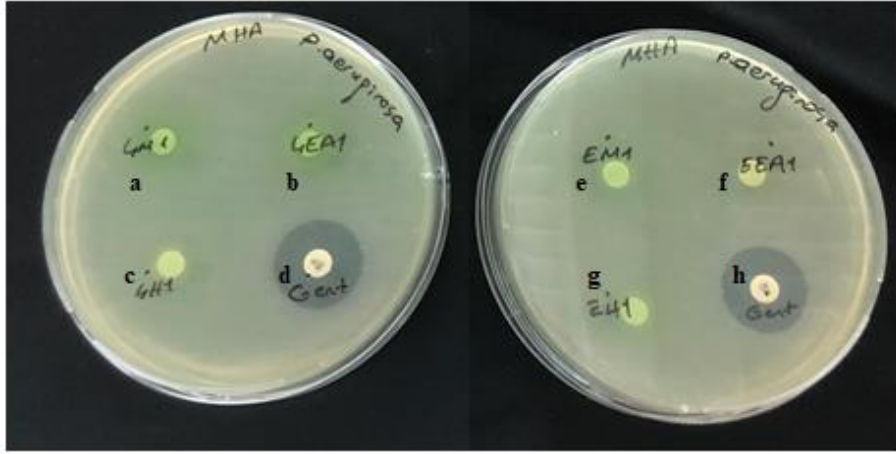
Şekil 4.7. *S. marcescens* türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. Gentamisin, e. EM, f. EEA, g. EH, h. Gentamisin)

Steril boş disklerle (Bioanalyse BLK) emdirilmiş 6 çeşit liken özütü ve Gentamisin (Bioanalyse CN 10) antibiyotik diski ile *S. marcescens* türüne karşı uygulanan agar disk difüzyon testi sonucunda, *S. marcescens* bakteri türünün kullanılan özütlerden yalnızca bir tanesine duyarlı olduğu, diğer özütlerin tamamına dirençli olduğu ve bu sebeple inhibisyon zonu oluşmadığı görülmektedir (Şekil 4.7.). 4M özütü çevresinde 7 mm zon çapı gözlenirken, pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin (10 µg) diski çevresinde ise 25.50 mm zon çapı ölçülmüştür.



Şekil 4.8. *K. pneumoniae* türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. Gentamisin, e. EM, f. EEA, g. EH, h. Gentamisin)

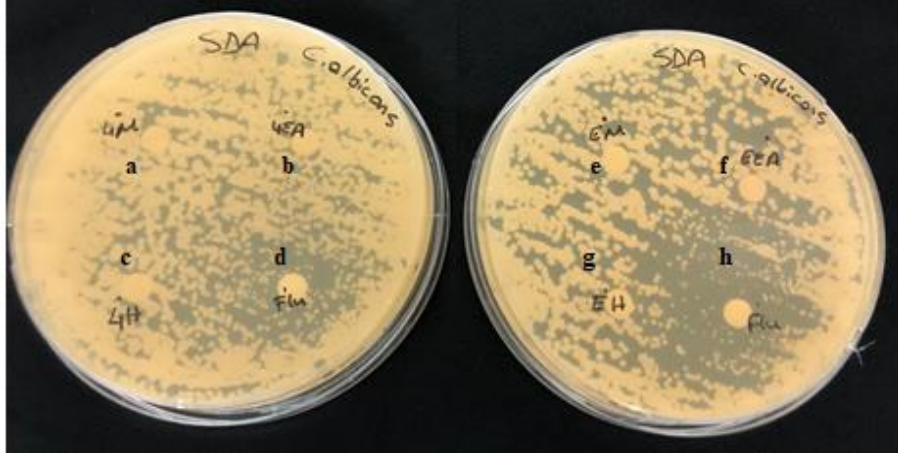
Steril boş disklere (Bioanalyse BLK) emdirilmiş 6 çeşit liken özütü ve Gentamisin (Bioanalyse CN 10) antibiyotik diski ile *K. pneumoniae* türüne karşı uygulanan agar disk difüzyon testi sonucunda, EH özütü çevresinde 8 mm, 4H özütü çevresinde 7.5 mm, 4M, 4EA, EM ve EEA özütleri çevresinde 7 mm, pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin (10 µg) diski çevresinde ise 21.83 mm zon çapı ölçülmüştür (Şekil 4.8.). *K. pneumoniae* bakteri türünün kullanılan özütlerin tamamına duyarlı olduğu, ayrıca 7 mm'den fazla zon çapı oluşturan özütlerin tamamının hekzan çözücüsü ile ekstrakte edildiği ve böylece *K. pneumoniae* türüne karşı sentezlenmesi hedeflenen antibakteriyel bir madde likenlerden izolasyonunda hekzan çözücüsünün avantaj sağlayacağı görülmektedir.



Şekil 4.9. *P. aeruginosa* türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. Gentamisin, e. EM, f. EEA, g. EH, h. Gentamisin)

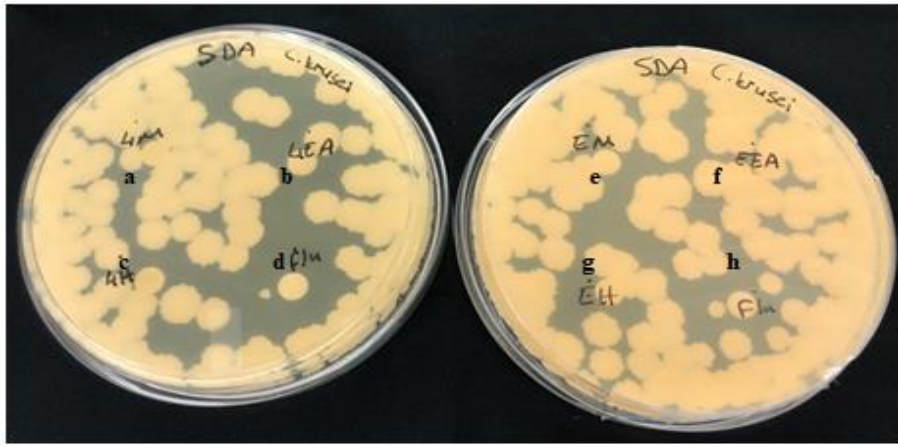
Steril boş disklerle (Bioanalyse BLK) emdirilmiş 6 çeşit liken özütü ve Gentamisin (Bioanalyse CN 10) antibiyotik diski ile *P. aeruginosa* türüne karşı uygulanan agar disk difüzyon testi sonucunda, 4M ve EEA özütleri çevresinde 6.5 mm, pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin (10 µg) diski çevresinde ise 19.67 mm zon çapı ölçülmüştür. *P. aeruginosa* bakteri türünün 4EA, 4H, EM ve EH özütlerine duyarlı olduğu ve bu sebeple inhibisyon zonu oluşmadığı görülmektedir (Şekil 4.9.). Özüt emdirilmiş disklerin etrafında üreyen bakterilerinde yeşil pigmentasyon gözlenmiştir ve bu durum *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturduğunu işaret ediyor olabilir. Pigmentasyonun sebebinin anlaşılması için biyofilm testlerinin uygulanması ve eğer biyofilm oluşumu teşvik edilmişse etki mekanizmalarının aydınlatılması literatüre oldukça önemli katkıda bulunacaktır.

Liken özütlerinden en az bir tanesi ile 7 mm'den fazla inhibisyon zonu gözlenen bakteri türleri (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*), tüm özütlerin MİK değerlerinin belirlenmesi amacıyla seçilmiştir.



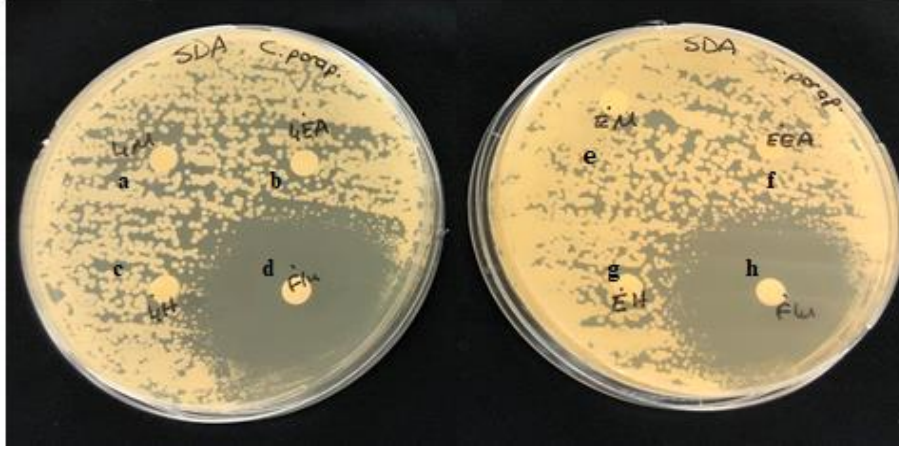
Şekil 4.10. *C. albicans* türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. Flukonazol, e. EM, f. EEA, g. EH, h. Flukonazol)

Flukonazol ve 6 çeşit liken özütü emdirilmiş diskler (Bioanalyse BLK) ile *C. albicans* türüne karşı uygulanan agar disk difüzyon testi sonucunda hiçbir disk çevresinde zon çapı belirlenemedi (Şekil 4.10.).



Şekil 4.11. *C. krusei* türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. Flukonazol, e. EM, f. EEA, g. EH, h. Flukonazol)

Flukonazol ve 6 çeşit liken özütü emdirilmiş diskler (Bioanalyse BLK) ile *C. krusei* türüne karşı uygulanan agar disk difüzyon testi sonucunda hiçbir disk çevresinde zon çapı belirlenemedi (Şekil 4.11.).



Şekil 4.12. *C. parapsilosis* türüne uygulanan agar disk difüzyon testi görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. Flukonazol, e. EM, f. EEA, g. EH, h. Flukonazol)

Flukonazol ve 6 çeşit liken özütü emdirilmiş diskler (Bioanalyse BLK) ile *C. parapsilosis* türüne karşı uygulanan agar disk difüzyon testi sonucunda, liken özütlerinin emdirildiği disklerin çevresinde zon çapı belirlenemezken, pozitif kontrol olarak kullanılan Flukonazol (μ g) diski çevresinde 32.83 mm zon çapı ölçülmüştür (Şekil 4.12.).

Candida cinsine ait türlerin katı besiyerinde üreme morfolojileri nedeniyle zon çapları net olarak belirlenememiştir. Bu nedenle MİK belirleme deneyleri tüm *Candida* türleri için uygulanmıştır.

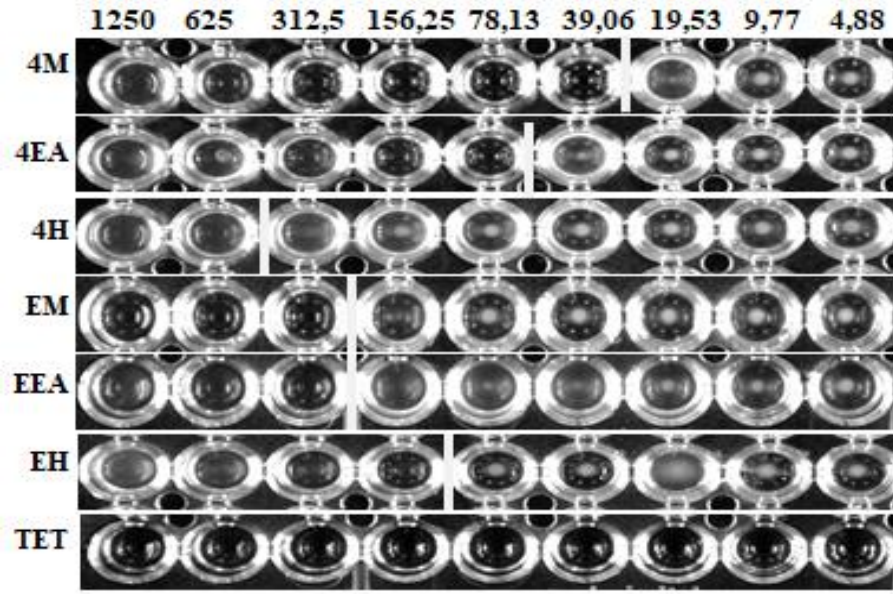
Agar disk difüzyon yöntemi ile elde edilen zon çapları mm cinsinden Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Agar disk difüzyon yöntemi ile elde edilen zon çapları (mm)

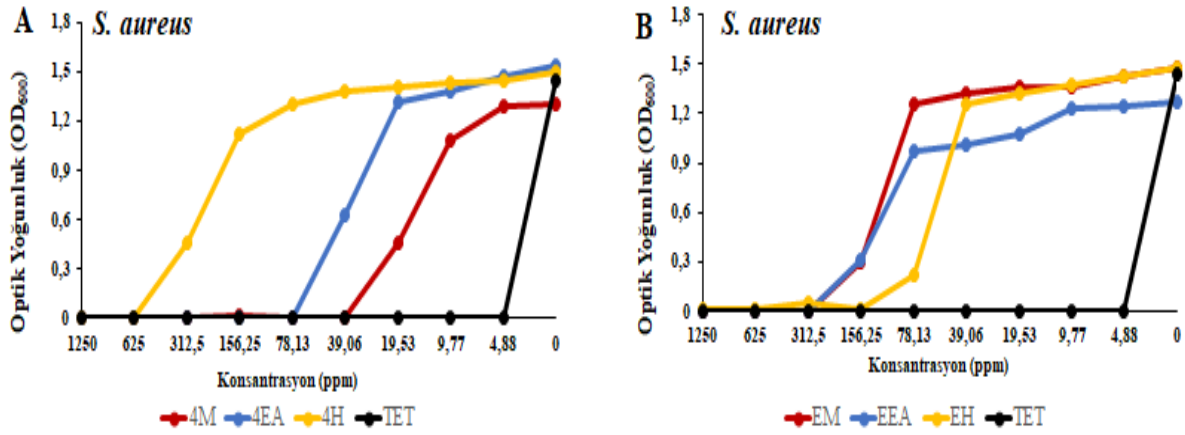
Mikroorganizma	4M	4EA	4H	EM	EEA	EH	K*
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	20.33
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	23.33
<i>S. aureus</i>	13	10.5	8	0	10	7.5	16.83
<i>S. epidermidis</i>	0	7.5	7.5	0	7	6.5	7
<i>E. coli</i>	10	9	0	0	10	10	23.50
<i>S. marcescens</i>	7	0	0	0	0	0	25.50
<i>K. pneumoniae</i>	7	7	7.5	7	7	8	21.83
<i>P. aeruginosa</i>	6.5	0	0	0	6.5	0	19.67

K*: Pozitif kontrol olarak kullanılan antibakteriyel madde
(Gr + bakteriler için: Vankomisin, Gr – bakteriler için Gentamisin)

S. aureus bakteri türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü Şekil 4.13.'de ve elde edilen absorbands değerleri Şekil 4.14.'de gösterilmiştir.



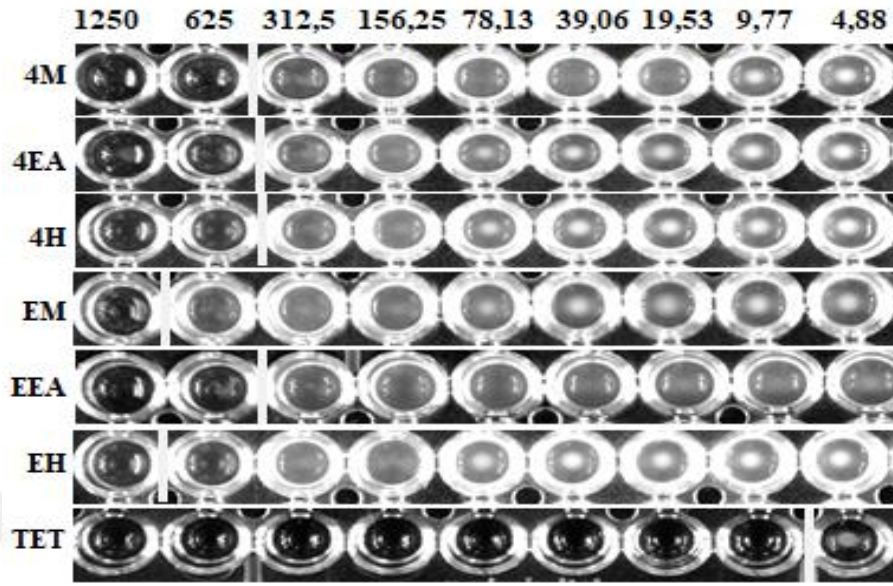
Şekil 4.13. *S. aureus* türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü



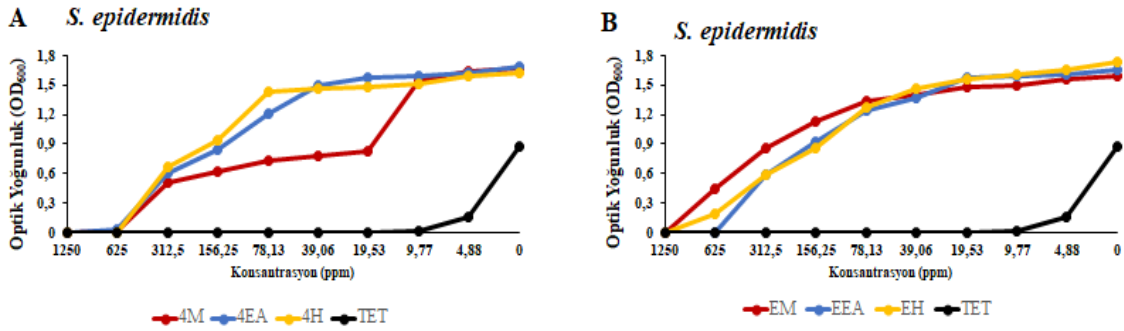
Şekil 4.14. Liken özütleri ve tetrasiklinin *S. aureus* türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi (A. İzolat 4 liken türünden elde edilen özütler ve tetrasiklin B. *Evernia prunastri* liken türünden elde edilen özütler ve tetrasiklin)

6 çeşit liken özütü ve pozitif kontrol olarak tetrasiklin antimikrobiyal bileşiğin *S. aureus* bakteri türüne karşı kullanıldığı MİK belirleme testinin sonucunda, en iyi antimikrobiyal aktiviteyi gösteren özüt 4M olarak belirlenmiştir. 4M, 4EA, 4H, EM, EEA, EH özütlerinin MİK değerleri sırasıyla 39,06, 78,13, 625, 312,5, 312,5, 156,25 ppm olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol tetrasiklinin ise MİK değerinin 4,88 ppm'den az olduğu belirlenmiştir.

S. epidermidis bakteri türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü Şekil 4.15.'de ve elde edilen absorbans değerleri Şekil 4.16.'de gösterilmiştir.



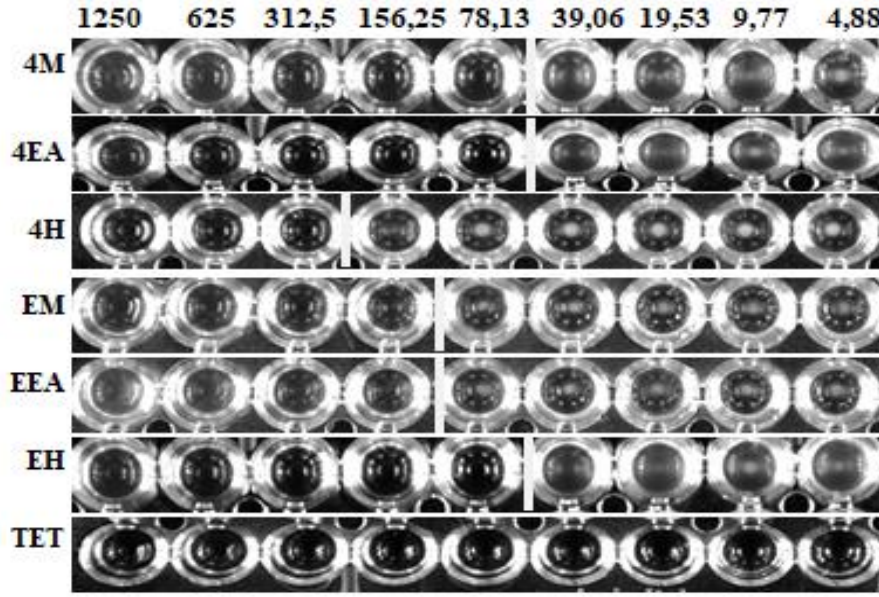
Şekil 4.15. *S. epidermidis* türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü



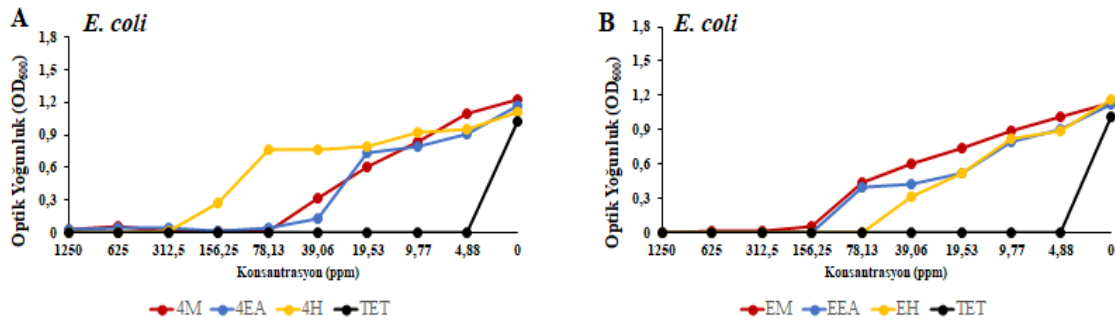
Şekil 4.16. Liken özütleri ve tetrasiklinin *S. epidermidis* türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi (A. İzolat 4 liken türünden elde edilen özütler ve tetrasiklin B. *Evernia prunastri* liken türünden elde edilen özütler ve tetrasiklin)

6 çeşit liken özütü ile *S. epidermidis* bakteri türüne uygulanan MİK belirleme testinin sonucunda, 4M, 4EA, 4H, EM, EEA, EH özütlerinin MİK değerleri sırasıyla 625, 625, 625, 1250, 625, 1250 ppm olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak tetrasiklin antibiyotığı kullanılmıştır ve MİK değeri 9.77 ppm'dir. Sonuçlara bakıldığında en etkili liken türünün izolat 4, en iyi çözücünün ise etil asetat olduğunu görülmektedir.

E. coli bakteri türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü Şekil 4.17.'de ve elde edilen absorbands değerleri Şekil 4.18.'de gösterilmiştir.



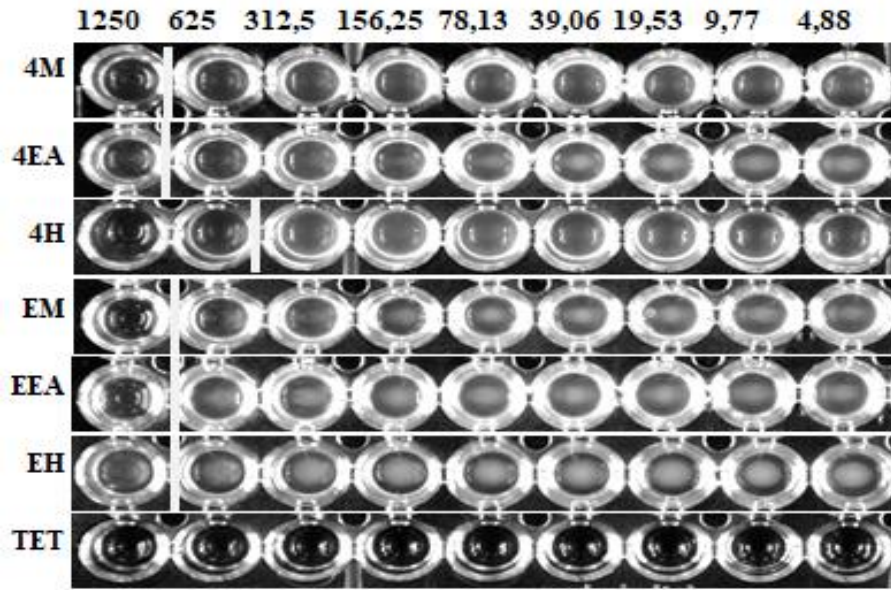
Şekil 4.17. *E. coli* türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü



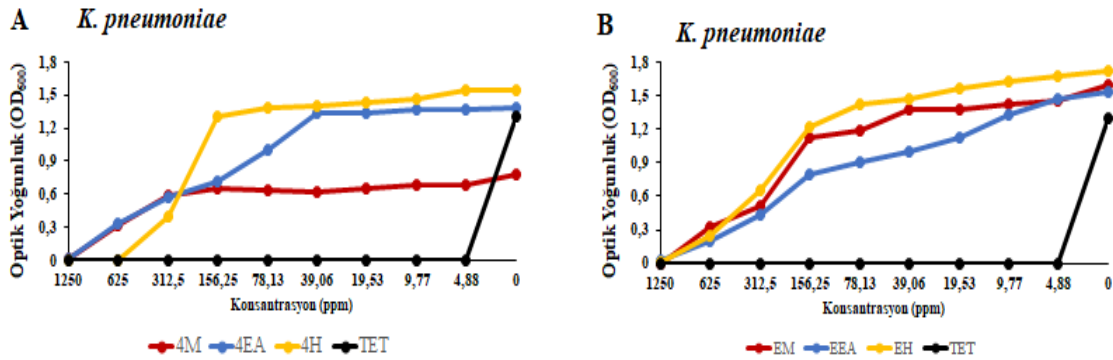
Şekil 4.18. Liken özütleri ve tetrasiklinin *E. coli* türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi (A. İzolat 4 liken türünden elde edilen özütler ve tetrasiklin B. *Evernia prunastri* liken türünden elde edilen özütler ve tetrasiklin)

6 çeşit liken özütü ile *E. coli* bakteri türüne uygulanan MİK belirleme testinin sonucunda, 4M, 4EA, 4H, EM, EEA, EH özütlerinin MİK değerleri sırasıyla 78.13, 78.13, 312.5, 156.25, 156.25, 78.13 ppm olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak tetrasiklin antibiyotiği kullanılmıştır ve MİK değerinin 4.88 ppm'den küçük olduğu belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında en etkili liken türünün izolat 4 olduğu görülmektedir.

K. pneumoniae bakteri türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü Şekil 4.19.'de ve elde edilen absorbans değerleri Şekil 4.20.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. *K. pneumoniae* türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü



Şekil 4.20. Liken özütleri ve tetrasiklinin *K. pneumoniae* türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi (A. İzolat 4 liken türünden elde edilen özütler ve tetrasiklin B. *Evernia prunastri* liken türünden elde edilen özütler ve tetrasiklin)

6 çeşit liken özütü ile *K. pneumoniae* bakteri türüne uygulanan MİK belirleme testinin sonucunda, 4M, 4EA, 4H, EM, EEA, EH özütlerinin MİK değerleri sırasıyla 1250, 1250, 625, 1250, 1250, 1250 ppm olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak tetrasiklin antibiyotiği kullanılmıştır ve MİK değerinin 4.88 ppm'den küçük olduğu belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında en etkili özütün 4H olduğu görülmektedir.

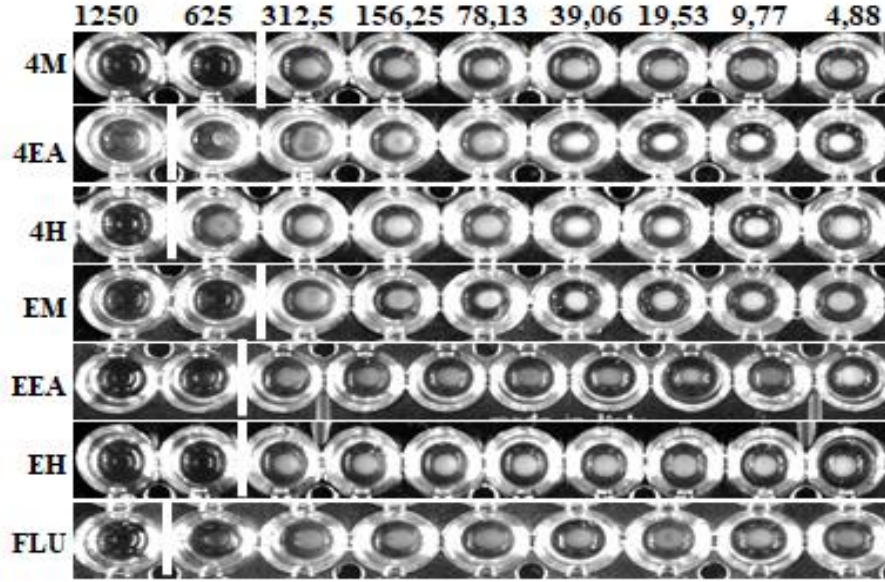
Liken özütlerinin antibakteriyel aktiviteleri Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Liken özütlerinin bakteriler üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları (µg/ml)

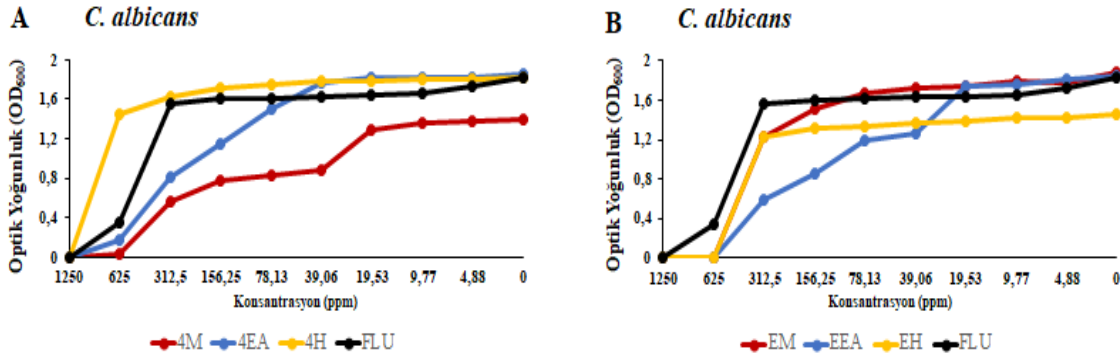
Mikroorganizma	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Etken Madde				
4M	39.06	625	78.13	1250
4EA	78.13	625	78.13	1250
4H	625	625	312.5	625
EM	312.5	1250	312.5	1250
EEA	312.5	625	156.25	1250
EH	156.25	1250	78.13	1250
K*	≤ 4.88	9.77	≤ 4.88	≤ 4.88

K* : Pozitif kontrol olarak kullanılan antibakteriyel madde (Tetrasiklin)

C. albicans türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü Şekil 4.21.'de ve elde edilen absorbans değerleri Şekil 4.22.'de gösterilmiştir.



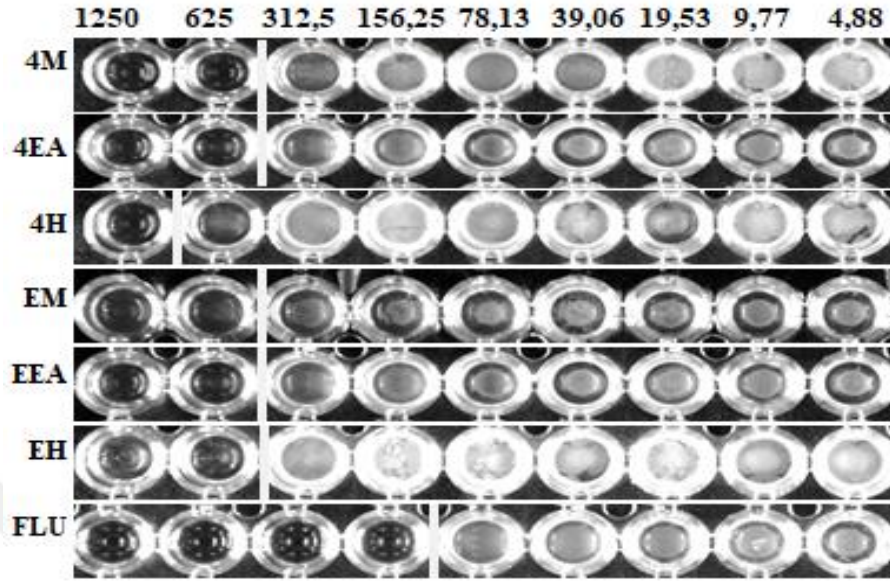
Şekil 4.21. *C. albicans* türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü



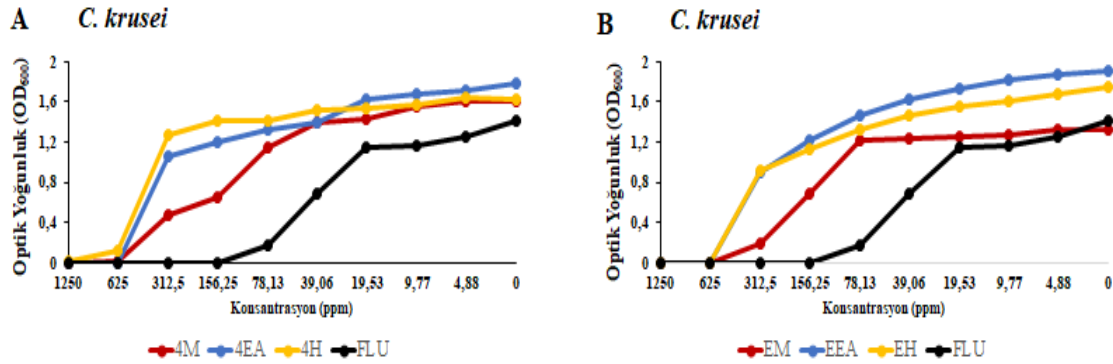
Şekil 4.22. Liken özütleri ve flukonazolun *C. albicans* türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi (A. İzolat 4 liken türünden elde edilen özütler ve flukonazol B. *Evernia prunastri* liken türünden elde edilen özütler ve flukonazol)

6 çeşit liken özütü ile *C. albicans* maya türüne uygulanan MİK belirleme testinin sonucunda, 4M, 4EA, 4H, EM, EEA, EH özütlerinin MİK değerleri sırasıyla 625, 1250, 1250, 625, 625, 625 ppm olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak flukonazol kullanılmıştır ve MİK değeri 1250 ppm'dir. Veriler incelendiğinde en etkili liken türünün *Evernia prunastri* ve en iyi çözücünün ise metanol olduğu görülmektedir. 4M, EM, EEA ve EH özütlerinin antifungal aktivitelerinin kontrolden yüksek olması, bu özütlerin antifungal bileşiklerin sentezinde kullanılma potansiyellerinin yüksek olduğunu göstermektedir.

C. krusei türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü Şekil 4.23.'de ve elde edilen absorbands değerleri Şekil 4.24.'de gösterilmiştir.



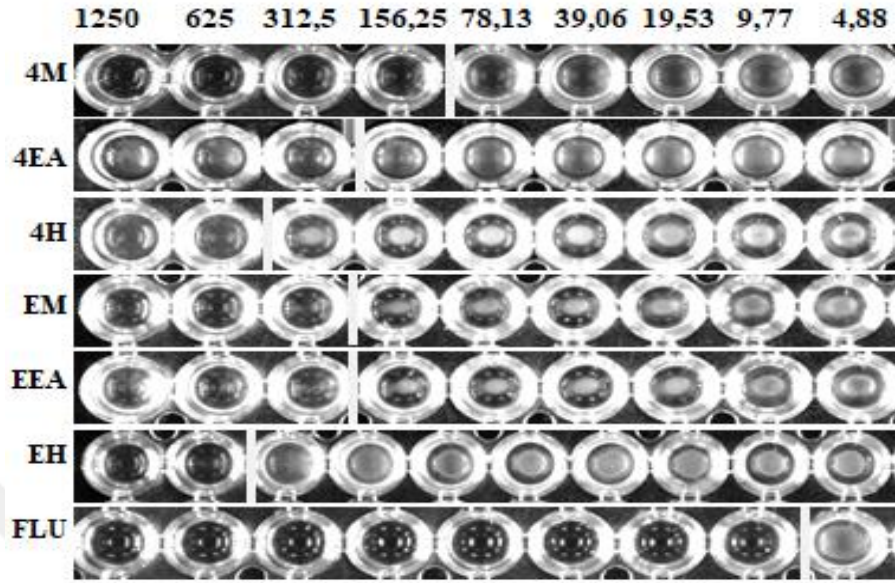
Şekil 4.23. *C. krusei* türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü



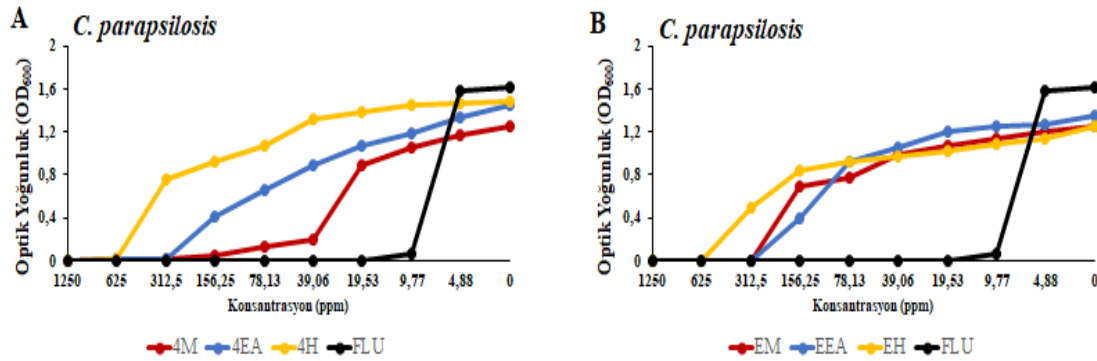
Şekil 14.24. Liken özütleri ve flukonazolun *C. krusei* türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi (A. İzolat 4 liken türünden elde edilen özütler ve flukonazol B. *Evernia prunastri* liken türünden elde edilen özütler ve flukonazol)

6 çeşit liken özütü ile *C. krusei* maya türüne uygulanan MİK belirleme testinin sonucunda, 4M, 4EA, 4H, EM, EEA, EH özütlerinin MİK değerleri sırasıyla 625, 625, 1250, 625, 625, 625 ppm olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak flukonazol kullanılmıştır ve MİK değeri 156.25 ppm'dir. Veriler incelendiğinde en etkili likenin *Evernia prunastri* ve en iyi çözücünün ise etil asetat olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

C. parapsilosis türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü Şekil 4.25.'de ve elde edilen absorbands değerleri Şekil 4.26.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.25. *C. parapsilosis* türüne uygulanan MİK testinin görüntüsü



Şekil 4.26. Liken özütleri ve flukonazolun *C. parapsilosis* türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi (A. İzolat 4 liken türünden elde edilen özütler ve flukonazol B. *Evernia prunastri* liken türünden elde edilen özütler ve flukonazol)

6 çeşit liken özütü ile *C. parapsilosis* maya türüne uygulanan MİK belirleme testinin sonucunda, 4M, 4EA, 4H, EM, EEA, EH özütlerinin MİK değerleri sırasıyla 156.25, 312.5, 625, 312.5, 312.5, 625 ppm olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak flukonazol kullanılmıştır ve MİK değeri 9.77 ppm'dir. Veriler incelendiğinde en etkili likenin izolat 4 ve en iyi çözücünün ise metanol olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

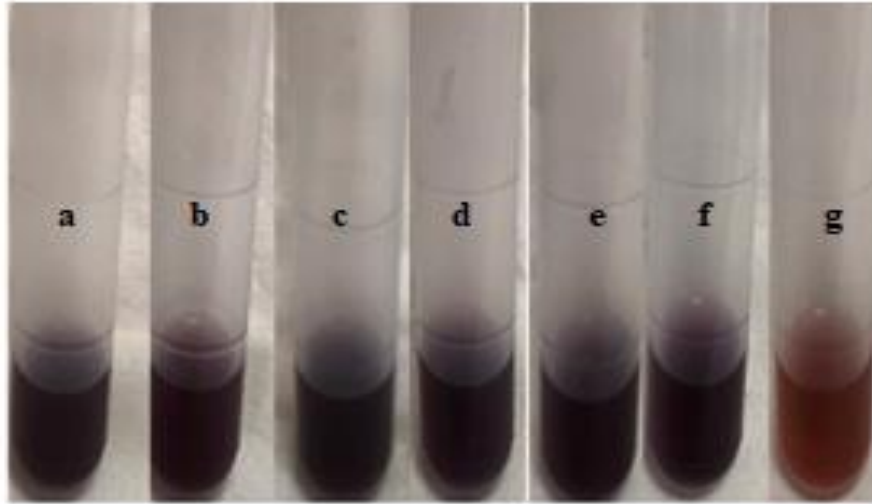
Liken özütlerinin antifungal aktiviteleri Tablo 4.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Liken özütlerinin mayalar üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları (µg/ml)

Mikroorganizma	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Etken Madde			
4M	625	625	156.25
4EA	1250	625	312.5
4H	1250	1250	625
EM	625	625	312.5
EEA	625	625	312.5
EH	625	625	625
K*	1250	156.25	9.77

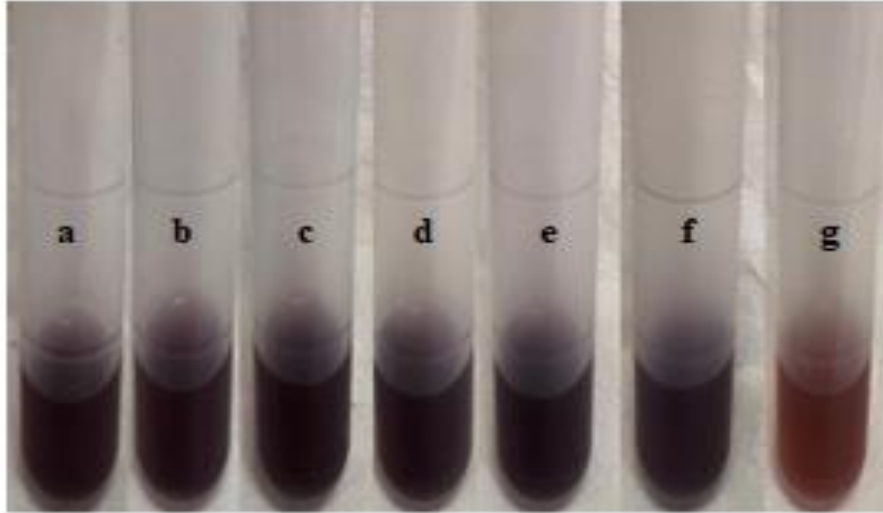
K*: Pozitif kontrol olarak kullanılan antifungal madde (Flukonazol)

4.4. Likenlerin Antioksidan Aktivitesi



Şekil 4.27. 10 ppm liken özütü ve standart madde içeren örneklerin görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. EM, e. EEA, f. EH, g. BHT)

10 ppm liken özütü ve BHT içeren tüplerin görüntüsü Şekil 4.27.'de verilmiştir. Sonuçlar görsel olarak incelendiğinde, BHT içeren çözeltinin rengine en yakın rengin 4EA liken özütü içeren çözeltide olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 28. 20 ppm liken özütü ve standart madde içeren örneklerin görüntüsü (a. 4M, b. 4EA, c. 4H, d. EM, e. EEA, f. EH, g. BHT)

20 ppm liken özütü ve BHT içeren tüplerin görüntüsü Şekil 4.28.'de verilmiştir. Sonuçlar görsel olarak incelendiğinde, BHT içeren çözeltinin rengine en yakın rengin 4M liken özütü içeren çözeltide olduğu görülmektedir.

Renk değişimleri, kantitatif olarak spektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiştir. Liken özütlerinin % DPPH* giderme aktivite değerleri Tablo 4.5.'de gösterilmiştir.

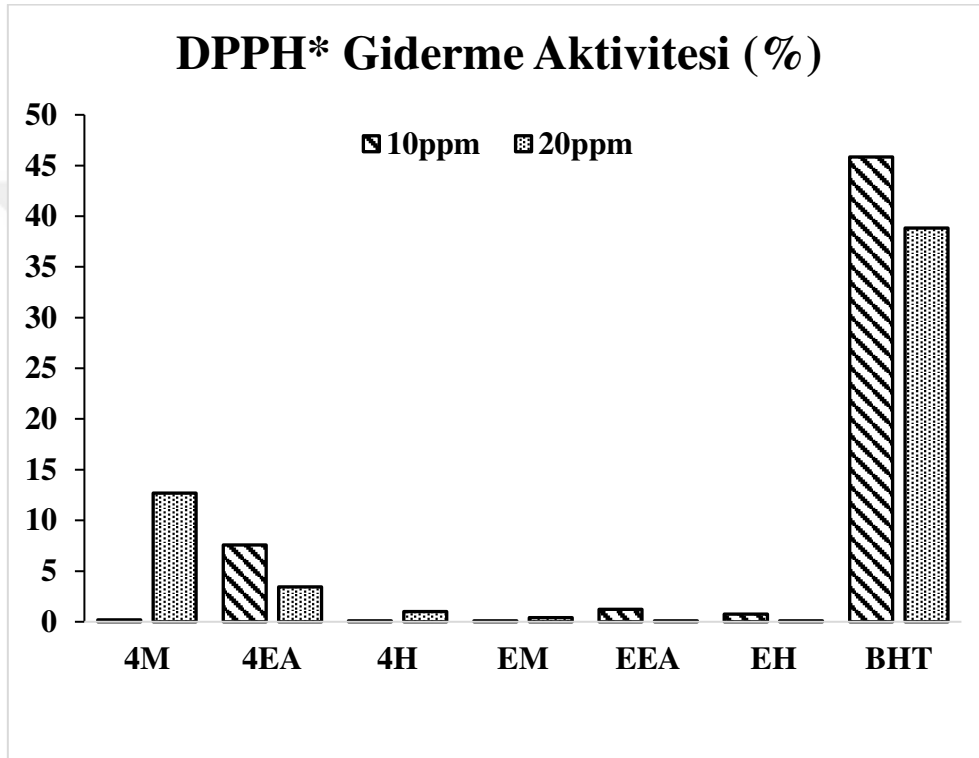
Tablo 4.5. Liken özütlerinin DPPH* giderme aktivitesi (%)

ÖZÜT	10ppm	20ppm
4M	0.202	12.694
4EA	7.562	3.444
4H	0	1.013
EM	0	0.405
EEA	1.215	0
EH	0.743	0

10 ppm liken özütü içeren çözeltilerden en yüksek DPPH* giderme aktivitesi gösteren liken özüt % 7.56 ile 4EA olarak belirlenmiştir. 10 ppm'de antioksidan aktivite gösteren diğer özütler ise 1.22 ile EEA, % 0.74 ile EH ve % 0.20 ile 4M şeklinde sıralanmaktadır. 4H ve EM özütlerinin 10 ppm konsantrasyonlu çözeltileri antioksidan aktivite göstermemiştir.

20 ppm liken özütü içeren çözeltilerden en yüksek DPPH* giderme aktivitesi gösteren liken özütü % 12.69 ile 4M olarak belirlenmiştir. 20 ppm’de antioksidan aktivite gösteren diğer özütler ise %3.44 ile 4EA, % 1.01 ile 4H, ve % 0.40 ile EM şeklinde sıralanmaktadır. EEA ve EH özütlerinin ise 20 ppm konsantrasyonlu çözeltileri antioksidan aktivite göstermemiştir.

Liken özütleri ve standart maddenin % DPPH* giderme aktivite grafiği Şekil 4.29.’de gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Liken özütleri ve standart maddenin DPPH* giderme aktivitesi (%)

Standart maddenin 10 ppm konsantrasyondaki antioksidan aktivitesi % 45.85 iken 20 ppm konsantrasyondaki antioksidan aktivitesi % 38.83 olarak belirlenmiştir. Her iki konsantrasyonda da antioksidan aktivite gösteren özüt 4EA’dır ancak en yüksek antioksidan aktivite, 4M özütünün 20 ppm konsantrasyonlu çözeltisinde gözlenmiştir.

4.5. Likenlerin Antikanser Aktivitesi

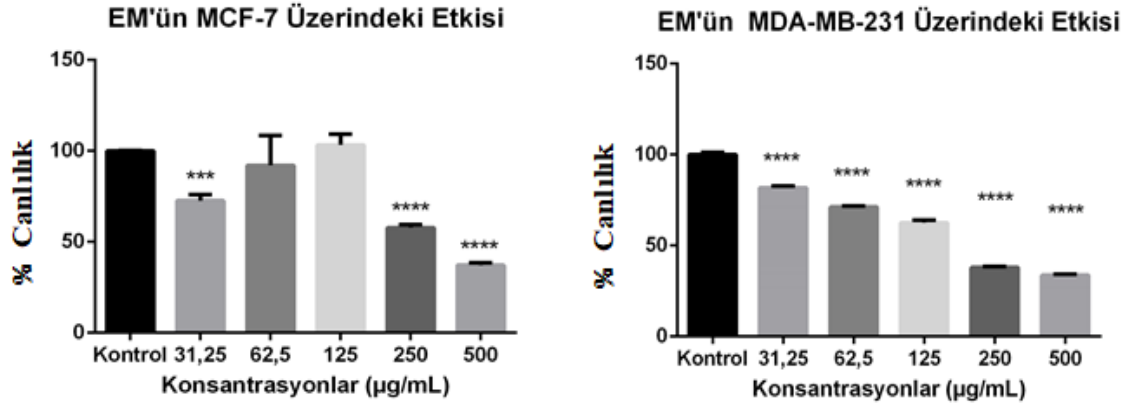
Liken özütlerinin sitotoksik aktiviteleri için IC₅₀ değerleri µg/ml cinsinden Tablo 4.6.'da, EM özütünün yüzde canlılık değerleri Şekil 4.30.'da, EEA özütünün hücre yüzde canlılık değerleri Şekil 4.31.'de ve Doksorubisin'in MCF-7, MDA-MB-231 ve 3T3 hücre hattı üzerindeki yüzde canlılık değerleri Şekil 4.32.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Liken özütlerin IC₅₀ değerleri (µg/ml)

Özüt	NIH3T3	MCF-7	MDA-MB-231
4M	95.58	>500	>500
4EA	101.5	>500	>500
4H	150.5	>500	>500
EM	276.6	241.5	75.16
EEA	68.40	70.73	201.8
EH	68.33	>500	>500
K*	173.3	11.53	8.073

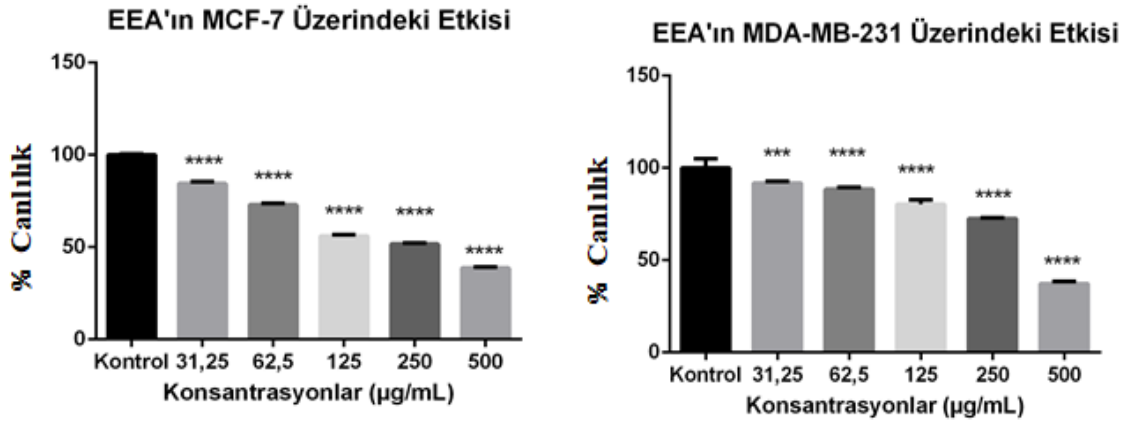
K*: Pozitif kontrol olarak Doksorubisin kullanılmıştır.

Liken özütlerinin IC₅₀ değerleri sağlıklı hücre hattı NIH3T3 için; 4M özütünde 95.58 µg/ml, 4EA özütünde 101.5 µg/ml, 4H özütünde 150.5 µg/ml, EM özütünde 276.6 µg/ml, EEA özütünde 68.40 µg/ml, EH özütünde 68.33 µg/ml, Doksorubisinde 173.3 µg/ml olarak, MCF-7 meme kanseri hücre hattı için; 4M özütünde >500 µg/ml, 4EA özütünde >500 µg/ml, 4H özütünde >500 µg/ml, EM özütünde 241.5 µg/ml, EEA özütünde 70.73 µg/ml, EH özütünde >500 µg/ml, Doksorubisinde 11.53 µg/ml olarak ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı için; 4M özütünde >500 µg/ml, 4EA özütünde >500 µg/ml, 4H özütünde >500 µg/ml, EM özütünde 75.16 µg/ml, EEA özütünde 201.8 µg/ml, EH özütünde >500 µg/ml, Doksorubisinde 8.073 µg/ml olarak bulunmuştur. Veriler incelendiğinde EM ve EEA özütlerinin antikanser bileşiklerin sentezinde kullanılma potansiyeli olduğu görülmektedir.



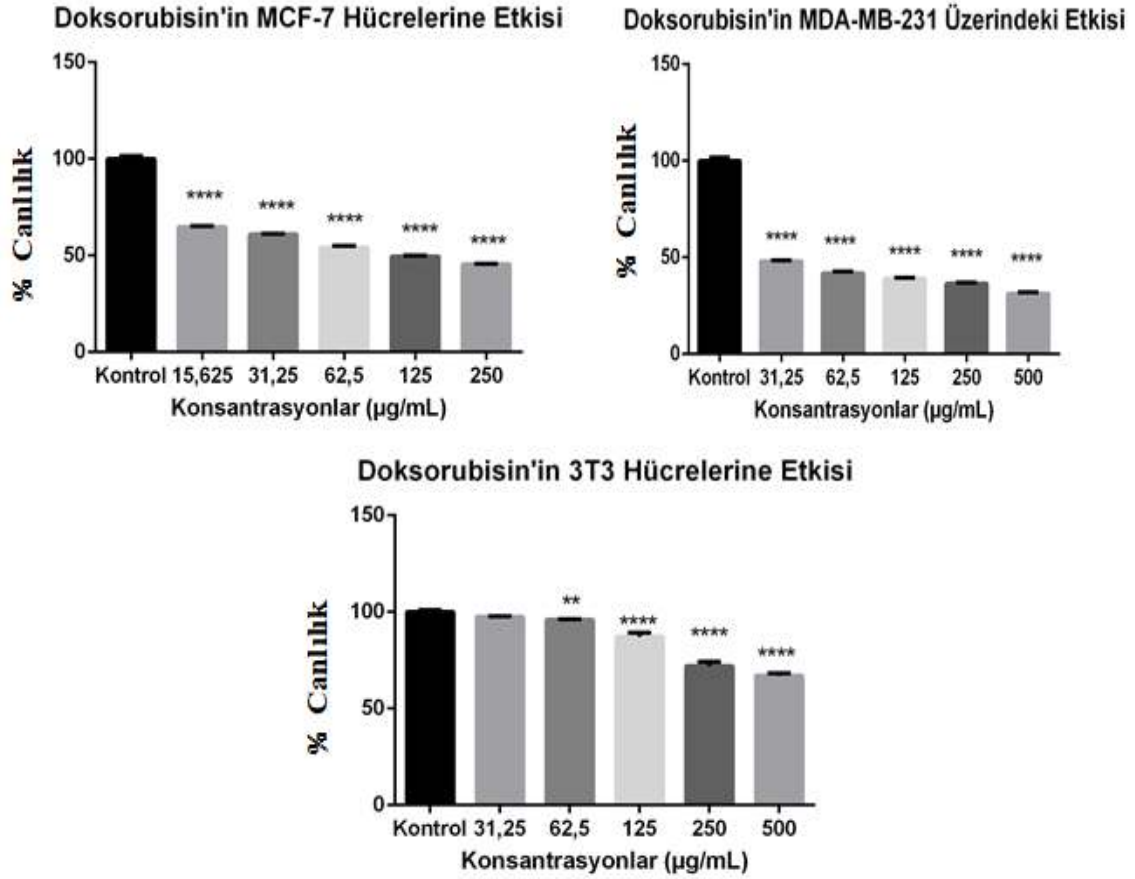
Şekil 4.30. EM özütünün MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (****p<0.0001, n=8)

EM özütünün yüzde canlılık değerleri MCF-7 hücre hattı için 31.25 µg/ml'de % 72.70, 62.5 µg/ml'de % 92, 125 µg/ml'de % 103.28, 250 µg/ml'de % 57.80, 500 µg/ml'de % 37.15 ve MDA-MB-231 hücre hattı için 31.25 µg/ml'de % 81.82, 62.5 µg/ml'de % 71.16, 125 µg/ml'de % 62.50, 250 µg/ml'de % 37.89 ve 500 µg/ml'de % 33.67'dir.



Şekil 4.31. EEA özütünün MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (****p<0.0001, n=8)

EEA özütünün yüzde canlılık değerleri MCF-7 hücre hattı için 31.25 µg/ml'de % 84.48, 62.5 µg/ml'de % 72.93, 125 µg/ml'de % 56.08, 250 µg/ml'de % 51.68, 500 µg/ml'de % 38.75 ve MDA-MB-231 hücre hattı için 31.25 µg/ml'de % 91.81, 62.5 µg/ml'de % 88.46, 125 µg/ml'de % 80.34, 250 µg/ml'de % 72.62 ve 500 µg/ml'de % 37.29'dur.



Şekil 4.32. Doksorubisin'in MCF-7, MDA-MB-231 ve 3T3 hücre hattı üzerindeki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (****p<0.0001, n=8)

Kontrol olarak kullanılan Doksorubisin'in yüzde canlılık değerleri MCF-7 hücre hattı için 15.62 µg/ml'de % 64.86, 31.25 µg/ml'de % 60.99, 62.5 µg/ml'de % 54.12, 125 µg/ml'de % 49.58, 250 µg/ml'de % 45.38, MDA-MB-231 hücre hattı için 31.25 µg/ml'de % 48.04, 62.5 µg/ml'de % 41.80, 125 µg/ml'de % 38.89, 250 µg/ml'de % 36.38 ve 500 µg/ml'de % 31.17 ve 3T3 hücre hattı için 31.25 µg/ml'de % 97.47, 62.5 µg/ml'de % 95.90, 125 µg/ml'de % 87.13, 250 µg/ml'de % 71.93, 500 µg/ml'de % 58.52'dir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda kullanılan izolat 4 kodlu liken türünün, ITS dizi analizi ile tanımlanması sonucunda, *Pseudoevernia furfuracea* (*P. furfuracea*) olduğu belirlenmiştir.

Likenlerden elde edilen özütlerin miktarları incelendiğinde, en verimli ekstraksiyonun metanol çözücüsü ile gerçekleştiği görülmektedir. En az özüt tüm liken türlerinde hekzan çözücüsü ile elde edilmiştir. Bu durumun sebebi, farklı yapılardan ve yüklerden meydana gelen sekonder bileşiklerin, çözücülerdeki davranış farklılığı olabilir.

Agar disk difüzyon testi sonuçları göz önüne alındığında, *P. furfuracea* liken türünün metanol özütünün en yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Kullanılan çözücüler karşılaştırıldığında ise en iyi çözücünün hekzan olduğu belirlenmiştir. Gram + ve Gram – bakteri türleri için karşılaştırma yapıldığında, Gr – bakterilerin daha duyarlı olduğu söylenebilir. Bakteriler arasında en dirençli türlerin *E. faecalis* ve *B. subtilis*, en duyarlı türün ise *S. aureus* olduğu görülmektedir.

Osmanağaoğlu ve arkadaşları (2000) tarafından *P. furfuracea* liken türünün aseton ve kloroform özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri agar disk difüzyon yöntemi ile çeşitli bakteri hücrelerine karşı test edilmiş ancak Gram negatif bakterilerde (*E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*) inhibisyon zonu gözlenmediği bildirilmiştir (Osmanağaoğlu vd., 2000: 18). *P. furfuracea* liken türünü araştırdığımız çalışmamızda, *E. coli* türünde, metanol özüt ile 10 mm, etil asetat özütü ile 9 mm ve hekzan özütü ile 6.5 mm, *K. pneumoniae* türünde ise metanol özütü ile 7 mm, etil asetat özütü ile 7 mm ve hekzan özütü ile 7.5 mm zon çapı tespit ettik. Ancak bu çalışmayla paralel şekilde *P. aeruginosa* türünde inhibisyon zonu belirleyemedik. Bu iki çalışma karşılaştırıldığında, *P. furfuracea* liken türünden antimikrobiyal aktiviteli bileşiklerin ekstraksiyonunda aseton veya kloroform yerine metanol, etil asetat ve hekzan çözücülerinin kullanılmasının avantaj sağladığı görülmektedir.

Yapılan bir çalışmada, *E. prunastri* liken türünden aseton ile elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivitesi, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri türleri için agar disk difüzyon testi ile belirlenmiş ve zon çapları sırasıyla 25 mm, 20 mm, 0 mm ve 0 mm olarak bildirilmiştir (Stojanović vd., 2018: 1219).

Sonuçlarımız incelendiğinde *E. prunastri* liken türünün metanol, etil asetat ve hekzan çözücülerinden elde edilen özütlerin, *B. subtilis* türünde inhibisyon zonu oluşturmadığı, *S. aureus* türünde çözücü sırasıyla 0 mm, 10 mm, 7.5 mm zon çapı oluşturduğu, *E. coli* türünde çözücü sırasıyla 5.5 mm, 10 mm, 10 mm zon çapı oluşturduğu ve *P. aeruginosa* türünde yalnız etil asetat özütünün 6.5 mm zon çapı oluşturduğu görülmektedir. İki çalışma incelendiğinde ekstraksiyonda kullanılan çözücünün antimikrobiyal aktiviteye etkisinin bakteri türüne bağlı olarak değiştiği sonucu ortaya çıkmaktadır. *B. subtilis* ve *S. aureus* inhibisyonu hedeflendiğinde aseton çözücüsünün, *E. coli* inhibisyonu hedeflendiğinde etil asetat ve hekzan çözücüsünün, *P. aeruginosa* inhibisyonu hedeflendiğinde ise etil asetat çözücüsünün en uygun çözücü olduğu görülmektedir.

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu deneyleri sonucunda, *S. aureus* bakteri türünü 39.06 ppm konsantrasyonda inhibe eden *P. furfuracea* liken türünün metanol özütünün en yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Özütlerin MİK testindeki etkisi incelendiğinde, en dirençli bakteri türü *K. pneumoniae*, en duyarlı bakteri türü ise *E. coli* olarak belirlenmiştir. Maya hücreleri arasından *C. albicans* ve *C. krusei* türlerinin eşit derecede dirençli olduğu, en duyarlı türün ise *C. parapsilosis* olduğu görülmektedir. Liken türleri karşılaştırıldığında en fazla antimikrobiyal aktivite gösteren türün *P. furfuracea* olduğu görülmektedir. Kullanılan çözücüler karşılaştırıldığında, *P. furfuracea* liken türünden metanol çözücüsü ile, *E. prunastri* liken türünden hekzan çözücüsü ile antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşiklerin daha yüksek verimle elde edilebileceği görülmektedir.

Mitrović ve arkadaşları (2011), tarafından yürütülen bir çalışmada *E. prunastri* liken türünden metanol ile elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri, *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans* türlerine karşı MİK testi ile belirlenmiş ve mikroorganizmaların MİK değerleri sırasıyla 156, 10000, 2500 µg/ml olarak rapor edilmiştir. Yürüttüğümüz tez deneylerinde kullandığımız *E. prunastri* liken türüne ait metanol, etil asetat ve hekzan özütlerinin MİK değerleri ise *S. aureus* için sırasıyla 312.5, 312.5 ve 156.25 µg/ml, *E. coli* için sırasıyla 312.5, 156.25, 78.13 µg/ml, *C. albicans* için tümü 625 µg/ml olarak belirlenmiştir (Mitrović vd., 2011: 5431-5434). İki çalışma karşılaştırıldığında, çözücünün etkisinin yanı sıra, aynı çözücülerde de farklı sonuçlar elde edilebileceği görülmektedir.

Bunun nedeni likenin geliştiği ortam, ekstraksiyon yöntemi veya kullanılan suşların farklılık göstermesi olabilir. Sonuçlar göstermektedir ki *E. coli* ve *C. albicans* türlerine karşı antibakteriyel etkili maddelerin likenlerinden ekstraksiyonunda, etil asetat ve hekzan çözücülerini metanol çözücüsünden daha etkilidir.

Çalışmamıza benzer bir başka araştırmada, *P. furfuracea* liken türünün metanol ve etil asetat özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans* türleri için belirlenmiştir. *P. furfuracea* liken türünün MİK değerleri metanol özütü için sırasıyla, 400, 2500 ve ≤ 400 µg/ml olarak belirlenirken bizim tez çalışmamızda ise sırasıyla, 39.06, 78.13 ve 625 µg/ml olarak belirlenmiştir. *P. furfuracea* liken türünün MİK değerleri etil asetat özütü için sırasıyla, 200, 1250 ve ≤ 400 µg/ml olarak belirlenirken bizim tez çalışmamızda ise sırasıyla, 78.13, 78.13, 1250 µg/ml olarak belirlenmiştir. İki çalışma karşılaştırıldığında, aynı liken türü, aynı çözücüler ve aynı mikroorganizmalar kullanılmasına rağmen oldukça farklı sonuçlar alındığı görülmektedir. Mitrovic ve arkadaşları (2014), bakteri türlerinin MİK değerlerini bizim çalışmamıza oranla oldukça yüksek tespit etmiştir. İlginç bir şekilde maya türlerinin MİK değerleri ise bizim çalışmamızda daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Mitrovic vd., 2014: 949).

Agar disk difüzyon yöntemi ile MİK belirleme yöntemini karşılaştırıldığında, inhibisyon zonu oluşturmayan özütlerin MİK değerlerinde, 1250 ppm’lik konsantrasyonda inhibisyon olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra *S. epidermidis*’e karşı uygulanan deneyde, zon çapı gözlenen özütlerden bazılarının (4EA: 7.5 mm, 4H: 7.5mm) MİK değerlerinin, zon çapı gözlenmeyen özütlerin (4M: 0 mm) MİK değerlerine (625 ppm) eşit olduğu görülmektedir. Benzer şekilde *K. pneumoniae* türüne karşı uygulanan deneylerde özütlerin neredeyse tümünün MİK değeri ise 1250 ppm (4H: 625 ppm) olduğu görülmekte ancak agar disk difüzyon yöntemi sonuçlarına bakıldığında 7 ile 8 mm arasında değişen değerler (4H: 7.5 mm) karşımıza çıkmaktadır. MİK yöntemi ile daha hassas ve kantitatif ölçümler yapılabildiği göz önüne alındığında, agar disk difüzyon yönteminin yanıltıcı sonuçlar verebileceği görülmektedir.

Liken özütlerinin antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında, aktivitenin konsantrasyona bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Düşük konsantrasyonda en etkili özüt olan 4EA’nın konsantrasyonu iki katına çıktığında, antioksidan etkisinin % 50’den fazlasını kaybettiği belirlenmiştir. Buna rağmen düşük konsantrasyonlu çözeltisinde antioksidan aktivitesi 0 değerine yakın olan 4M özütünün konsantrasyonu iki katına çıktığında, en yüksek antioksidan aktiviteyi gösteren özüt olduğu belirlenmiştir.

Veriler incelendiğinde, antioksidan aktivitenin antioksidan madde konsantrasyonuna bağlı olduğu ve bu konsantrasyonun ise liken türüne göre farklı olabileceği görülmektedir. Deneyler sonucunda en etkili liken türü, tüm özütlerinin (4H hariç) 10 ve 20 ppm konsantrasyonlarda antioksidan aktivite göstermesi nedeniyle *P. furfuracea* ve en etkili çözücü metanol olarak belirlenmiştir.

Evernia prunastri, *Parmelia sulcata*, *Flavoparmelia caperata*, *Hypogymnia physodes* ve *ladonia foliacea* liken türlerinden elde edilen metanol özütlerinin DPPH giderme aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada, çalışmamıza paralel bir sonuç rapor edilmiş ve *E. prunastri* liken türünün antioksidan kapasitesinin kullanılan tüm likenlerden daha düşük olduğu bildirilmiştir. (Mitrović vd., 2011: 5430)

Tas ve arkadaşları tarafından yürütülen, çalışmamıza benzer bir araştırmada, *P. furfuracea* ve *E. prunastri* liken türlerinden metanol ile elde edilen özütlerin ve standart madde olarak askorbik asitin 5 farklı konsantrasyondaki antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. % DPPH giderme aktiviteleri 12.5 ve 25 ppm’lik konsantrasyonlarda sırasıyla *P. furfuracea* için % 7.2 ve % 64.4, *E. prunastri* için % 11.8 ve % 13.8, standart madde için ise % 92.83 ve % 97.08 olarak belirlenmiştir (Tas vd., 2017: 17). Bizim çalışmamızda ise liken özütleri ve BHT standart maddesinin 10 ve 20 ppm’lik konsantrasyonlarının antioksidan kapasiteleri test edildi. % DPPH giderme aktiviteleri *P. furfuracea* olarak tanımlanan izolat 4 kodlu liken türünün metanol özütü için sırasıyla % 0,20 ve % 12,69 olarak, *E. prunastri* liken türünün metanol özütü için sırasıyla % 0 ve % 0,405 olarak ve BHT standart maddesi için sırasıyla % 45.84 ve % 38.82 olarak belirlendi. Her iki çalışmanın en önemli ortak noktası, kullanılan özütlerin antioksidan kapasitesinin standart maddeden düşük olarak bildirilmesidir.

Aoussar ve arkadaşları, *P. furfuracea* ve *E. prunastri* liken türlerinden metanol, aseton ve diklorometan çözücüleri ile elde ettikleri özütlerinin DPPH giderme aktivitesini araştırmış ve en yüksek antioksidan aktivitenin *P. furfuracea* liken türünün aseton özütü ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Aseton özütlerinin 1000 ppm’lik konsantrasyonları ile test edilen sistemlerde DPPH giderim aktiviteleri, *P. furfuracea* için % 87, *E. prunastri* için % 22 olarak belirlenmiştir. Metanol özütlerinin 1000 ppm’lik konsantrasyonları ile test edilen sistemlerde DPPH giderim aktiviteleri ise *P. furfuracea* için yaklaşık % 30, *E. prunastri* için yaklaşık %20 olarak belirlenmiştir (Aoussar vd., 2017: 1973).

Tez çalışmamızda ise, metanol özütünün 20 ppm’lik konsantrasyonları ile test edilen sistemlerde DPPH giderim aktiviteleri *P. furfuracea* için yaklaşık % 13 ve *E. prunastri* için yaklaşık % 0.4 olarak belirlenmiştir. İki çalışmada paralel sonuçlar gözlenmiştir, nitekim *P. furfuracea* liken türünün antioksidan aktivitesi, *E. prunastri* liken türüne oranla oldukça yüksektir. Ayrıca Aoussar ve arkadaşlarının kullandığı özüt konsantrasyonu, bizim çalışmalarda kullandığımız özüt konsantrasyonunun 50 katıdır ve özüt konsantrasyonu ile antioksidan aktivite arasında pozitif korelasyon olduğu göz önüne alındığında her iki çalışmanın % DPPH giderme aktivite sonuçlarının da birbirine paralel olduğu görülmektedir.

Çalışmamıza benzer bir başka çalışmada, farklı mevsimlerde toplanan *P. furfuracea* ve *E. prunastri* liken türlerinden aseton ile elde edilen özütlerin, farklı konsantrasyonlardaki DPPH giderme aktivitelerini belirlenmiştir. Yaz mevsiminde toplanan likenlerden elde edilen özütlerin, 50 ppm konsantrasyonlu sistemlerde DPPH giderme aktivitesi her iki liken türü için yaklaşık % 10 olarak belirlenmiştir (Aoussar vd., 2020: 4). Tez deneylerimizin sonuçlarında likenlerin metanol, etil asetat ve hekzan özütlerinin 20 ppm konsantrasyonlu sistemlerinin DPPH giderme aktivitesi *P. furfuracea* için sırasıyla % 13, % 3, % 1 olarak, *E. prunastri* için sırasıyla % 0.4, % 0 ve % 0 olarak belirlenmiştir. Aoussar ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada kullanılan özüt konsantrasyonu çalışmamızda kullanılan özüt konsantrasyonunun 2.5 katı olmasına rağmen *P. furfuracea* liken türünden elde ettiğimiz metanol özütü, daha yüksek antioksidan aktivite (% 13) göstermiştir. Ancak *E. prunastri* liken türü özütleri için tersi bir durum söz konusudur. İki deney karşılaştırıldığında antioksidan özellikli sekonder metabolitlerin ekstraksiyonunda, *P. furfuracea* liken türü için metanol çözücüsünün, *E. prunastri* liken türü için ise aseton çözücüsünün daha verimli olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Literatürde yer alan, liken özütlerinin DPPH giderme kapasitelerinin belirlenmesi çalışmalarındaki ortak sonuç, özütlerin aktivitesinin standart maddenin aktivitesine oranla oldukça düşük çıkmasıdır.

Liken özütlerinin sitotoksik aktiviteleri karşılaştırıldığında, 4M, 4EA, 4H ve EH özütlerinin sağlıklı hücre hattına sitotoksik etki göstermesine rağmen meme kanseri hücre hatlarına sitotoksik etki göstermediği görülmektedir. Sonuç olarak, bu özütlerin antikanser aktivitelerinin olmadığı söylenebilir. Sağlıklı hücre hattındaki IC₅₀ değeri 276.6 µg/ml olmasına rağmen MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatlarındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 241.5 µg/ml ve 75.16 µg/ml olması nedeni ile en yüksek sitotoksik aktiviteyi gösteren özüt EM ve bu özüte en duyarlı hücre hattı ise MDA-MB-231'dir. EEA özütünün MCF-7 hücre hattını inhibe ettiği konsantrasyon (70.73 µg/ml), EM özütünün MDA-MB-231 hücre hattını inhibe ettiği konsantrasyondan (75.16 µg/ml) daha düşük olmasına rağmen EEA özütünün sağlıklı hücre hattını da düşük konsantrasyonda (68.40 µg/ml) inhibe etmesi nedeniyle en yüksek antikanser aktivite EEA özütünde değil EM özütündedir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek sitotoksik aktivite gösteren liken türü *Evernia prunastri*, en etkili çözücü ise metanol olarak belirlenmiştir.

Likenlerin antikanser aktiviteleri ile ilgili araştırmalar günümüzde artmaktadır. Yapılan bir çalışmada *Evernia prunastri* liken türünden elde edilen metanol özütünün, HCT-116 kolon kanseri hücre hattındaki sitotoksik etkisi incelenmiş ve IC₅₀ değeri 303.47 µg/ml olarak rapor edilmiştir (Mitrović vd., 2011: 5437). Yürüttüğümüz çalışmada ise *Evernia prunastri* liken türünden elde edilen metanol, etil asetat ve hekzan özütlerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri ve NIH3T3 sağlıklı hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi incelenmiştir ve IC₅₀ değeri metanol için sırasıyla 241.5, 75.16 ve 276.6 µg/ml, etil asetat için sırasıyla 70.73, 201.8 ve 68.40 µg/ml, hekzan için ise iki kanser hücre hattında >500 µg/ml ve sağlıklı hücre hattında 68.33 µg/ml olarak belirlenmiştir. İki çalışma karşılaştırıldığında en etkili çözücünün, kanser hücredeki etkisi yüksek ancak sağlıklı hücredeki etkisi düşük olduğu için metanol olduğu, metanol özütünün en yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği hücre hattının ise MDA-MB-231 olduğu görülmektedir.

Bir başka çalışmada ise *Hypogymnia physodes* liken türünün aseton özütünün MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarına sitotoksik etkileri incelenmiş ve IC₅₀ değeri sırasıyla 110.4 ve 46.2 µg/ml olarak bildirilmiştir (Studzińska-Sroka vd., 2016: 2483). İki çalışmada kullanılan liken türü ve ekstraksiyonda kullanılan çözücüler farklı ancak kanser hücre hatları aynıdır. Veriler incelendiğinde *Hypogymnia physodes* liken türünden elde edilen aseton özütünün antikanser aktivitesinin, *Pseudevernia furfuracea* ve *Evernia prunastri* liken türlerinden metanol, etil asetat ve hekzan ile elde edilen özütlerin tümünün antikanser aktivitesinden MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları için yüksek olduğu görülmektedir.

Tüm bu çalışmaların ortak yönleri ve farklılıkları göz önüne alındığında likenlerin biyolojik aktivitesinin birçok parametreden etkilendiği görülmektedir. Bu parametrelerden en önemli iki tanesi sekonder metabolitin türünü etkileyeceği için liken türü ve özüt elde edilirken kullanılan çözücüdür. Ancak antimikrobiyal aktivite tayinlerinde kullanılan liken türü ve çözücünün aynı olmasına rağmen farklı sonuçların literatürde yer aldığı görülmektedir. Bunun nedeni ise likenin yetiştiği çevre şartları ve doğadan toplandığı mevsim olabilir. Çünkü bu tür çevresel faktörler de liken sekonder metabolitlerinin türüne ve salgılanma miktarına etki etmektedir (Aoussar vd., 2020: 4).

Likenlerin antimikrobiyal antioksidan ve sitotoksik aktiviteleri, liken türüne, likenin geliştiği çevresel şartlara, likenin yaşına, ekstraksiyonda kullanılan çözücüye, ekstraksiyon yöntemine ve biyolojik aktivitelerin belirlenmesinde kullanılan yöntemlere göre farklılık gösterebilmektedir. Tez çalışması kapsamında yürütülen araştırmalar sonucunda, Bilecik İli Kent Ormanından toplanan liken örnekleri *P. furfuracea* ve *E. prunastri* olarak tanımlandı. Bu likenlerden elde edilen özütlerin antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktiviteleri belirlendi. *P. furfuracea* liken türünün en yüksek antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gösterdiği, *E. prunastri* liken türünün ise en yüksek antikanser aktivite gösterdiği belirlendi.

Literatürde yer alan pek çok çalışmaya paralel bir sonuç olarak, araştırmalarımız sonucunda da liken özütlerinin biyoaktif bileşikler ihtiva ettiği gösterilmiştir. Gelecek çalışmaların, yeni liken türlerinin literatüre kaydedilmesine, sekonder bileşiklerin likenlerden izole edilerek tanımlanmasına, biyolojik aktivitelerinin *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarla belirlenmesine, doğal ve toksik olmayan ilaçların sentezinde kullanılmaya başlanmasına odaklanması önerilmektedir.

KAYNAKÇA

Akılhoğlu, H. G., & Yalçın, E. (2010). Tahıl protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri. *Gıda*, 35(3), 227-233.

Aoussar, N., Manzali, R., Nattah, I., Rhallabi, N., Vasiljevic, P., Bouksaim, M., ... & Mellouki, F. (2017). Chemical composition and antioxidant activity of two lichens species (*Pseudevernia furfuracea* L and *Evernia prunastri* L) collected from Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 8(6), 1968-1976.

Aoussar, N., Rhallabi, N., Mhand, R. A., Manzali, R., Bouksaim, M., Douira, A., & Mellouki, F. (2020). Seasonal variation of antioxidant activity and phenolic content of *Pseudevernia furfuracea*, *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea* from Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(1), 1-6.

Aras, S., Cansaran, D., Türk, A. Ö., Kandemir, I., & Candan, M. (2007). Resolving genetic relationships in manna group of lichens from genus *Aspicilia*. *African Journal of Biotechnology*, 6(9), 1154-1160.

Ari, F., Ulukaya, E., Oran, S., Celikler, S., Ozturk, S., & Ozel, M. Z. (2015). Promising anticancer activity of a lichen, *Parmelia sulcata* Taylor, against breast cancer cell lines and genotoxic effect on human lymphocytes. *Cytotechnology*, 67(3), 531-543.

Asahina, Y. (1933). Lichenologische Notizen (1). *J. Jpn. Bot.*, 9, 64-67.

Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adıgüzel, A., Sahin, F., & Özkan, H. (2006). Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliacea*., *Dermatocarpon miniatum*., *Evernia divaricata*., *Evernia prunastri*., and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical biology*, 44(4), 247-252.

Atalay, F., Odabasoglu, F., Halici, M., Cakir, A., Cadirci, E., Aslan, A., ... & Kazaz, C. (2015). Gastroprotective and Antioxidant Effects of *Lobaria pulmonaria* and Its Metabolite Rhizonyl Alcohol on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer. *Chemistry & biodiversity*, 12(11), 1756-1767.

Basile, A., Rigano, D., Loppi, S., Di Santi, A., Nebbioso, A., Sorbo, S., ... & Altucci, L. (2015). Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 7861-7875.

Behera, B. C., Verma, N., Sonone, A., & Makhija, U. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *Biotechnology letters*, 27(14), 991-995.

Bessadóttir, M., Skúladóttir, E. Á., Gowan, S., Eccles, S., Ómarsdóttir, S., & Ögmundsdóttir, H. M. (2014). Effects of anti-proliferative lichen metabolite, protolichesterinic acid on fatty acid synthase, cell signalling and drug response in breast cancer cells. *Phytomedicine*, 21(12), 1717-1724.

Bézivin, C., Tomasi, S., Lohézic-Le Dévéhat, F., & Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 10(6-7), 499-503.

Bilgin Sökmen, B., Kinalioglu, K., & Aydin, S. (2012). Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea* and *Evernia prunastri* Lichens Collected from Black Sea Region. *Gazi University Journal of Science*, 25(3), 557-565.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

Boustie, J., & Grube, M. (2005). Lichens--a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2), 273.

Boustie, J., Tomasi, S., & Grube, M. (2011). Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 287-307.

Boysen, M., Borja, M., del Moral, C., Salazar, O., & Rubio, V. (1996). Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. *Current Genetics*, 29(2), 174-181.

Bradshaw, M., Grewe, F., Thomas, A., Harrison, C. H., Lindgren, H., Muggia, L., ... & Leavitt, S. D. (2020). Characterizing the ribosomal tandem repeat and its utility as a DNA barcode in lichen-forming fungi. *BMC evolutionary biology*, 20(1), 1-11.

Bridge, P. D., Spooner, B. M., & Roberts, P. J. (2005). The impact of molecular data in fungal systematics. In *Advances in botanical research* (Vol. 42, pp. 33-67). Academic Press.

Bruns, T. D., White, T. J., & Taylor, J. W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and systematics*, 22(1), 525-564.

Büyüktuncel, E. (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17, 93-103.

Cansaran, D., Aras, S., Kandemir, İ., & Halıcı, G. (2006). Phylogenetic relations of *Rhizoplaca* Zopf. from anatolia inferred from ITS sequence data. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(5-6), 405-412.

Cansaran-Duman, D., & Halıcı, M. G. (2012). *Squamarina lentigera* türlerinde usnik asit konsantrasyonunun antimikrobiyal aktivitesi. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 69(3): 127-134

Cardile, V., Graziano, A. C. E., Avola, R., Piovano, M., & Russo, A. (2017). Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid. *Chemico-biological interactions*, 263, 36-45.

Cerbah, M., Souza-Chies, T., Jubier, M. F., Lejeune, B., & Siljak-Yakovlev, S. (1998). Molecular phylogeny of the genus *Hypochaeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 15(3), 345-354.

CLSI M02-A12. (2015). CLSI: Metod for susceptibility testing process. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 35(1), 15-39.

CLSI M07-A9. (2012). CLSI: Method for Broth Dilution Procedures. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 32(2), 16-19.

- Coskun, Z. M., Ersoz, M., Acikgoz, B., Karalti, I., Cobanoglu, G., & Sesal, C.** (2015). Anti-proliferative and apoptotic effects of methanolic extracts from different *Cladonia* species on human breast cancer cells. *Folia biologica*, 61(3), 97.
- Çavdar, C., Sifil, A., & Çamsarı, T.** (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3(4), 92-95.
- Çobanoğlu, G.** (2012). Doğada ve Tıpta Likenler. *Sağlık Çevre Kültürü Dergisi, Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi Süreli Yayını*, 6, 4-7.
- Çobanoğlu, G., Dilsizoğlu, A., Kavuncuoğlu, Z., & Oba, D.** (2004). Eski ve yeni kullanım alanları, bilinmeyen yönleriyle likenler. *Tubitak Bilim ve Teknik Dergisi*, 439, 86-89.
- Çobanoğlu, G., Sesal, C., Gökmen, B., & Çakar, S.** (2010). Evaluation of the antimicrobial properties of some lichens. *South Western Journal of Horticulture*, 1(2), 153-158.
- Çolak, S., Geyikoğlu, F., Aslan, A., & Deniz, G. Y.** (2014). Effects of lichen extracts on haematological parameters of rats with experimental insulin-dependent diabetes mellitus. *Toxicology and industrial health*, 30(10), 878-887.
- De los Ríos, A., Sancho, L. G., Grube, M., Wierzechos, J., & Ascaso, C.** (2005). Endolithic growth of two *Lecidea* lichens in granite from continental Antarctica detected by molecular and microscopy techniques. *New Phytologist*, 165(1), 181-190.
- del Carmen Molina, M., Crespo, A., Blanco, O., Hladun, N., & Hawksworth, D. L.** (2002). Molecular phylogeny and status of *Diploicia* and *Diplotomma*, with observations on *Diploicia subcanescens* and *Diplotomma rivas-martinezii*. *The Lichenologist*, 34(6), 509-519.
- Duman, C. D.** (2008). Likenler ve moleküller biyoloji uygulamaları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 65(1), 43-50.
- Dung, N. T. M.** (2016). Some triterpenoids and steroids from the lichen *Lobaria orientalis*, *lobariaceae*. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 54(2C), 313.
- Duong, T. H., Chavasiri, W., & Boustie, J.** (2015). New meta-depsidones and diphenyl ethers from the lichen *Parmotrema tsavoense* (Krog & Swinscow) Krog & Swinscow, Parmeliaceae. *Tetrahedron*, 71(52), 9684-9691.
- Dülger, B., Gücin, F., Kara, A., & Aslan, A.** (1997). *Usnea florida* (L.) Wigg. likeninin antimikrobiyal aktivitesi. *Turkish J Biology*, 21, 103-108.
- Ebrahim, H. Y., Elsayed, H. E., Mohyeldin, M. M., Akl, M. R., Bhattacharjee, J., Egbert, S., & El Sayed, K. A.** (2016). Norstictic acid inhibits breast cancer cell proliferation, migration, invasion, and in vivo invasive growth through targeting C-Met. *Phytotherapy Research*, 30(4), 557-566.
- Eddie, W. M. M., Shulkina, T., Gaskin, J., Haberle, R. C., & Jansen, R. K.** (2003). Phylogeny of *Campanulaceae* s. str. inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 554-575.
- Elix, J. A., & Stocker-Wörgötter, E.** (2008). Lichen biology. ed. Nash III TH, Cambridge University Press, New York, 104-133.

Esimone, C. O., & Adikwu, M. U. (1999). Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*. *Fitoterapia*, 70(4), 428-431.

Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E., Divakar, P. K., Crespo, A., & Gómez-Serranillos, M. P. (2016). Evaluation of the antioxidant capacities and cytotoxic effects of ten Parmeliaceae lichen species. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11.

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118.

Gasparyan, A., Sipman, H. J., & Luecking, R. (2017). *Ramalina europaea* and *R. labiosorediata*, two new species of the *R. pollinaria* group (Ascomycota: Ramalinaceae), and new typifications for *Lichen pollinarius* and *L. squarrosus*. *The Lichenologist*, 49(4), 301-319.

Goffinet, B., & Bayer, R. J. (1997). Characterization of mycobionts of photomorph pairs in the Peltigerineae (lichenized ascomycetes) based on internal transcribed spacer sequences of the nuclear ribosomal DNA. *Fungal Genetics and Biology*, 21(2), 228-237.

Gonçalves, J. P., Martins, M. C. B., Buril, M. D. L. L., Aguiar, J. D. S., Da Silva, T. G., dos Santos Souza, T. G., ... & Da Silva, N. H. (2018). Antineoplastic activity and genotoxicity of organic extracts and barbatic acid isolated from the lichen *Cladonia salzmannii* Nyl. *International Archives of Medicine*, 11(53), 1-12.

Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., & Durmaz, Y. (2006). Algal Antioksidanlar. *Su Ürünleri Dergisi*, 23(1), 85-89.

Grube, M., & Arup, U. (2001). Molecular and morphological evolution in the Physciaceae (Lecanorales, lichenized Ascomycotina), with special emphasis on the genus *Rinodina*. *The Lichenologist*, 33(1), 63-72.

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 polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine*, 13(7), 515-521.

Gutschner, T., & Diederichs, S. (2012). The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA biology*, 9(6), 703-719.

Gül, Ü. D., İrdem, E., Yavuz, Ş. A., & İlhan, S. (2020). Determination of dye biosorption capacity of lichens and reusability of wastes as antimicrobial agents. *The Journal of The Textile Institute*, 1-9.

Güvenç, A., Akkol, E. K., Süntar, İ., Keleş, H., Yıldız, S., & Çalış, İ. (2012). Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds. *Journal of ethnopharmacology*, 144(3), 726-734.

Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food control*, 46, 412-429.

Halama, P., & Van Haluwin, C. (2004). Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl*, 49(1), 95-107.

Han, L., F., Zhang, Y. Y., & Guo, S., Y. (2013). *Peltigera wulingensis*, a new lichen (Ascomycota) from north China. *The Lichenologist*, 45(3), 329.

Huneck, S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 86(12), 559-570.

Ingólfssdóttir, K. (2002). Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7), 729-736.

Ingólfssdóttir, K., Chung, G. A., Skúlason, V. G., Gissurarson, S. R., & Vilhelmsdóttir, M. (1998). Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 141-144.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (Eds.). (2012). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press, 1-481

Ivanova, N. V., DePRIEST, P. T., Bobrova, V. K., & Troitsky, A. V. (1999). Phylogenetic analysis of the lichen family Umbilicariaceae based on nuclear ITS1 and ITS2 rDNA sequences. *The Lichenologist*, 31(5), 477-489.

Kambar, Y., Vivek, M. N., Manasa, M., Kekuda, T. P., & Onkarappa, R. (2014). Antimicrobial activity of *Ramalina conduplicans* vain.(Ramalinaceae). *Science, Technology and Arts Research Journal*, 3(3), 57-62.

Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1 (1), 65-76.

Karamanoğlu, K. (1971). Türkiye'nin önemli liken türleri. *Ankara Ecz. Fak. Mec*, 1(53), 53-75.

Kinoshita, K., Togawa, T., Hiraishi, A., Nakajima, Y., Koyama, K., Narui, T., ... & Takahashi, K. (2010). Antioxidant activity of red pigments from the lichens *Lethariella sernanderi*, *L. cashmeriana*, and *L. sinensis*. *Journal of natural medicines*, 64(1), 85.

Kistenich, S., Halvorsen, R., Schröder-Nielsen, A., Thorbek, L., Timdal, E., & Bendiksby, M. (2019). DNA sequencing historical lichen specimens. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7(5), 1-20.

Koca, N., & Karadeniz, F. (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16, 32-37.

Koparal, A. T., Ulus, G., Zeytinoğlu, M., Tay, T., & Türk, A. Ö. (2010). Angiogenesis inhibition by a lichen compound olivetoric acid. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 24(5), 754-758.

Kosanić, M., Manojlović, N., Janković, S., Stanojković, T., & Ranković, B. (2013). *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuracea* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 112-118.

Kranner, I., Beckett, R., & Varma, A. (Eds.). (2012). *Protocols in lichenology: culturing, biochemistry, ecophysiology and use in biomonitoring*. Springer Science & Business Media.

- Kryukov, V. Y., Martemyanov, V. V., Polovinka, M. P., Luzina, O. A., Dubovsky, I. M., Serebrov, V. V., ... & Boyarishcheva, E. A.** (2008). Usnic acid is a promising synergist for biopreparations based on entomopathogenic microorganisms. In *Doklady Biological Sciences* (Vol. 423, No. 1, p. 416). Springer Nature BV.
- Kuhnlein, H. V., & Receveur, O.** (1996). Dietary change and traditional food systems of indigenous peoples. *Annual review of nutrition*, 16(1), 417-442.
- Kumar, S. P., Kekuda, T. P., Vinayaka, K. S., & Sudharshan, S. J.** (2009). Anthelmintic and antioxidant efficacy of two macrolichens of Ramalinaceae. *Pharmacognosy Journal*, 1(4), 238-242.
- Lee, S. B., & Taylor, J. W.** (1992). Phylogeny of five fungus-like protist Phytophthora species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and evolution*, 9(4), 636-653.
- Lindblom, L., & Ekman, S.** (2005). Molecular evidence supports the distinction between *Xanthoria parietina* and *X. aureola* (Teloschistaceae, lichenized Ascomycota). *Mycological Research*, 109(2), 187-199.
- Loppi, S., Frati, L., Paoli, L., Bigagli, V., Rossetti, C., Bruscoli, C., & Corsini, A.** (2004). Biodiversity of epiphytic lichens and heavy metal contents of *Flavoparmelia caperata* thalli as indicators of temporal variations of air pollution in the town of Montecatini Terme (central Italy). *Science of the Total Environment*, 326(1-3), 113-122.
- Luzina, O. A., & Salakhutdinov, N. F.** (2018). Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000–2017). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(6), 477-491.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P.** (2012). Brock biology of microorganisms 13th edn.
- Malhotra, S., Subban, R. A. V. I., & Singh, A.** (2008). Lichens-role in traditional medicine and drug discovery. *The Internet Journal of Alternative Medicine*, 5(2), 1-5.
- Manojlović, N. T., Rančić, A. B., Décor, R., Vasiljević, P., & Tomović, J.** (2020). Determination of chemical composition and antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of lichens *Parmelia conspersa* and *Parmelia perlata*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-11.
- Manojlovic, N. T., Vasiljevic, P. J., Maskovic, P. Z., Juskovic, M., & Bogdanovic-Dusanovic, G.** (2012). Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 1-9.
- Manojlović, N., Ranković, B., Kosanić, M., Vasiljević, P., & Stanojković, T.** (2012). Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*, 19(13), 1166-1172.
- Martins, M. C. B., Rocha, T. A., Silva, T. D. S., Cavalcanti-Neto, M. P., da Silva Santos, N. P., da Silva, T. G., ... & da Silva, N. H.** (2016). In vitro and In vivo antineoplastic activity of barbatic acid. *International Archives of Medicine*, 9(63), 1-9.

- Miadlikowska, J., Schoch, C. L., Kageyama, S. A., Molnar, K., Lutzoni, F., & McCune, B.** (2011). *Hypogymnia* phylogeny, including Cavernularia, reveals biogeographic structure. *The Bryologist*, 114(2), 392-400.
- Miao, V., Coëffet-LeGal, M. F., Brown, D., Sinnemann, S., Donaldson, G., & Davies, J.** (2001). Genetic approaches to harvesting lichen products. *TRENDS in Biotechnology*, 19(9), 349-355.
- Mishra, T., Shukla, S., Meena, S., Singh, R., Pal, M., Upreti, D. K., & Datta, D.** (2017). Isolation and identification of cytotoxic compounds from a fruticose lichen *Roccella montagnei*, and its in silico docking study against CDK-10. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(6), 724-728.
- Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Radulovic, N., Mladenovic, M., Stankovic, M., ... & Comic, L.** (2014). *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. *Excli Journal*, 13, 938-953.
- Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., ... & Marković, S.** (2011). Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International journal of molecular sciences*, 12(8), 5428-5448.
- Mohan, R., Birari, R., Karmase, A., Jagtap, S., & Bhutani, K. K.** (2012). Antioxidant activity of a new phenolic glycoside from *Lagenaria siceraria* Stand. fruits. *Food chemistry*, 132(1), 244-251.
- Molnár, K., & Farkas, E.** (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(3-4), 157-173.
- Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mothana, R. A., & Lindequist, U.** (2005). Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of ethnopharmacology*, 96(1-2), 177-181.
- Muggia, L.** (2009). Lichens as treasure chests of natural products. *Sim News*, 59(3), 85-97.
- Müller, K.** (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1-2), 9-16.
- Nash, T. H. (Ed.).** (1996). *Lichen biology*. Cambridge University Press, 1-477.
- Negi, H. R.** (2003). Lichens: a valuable bioresource for environmental monitoring and sustainable development. *Resonance*, 8(1), 51-58.
- Nguyen, D. M., Do, L. M., Nguyen, V. T., Chavasiri, W., Mortier, J., & Nguyen, P. P.** (2017). Phenolic compounds from the lichen *Lobaria orientalis*. *Journal of natural products*, 80(2), 261-268.
- Nguyen, T. T., Yoon, S., Yang, Y., Lee, H. B., Oh, S., Jeong, M. H., ... & Lee, K. Y.** (2014). Lichen secondary metabolites in *Flavocetraria cucullata* exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. *PloS one*, 9(10), e111575, 1-14.

- Nugraha, A. S., Pratoko, D. K., Damayanti, Y. D., Lestari, N. D., Laksono, T. A., Addy, H. S., ... & Wangchuk, P.** (2019). Antibacterial and anticancer activities of nine lichens of Indonesian Java island. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 9(1), 39-46.
- Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Bayir, Y., & Halici, M.** (2005). Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, 76(2), 216-219.
- Oksanen, I.** (2006). Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(4), 723-734.
- Osmanağaoğlu, Ö., Yıldız, A., & Saçılık, S.** (2000). Türkiye'deki farklı bölgelerden izole edilen likenlerin antimikrobiyal aktiviteleri. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 30, 17-19.
- Özenoğlu, S., Aydoğdu, G., Dinçsoy, A. B., Taghidizaj, A. F., Derici, K., Yılmaz, E., ... & Cansaran-Duman, D.** (2013). Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 70(4), 215-26.
- Öztürk, A., Yılmaz, S. Ö., & Altun, Z. B.** (2013). Şavşat (Artvin) Yöresinin Bazı Liken Türleri ve Likenlerin Ekonomik Değerleri. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 18(1-2), 17-24.
- Öztürk, Ş.** (1995). Yüzyılların Çevrecisi Likenler. *Bilim ve teknik*, 328, 74-79.
- Özyiğitoğlu, G. Ç., Açıkgöz, B., & Sesal, C.** (2017). Lichen secondary metabolites: Synthesis pathways and biological activities. *Acta Biologica Turcica*, 29(4), 150-163.
- Paluszczak, J., Kleszcz, R., Studzińska-Sroka, E., & Krajka-Kuźniak, V.** (2018). Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 441(1-2), 109-124.
- Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, J. S., Hong, S. G., Shin, H. W., & Yim, J. H.** (2008a). Antibacterial potential of Antarctic lichens against human pathogenic Gram-positive bacteria. *Phytotherapy research*, 22(9), 1269-1271.
- Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, J. S., Hong, S. G., Shin, H. W., & Yim, J. H.** (2008b). Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). *Polar Biology*, 31(5), 605-608.
- Perico-Franco, L. S., Soriano-García, M., Cerbón, M. A., González-Sánchez, I., & Valencia-Islas, N.** (2015). Secondary metabolites and cytotoxic potential of *Lobariella pallida* and *Stereocaulon strictum* var. *compressum*, two lichens from Colombian páramo region. *UK J Pharm Biosci*, 3(4), 31-38.
- Pol, C. S., Savale, S. A., Khare, R., Verma, N., & Behera, B. C.** (2017). Antioxidative, cardioprotective, and anticancer potential of two lichenized fungi, *Everniastrum cirrhatum* and *Parmotrema reticulatum*, from Western Ghats of India. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 23(2), 142-156.
- Ranković, B., Mišić, M., & Sukdolak, S.** (2007). Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Lasallia pustulata*, *Parmelia sulcata*, *Umbilicaria crustulosa*, and *Umbilicaria cylindrica*. *Microbiology*, 76(6), 723-727.

- Ranković, B., Mišić, M., & Sukdolak, S.** (2008). The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World journal of microbiology and biotechnology*, 24(7), 1239-1242.
- Ranković, B., Mišić, 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.
- Rolstad, J., Ekman, S., Andersen, H. L., & Rolstad, E.** (2013). Genetic variation and reproductive mode in two epiphytic lichens of conservation concern: a transatlantic study of *Evernia divaricata* and *Usnea longissima*. *Botany*, 91(2), 69-81.
- Schneider, A.** (1898). *A Guide to the Study of Lichens*. Knight and Millet, 1-235.
- Sesal, C., Çobanoğlu, G., Karaltı, İ., & Açıkgöz, B.** (2016). In vitro antimicrobial potentials of four Ramalina lichen species from Turkey. *Current Research in Environmental and Applied Mycology*, 6(3), 202-209.
- Seyhan, S. A.** (2019). DPPH Antioksidan Analizinin Yeniden Değerlendirilmesi. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 9(2), 125-135.
- Shrestha, G., & Clair, L. L. S.** (2013). Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry reviews*, 12(1), 229-244.
- Shukla, V., Joshi, G. P., & Rawat, M. S. M.** (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry reviews*, 9(2), 303-314.
- Singh, N., Nambiar, D., Kale, R. K., & Singh, R. P.** (2013). Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. *Nutrition and cancer*, 65(sup1), 36-43.
- Stanly, C., Hag Ali, D. M., Keng, C. L., Boey, P. L., & Bhatt, A.** (2011). Comparative evaluation of antioxidant activity and total phenolic content of selected lichen species from Malaysia. *J Pharm Res*, 4(8), 2824-2827.
- Stocker-Wörgötter, E.** (2008). Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural product reports*, 25(1), 188-200.
- Stojanović, G., Zlatanović, I., Lazarević, N., Mitić, V., Đorđević, A., Stanković, M., & Zlatković, B.** (2018). Contribution to the knowledge of the chemical composition, biological activities and activity concentration of ^{40}K , ^{137}Cs , ^{226}Ra and ^{232}Th of the lichen *Evernia prunastri*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 83(11), 1209-1221.
- Studzińska-Sroka, E., Piotrowska, H., Kucińska, M., Murias, M., & Bylka, W.** (2016). Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from *Hypogymnia physodes* against breast cancer cell lines. *Pharmaceutical biology*, 54(11), 2480-2485.
- Sundararaj, J. P., Kuppuraj, S., Ganesan, A., Ponnusamy, P., & Nayaka, S.** (2015). In vitro assessment of antioxidant and antimicrobial activities of different solvent extracts from lichen *Ramalina nervulosa*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(2015), 200-204.

- Şahin, S., Oran, S., Şahintürk, P., Demir, C., & Öztürk, Ş.** (2015). Ramalina Lichens and Their Major Metabolites as Possible Natural Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Journal of Food Biochemistry*, 39(4), 471-477.
- Şekerli, M., Kılıç, N., & Duman, D. C.** (2017). Liken metabolitlerinin antikanser aktivite etkisinin moleküler düzeydeki mekanizmaları. *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 74(1), 95-102.
- Şenol, Z. M., Gül, Ü. D., & Şimşek, S.** (2021). Bioremoval of Safranin O dye by the identified lichen species called *Evernia prunastri* biomass; biosorption optimization, isotherms, kinetics, and thermodynamics. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-11.
- Tanker, N., Koyuncu, M., & Coşkun, M.** (2007). Solanaceae. *Farmasötik Botanik, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara*, 296-301.
- Tas, I., Yildirim, A. B., Ozyigitoglu, G. C., Yavuz, M. Z., & Turker, A. U.** (2017). Determination of biological activities (antibacterial, antioxidant and antiproliferative) and metabolite analysis of some lichen species from Turkey. *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci.(EJBPS)*, 4, 13-20.
- Tatipamula, V. B., Polimati, H., GOPAIAH, K., Babu, A. K., Vantaku, S., Rao, P. R., & Killari, K. N.** (2020). Bioactive Metabolites from Manglicolous Lichen *Ramalina leiodea* (Nyl.) Nyl. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82(2), 379-384.
- Triggiani, D., Ceccarelli, D., Tiezzi, A., Pisani, T., Munzi, S., Gaggi, C., & Loppi, S.** (2009). Antiproliferative activity of lichen extracts on murine myeloma cells. *Biologia*, 64(1), 59-62.
- v. Handel-Mazzetti, H. F.** (1909). Ergebnisse einer botanischen Reise in das Pontische Randgebirge im Sandschak Trapezunt, unternommen im Jahre 1907 im Auftrage des Naturwissenschaftlichen Orientvereines in Wien. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 23(häft 1/2), 6-212.
- Valle Jr, D. L., Andrade, J. I., Puzon, J. J. M., Cabrera, E. C., & Rivera, W. L.** (2015). Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 5(7), 532-540.
- Vartia, K. O.** (1973). Antibiotics in lichens. In *The lichens* (pp. 547-561). Academic Press.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Xiang, Y., Jing, Z., Haixia, W., Ruitao, Y., Huaixiu, W., Zenggen, L., ... & Yanduo, T.** (2017). Antiproliferative activity of phenylpropanoids isolated from *Lagotis brevitalia* maxim. *Phytotherapy Research*, 31(10), 1509-1520.
- Yumrutaş, Ö., Güven, C., Yusuf, Ö. Z. A. Y., Albeniz, İ., Ahbab, M. A., Bozgeyik, İ., ... & Şener, L. T.** (2017). Association between anti-proliferative activity of *Evernia prunastri* with the cellular apoptotic pathway. *Cumhuriyet Science Journal*, 38(3), 516-524.
- Yurdacan, B., Egeli, U., Eskiler, G. G., Eryilmaz, I. E., Cecener, G., & Tunca, B.** (2019). The role of usnic acid-induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma. *Human & experimental toxicology*, 38(2), 201-215.

Zeybek, U., & John, V. (1992). Likenler, kimyasal bileşikleri ve tıbbi kullanımları. *Pharmacia- JTPA*, 32(1), 37-48

Zrnzevic, I., Stankovic, M., Jovanovic, V. S., Mitic, V., Dordevic, A., Zlatanovic, I., & Stojanovic, G. (2017). *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl. acetone extract: HPLC analysis, genotoxicity, cholinesterase, antioxidant and antibacterial activity. *EXCLI journal*, 16, 679.



EKLER

EK-1: Besiyeri Ortamları ve Hazırlanışı

Mueller-Hinton Agar Hazırlanışı

Mueller-Hinton Agar (MHA)	
Bileşen Adı	Miktar
Meat infusion	2 g/L
Kazein hidrolizat	17.5 g/L
Nişasta	1.5 g/L
Agar	13 g/L

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri 7.2-7.5'e ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dakika otoklavlandı.

Mueller-Hinton Broth Hazırlanışı

Mueller-Hinton Broth (MHB)	
Bileşen Adı	Miktar
Meat infusion	2 g/L
Kazein hidrolizat	17.5 g/L
Nişasta	1.5 g/L

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri 7.2-7.5'e ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dakika otoklavlandı.

Sabouraud %2 Dekstroz Agar Hazırlanışı

Sabouraud %2 Dekstroz Agar (SDA)	
Bileşen Adı	Miktar
Glukoz	20 g/L
Pepton	10 g/L
Agar	17 g/L

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri 7.2-7.5'e ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına agar ve distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dakika otoklavlandı.

Sabouraud %2 Dekstroz Broth Hazırlanışı

Sabouraud %2 Dekstroz Broth (SDB)	
Bileşen Adı	Miktar
Glukoz	16 g/L
Pepton	8 g/L

Ortamın Hazırlanışı: İçeriği oluşturan her bir bileşen hassas terazi ile tartılarak cam şişelere aktarıldı ve üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü. 0,1 M NaOH veya HCl ile pH değeri 7.2-7.5'e ayarlandıktan sonra besiyeri ortamına distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C 1 ATM basınçta 15 dakika otoklavlandı.