



**TOKAT BÖLGESİNDE YETİŞEN *USNEA FLİPENDULA* VE *EVERNİA PRUNASTRİ* LİKEN ÖRNEKLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

CAN MENEKŞEOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
PROF.DR. İSA KARAMAN**

2021

**Her hakkı saklıdır
T.C.**

**TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TOKAT BÖLGESİNDE YETİŞEN *USNEA FLİPENDULA* VE *EVERNİA
PRUNASTRİ* LİKEN ÖRNEKLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

CAN MENEKŞEOĞLU

TOKAT
Eylül - 2021

Her hakkı saklıdır

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

CAN MENEKŞEOĞLU

1 Eylül 2021

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TOKAT BÖLGESİNDE YETİŞEN *USNEA FLİPENDULA* VE *EVERNİA PRUNASTRİ* LİKEN ÖRNEKLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

CAN MENEKŞEOĞLU

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM
ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI:PROF.DR.İSA KARAMAN)

Yapılan bu çalışmada *Usnea flipendula* ve *Evernia prunastri* liken örneklerinin aseton, etanol, metanol ve Tris-EDTA tampon çözeltisi kullanılarak ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlar üzerinde antifungal etkileri Kirby-Bauer agar disk difüzyon yöntemiyle çalışılırken, antibakteriyel etkileri agar disk difüzyon yöntemi ve broth makro dilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır. Aynı zamanda antimikrobiyal çalışmalarına ek olarak Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu yöntemiyle tespit edilirken, antioksidan indirgenme kapasitesi DPPH yöntemi ile tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre ekstraktların antibakteriyel etkileri, çalışılan bakteri türleri arasında *Usnea flipendula* ve *Evernia prunastri* liken türlerinin aseton ekstraktının, test edilen ekstraktlara göre daha yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Antifungal çalışmasında ise çalışılan fungus türleri arasında *Evernia prunastri* liken türünün etanol ekstraktının, test edilen ekstraktlara göre daha geniş bir antifungal etki spektrumuna sahip olduğu belirlenmiştir. Her iki denemede de Tampon çözelti ile elde edilen ekstraktlarda antimikrobiyal aktiviteye rastlanmamıştır. Toplam fenolik madde tayininde *Evernia prunastri* liken türünün toplam fenolik madde içeriği en yüksek 14,24 (mg GAE/g ekstrakt) etanol ekstraktı olarak belirlenirken, antioksidan indirgenme kapasitesinin IC₅₀ değeri 0,661 (mg/ml) ile metanol ekstraktı olarak tespit edilmiştir.

2020,75 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Liken, Ekstraksiyon, Antimikrobiyal Aktivite, Antioksidan Aktivite,

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM *USNEA FLIPENDULA* AND *EVERNIA PRUNASTRI* GROWING IN TOKAT REGION

CAN MENEKŞEOĞLU

**TOKAT GAZİOSMANPASA UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES**

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

(SUPERVISOR:) PROF. DR. İSA KARAMAN

In this study, *Usnea filipendula* and *Evernia prunastri* lichen samples were extracted using acetone, ethanol, methanol and Tris-EDTA buffer solution. Antifungal effects on the obtained extracts were studied by the Kirby-Bauer agar disc diffusion method. antibacterial effects were studied by agar disc diffusion method and broth macro dilution method. At the same time, in addition to antimicrobial studies, total phenolic substance determination was determined by Folin-Ciocalteu method, while antioxidant reduction capacity was determined by DPPH method.

According to the results of the study, it was determined that the antibacterial effects of the extracts, among the bacterial species studied, the acetone extract of *Usnea filipendula* and *Evernia prunastri* lichen species had higher antibacterial activity than the tested extracts. In the antifungal study, it was determined that the ethanol extract of *Evernia prunastri* lichen species among the studied fungi species had a wider antifungal effect spectrum than the tested extracts. No antimicrobial activity was found in the extracts obtained with the buffer solution in both trials. In the determination of total phenolic substances, the highest total phenolic content of *Evernia prunastri* lichen species was determined as 14.24 (mg GAE/g extract) ethanol extract, while the IC₅₀ value of antioxidant reduction capacity was determined as methanol extract with 0.661 (mg/ml).

2020,75 PAGES

KEYWORDS: Lichen, Extraction, Antimicrobial activity, Antioxidan Activity,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, ilgi ve alakasını asla esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana çok şey katan, tüm laboratuvar denemelerimde desteğini her zaman hissettiğim sayın danışman hocam Prof.Dr. İsa KARAMAN'a ve Antioksidan aktivite çalışmalarında desteğini asla esirgemeyen Dr.Öğr.Üyesi İlhami KARATAŞ, Dr.Öğr.Üyesi Zeynep AKŞİT, Dr.Öğr.Üyesi Hüseyin AKŞİT hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitim sürecinde beraber yol aldığımız, her türlü zorlukta desteğini her zaman hissettiğim ev arkadaşım Ali İRTEN'e, laboratuvar çalışmalarında her türlü yardımı sağlayan ekip arkadaşım Begüm Buse ÜZER'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yardımlarını asla esirgemeyen, Tokat Gaziosmanpaşa üniversitesi biyomühendislik bölümü hocalarıma ve Tübitak Marmara araştırma merkezi Gen mühendisliği ve biyoteknoloji enstitüsü güler yüzlü çalışanlarına ve İlgi ve alakasını asla esirgemeyen araştırmacılarından Hasan Ümit ÖZTÜRK hocama sonsuz şükranlarımı sunarak, minnetlerimi borç bilirim.

Son olarak, lisans eğitimimiz boyunca okulun sadece teknik bilginin kazanıldığı yerin olmadığı, öğrencisine her zaman aileden bir bireymiş gibi davrandığı, hata yapma potansiyelimizin yüksek olduğu genç yaşlarımızda bize yol gösterici olan Gümüşhane Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümü akademisyenlerine bu günlere gelmemdeki emeklerinden dolayı en içten minnetlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi her zaman yanımda olan, beni bu günlere gelmemdeki en büyük emeği sarf eden ve hakkını asla ödeyemeyeceğim babam İsmail MENEKŞEOĞLU, annem Kamuran MENEKŞEOĞLU ve Ablam Elif MENEKŞEOĞLU DEMİRAL'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

CAN MENEKŞEOĞLU

1 Eylül 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Likenler ve Tarihçesi.....	2
2.2 Likenlerin Yapısı.....	3
2.3. Likenlerin Sınıflandırılması.....	4
2.3.1. Tallus yapılarına göre likenler	4
2.4) Likenlerde Üreme.....	8
2.5 Liken Metabolitleri.....	10
2.6) Likenlerin Kullanım Alanları.....	12
2.7) Likenlerin Antioksidan Aktivitesi.....	12
2.8) Antibiyotiklerin Keşfi ve Potansiyel Durumu.....	13
2.9 Antibiyotiklerin Çalışma Mekanizması	14
2.9.1 Hücre duvarını hedef alan antibiyotikler	15

2.9.2 Protein sentezinin inhibe edilmesi	17
2.9.3 DNA replikasyonun inhibisyonu	19
2.10 Antibiyotik Test Yöntemleri	20
2.10.1 Broth makro dilüsyon testi	20
2.10.2 Broth mikrodilüsyon testi	21
2.10.3 Antimikrobiyal gradyan yöntemi	21
2.10.4 Agar disk difüzyon metodu	22
2.10.5 Otomatik sistemler ile antimikrobiyal test yöntemleri.....	22
2.11) Likenlerin Antimikrobiyal Özellikleri.....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1 Materyal.....	26
3.1.1. Çalışmada kullanılan liken türleri	26
3.1.2 Çalışmada kullanılan bakteri suşları	26
3.1.3 Çalışmada kullanılan fungus türleri	26
3.1.4 Kullanılan kimyasal maddeler.....	27
3.1.5 Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri	27
3.2 Yöntem.....	29
3.2.1 Likenlerin toplanması.....	29
3.2.2 Likenlerin temizlenmesi ve sıvı nitrojenle muamele edilmesi	30
3.2.3 Liken örneklerinin organik solventlerle ekstraksiyonu	30
3.2.4 Tampon çözelti ile ekstraksiyon	31
3.2.6 Antibakteriyel agar disk difüzyon testi.....	31
3.2.7 Antifungal agar disk difüzyon yöntemi	31
3.2.9 Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin tespiti	32

3.2.10 Liken ekstelerinden toplam fenolik madde tayini	32
3.2.11 DPPH yöntemi ile antioksidan kapasitesinin belirlenmesi	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1 Bulgular.....	35
4.1.1 Antibakteriyel aktivite.....	35
4.1.2 Agar disk difüzyon yöntemiyle antibakteriyel aktivite	35
4.1.3 Minimal inhibisyon değeri (MİK)	38
4.1.4 Likenlerin antifungal özellikleri	53
4.1.5 Toplam fenolik madde tayini.....	60
4.1.6 Antioksidan aktivite.....	61
4.2 Tartışma... ..	63
5.SONUÇ.....	66
6.KAYNAKLAR	68
7. ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Açıklama

°C

Santigrat Derece

g

Gram

L

Litre

µL

Mikro litre

m

Metre

mm

Milimetre

ml

Mililitre

RPM

Revolution per minute (Dakikadaki devir sayısı)

UV

Ultra Viole

ROS

Reaktif oksijen türleri

OM

Dış membran

AG

Aminoglikozit

FK

Florokinolon

TLC

İnce Tabaka Kromatografisi

HPLC

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

PBP

Penisilin bağlayıcı proteinler

L-1

Usnea flipendula

L-2

Evernia prunastri

AS

Aseton

ET

Etanol

MET

Metanol

IPM

İmipenem

CN	Gentamisin
S	Streptomisin
NS	Nistatin
GA	Gallik asit
GAE	Gallik asit eşdeğer numune
L-1-BUF	<i>Usnea flipendulanın</i> tampon çözelti ile ekstraktı
L-2-BUF	<i>Evernia prunastri</i> 'nin tampon çözelti ile ekstraktı
HPB-35	<i>Bacillus cereus</i> (DSMZ:43112)
HPB-41	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC:7)
HPB-71	<i>Pseudomonasaeruginosa</i> (ATCC:29133728)
HPB-96	<i>Acinetobacter baumannii</i>
HPB-125	<i>Salmonella enteritidis</i>
HPB-132	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC:29212)
HPB-137	<i>Eschericiha coli</i> (ATCC:25922)
MİK	Minimal inhibisyon konsantrasyonu
w/w	Ağırlık/hacim
v/v	Hacim/hacim
%RSA	Yüzde radikal süpürme aktivitesi
IC ₅₀	maddenin %50 sini inhibe eden maximum inhibisyon konsantrasyonu

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Likenlerde bulunan homomerik ve heteromerik tallus tipleri	4
Şekil 2.2 Yaprak likeninin şematik kesiti:	4
Şekil 2.3 <i>Peltigera praetextata</i> 'ya ait alt korteks ve rizin yapısını gösteren herbaryum örneği fotoğrafı	6
Şekil 2.4. <i>Evernia prunastri</i> 'ye ait mikroskop görüntüsü kesiti:	8
Şekil 2.5 <i>Evernia prunastri</i> tallusu	9
Şekil 2.6 <i>Usnea</i> spp. cinsine ait fruktifikasyon organları:	10
Şekil 2.9.2 Protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerin etki mekanizması illüstrasyonu	19
Şekil 3.2.1 <i>Usnea flipendula</i> 'nın ağaç üzerindeki görüntüsü	29
Şekil 3.2.2 <i>Evernia prunastri</i> nin ağaç üzerindeki görüntüsü	29
Şekil 3.2.3 Liken örneklerinin etüv içerisinde kurutulması	30
Şekil 4.1.1 HPB:35 <i>Bacillus cereus</i> 'a ait inhibisyon çap sonuçları	47
Şekil 4.1.2 HPB-41: <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC:7) ait inhibisyon çap sonuçları	47
Şekil 4.1.3: HPB-71 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC: 29133728) ait inhibisyon çap sonuçları:	48
Şekil 4.1.4 HPB-96 <i>Acinetobacter baumannii</i> ait inhibisyon çap sonuçları	48
Tablo 4.1.5 HPB-125: <i>Salmonella enteritidis</i> ait inhibisyon çapı ve MİC değerleri	49
Şekil 4.1.6 HPB-130 <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC:25923) ait inhibisyon çap sonuçları	49
Şekil 4.1.7 HPB-132 <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC:29212) ait inhibisyon çap sonuçları	50
Şekil 4.1.8 HPB-137 <i>Escherichia coli</i> (ATCC: 25922) ait inhibisyon çap sonuçları	50

Şekil 4.1.9 HPB:35 <i>Bacillus cereus</i> a ait broth makro dilüsyon görüntüsü	51
Şekil 4.1.10 HPB-132 <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC:25923) ait broth makro dilüsyon görüntüsü	52
Şekil 4.1.11 A) <i>Phoma tracheiphila</i> B) <i>Venturia inaequalis</i> (Elma kara lekesi) ait inhibisyon zonları	55
Şekil 4.1.12 A) <i>Fusarium oxysporum</i> B) <i>Didymella lycopersici</i> (domates kanseri) ait inhibisyon zonları	56
Şekil 4.1.13 A) <i>Colletotrichum coccodes</i> B) <i>Aspergillus niger</i> ait inhibisyon zonları	57
Şekil 4.1.14 Liken ekstraktlarının <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> üzerindeki antifungal aktiviteleri	58
Şekil 4.1.15 Liken ekstraktlarının <i>Alternaria alternata</i> üzerindeki antifungal aktiviteleri	59

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 3.2.10 Folin cioaltea yöntemi ile belirlenen gallik asit (GA) standartları kalibrasyon eğrisi.....	34
Çizelge 4.1.5 Farklı çözücüler ile elde edilen liken ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğinin gallik aside eş değer miktarları.....	60
Çizelge 4.1.6 Liken ekstraktları ve standart antioksidanların IC ₅₀ değerleri....	62

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.9.1 Bazı Oral β -laktam antibiyotikler	16
Tablo 4.1.1 Disk difüzyon yöntemiyle elde edilen bakteriyel inhibisyon çapları	36
Tablo 4.1.2. Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin inhibisyon çapları.....	37
Tablo 4.1.3 HPB:35 <i>Bacillus cereus</i> 'a göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri	39
Tablo 4.1.4 HPB-41: <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC:7) göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri	40
Tablo 4.1.5 HPB-71 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC: 29133728) göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri	41
Tablo 4.1.6 HPB-96 <i>Acinetobacter baumannii</i> göre inhibisyon çap ve MİK değerleri	42
Tablo 4.1.7 HPB-125: <i>Salmonella enteritidis</i> göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri	43
Tablo 4.1.8 HPB-130 <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC:25923) göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri	44
Tablo 4.1.9 HPB-132 <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC:29212) göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri	45
Tablo 4.1.10 HPB-137 <i>Escherichia coli</i> (ATCC: 25922) göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri	46

Tablo 4.1.4 Liken türlerinin ve kullanılan ekstraksiyon çözeltilerinin funguslar üzerindeki inhibisyon değerleri	54
---	----



1.GİRİŞ

Mikroorganizmalar yeryüzünde yaşamın olduğu, hemen her coğrafyada hayatta kalabilmekte, yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Mikroorganizmaların doğadaki rolü oldukça önemlidir. Azot döngüsü başta olmak üzere evrenin var oluşundan beri yaşamın gerçekleşmesi, toprakta bulunan karbon kaynağını ayrıştırılabilmesi ve enerji döngüsünün tamamlanabilmesi için mikroorganizmaların yeri tabiatta kilit rol oynamaktadır (Gruber ve Galloway, 2008). Ayrıca mikroorganizmalar günlük hayatımızda gıda endüstrisinde yararlı olan laktik asit fermantasyonu, asetik asit fermantasyonu gibi fermantasyon tipleri yine mikroorganizmalar aracılığı ile; ekmek, yoğurt, turşu sirke vb. fermentatif gıda ürünlerinin üretilmesinde rol oynamaktadırlar (Leroy ve Vuyst, 2004). Ancak mikroorganizmalar, bu yararlarının yanı sıra insan, hayvan ve bitkiler üzerinde çeşitli hastalıklara da sebebiyet vermektedir. Özellikle gıda kaynaklı enfeksiyonların zaman içinde arttığı görülmektedir. Amerika’da yapılan bir araştırmada her dört Amerikalının birinde, en az bir gıda kaynaklı hastalığa yakalandığı, bu hastalıkların çoğunun bilinen patojenler tarafından gerçekleşmediği bilinmektedir (Tauxe, 2002).

Eski çağlardan beri insanoğlu, hastalıkların sebebinin mikrobiyal kaynaklı olduğu bilinmese de enfeksiyonlarla mücadelede her zaman tabiata ilgi duymuştur. Özellikle açık yaralar, parazitlenme gibi hastalıkların tedavisinde insanoğlu, doğadan topladığı ya da yetiştirdiği bitki özütlerini kullanarak birçok hastalığın tedavisinde ilaç kaynağı olarak kullanmıştır. Geleneksel tıpta bitkilerin ilaç olarak kullanılmasının yanı sıra likenlerden de oldukça fazla yararlanılmıştır. Özellikle açık yaralar, cilt rahatsızlıkları solunum ve sindirim problemleri, obstetrik ve jinekolojik sorunluları tedavi etmede sıklıkla kullanılmıştır (Crawford, 2019).

Gelişen teknoloji ile mikroorganizmaların keşfi ile mikroorganizmaların doğasına giriş yapılmış ve daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Fakat bununla birlikte teknolojinin gelişmesi birçok mikrobiyal kaynaklı hastalıkları da beraberinde getirmiştir. Özellikle 19.yy. dan itibaren endüstrinin gelişmesi ile insan, hayvan ve zirai hastalıkların tedavi edilmesinde ve kontrol altında tutulmasında doğal yöntemlere nazaran, üretimi daha ucuz yollarla gerçekleştirilen sentetik ilaçlara rağbet artmıştır. Sentetik ilaçların, bilinçsizce kullanımı mikrobiyal mücadelede kısa sürede etkili olabilmektedir ancak uzun vadede bilinçsiz kullanımı, geleceği tehdit altında bırakan en büyük problemlerden biri olan mikrobiyal direnci de beraberinden getirerek yeni hastalık etmenlerinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Özer ve ark., 2001).

20.yy’ın başlarında insanoğlu sentetik ilaçların uzun vadeli sonuçlarını fark etmeye başlaması ile “Doğaya dönüş” sloganlarıyla tabiat kaynaklı ilaçlara dönmeye başlamıştır. (Başer, 1990; Wood, 1992) Özellikle bitkiler tarafından yapılan biyolojik aktivite çalışmaları, içerdikleri sekonder metabolitler sayesinde son yıllarda oldukça popüler olmaya başlamıştır. Sekonder metabolitler ile yapılan çalışmalara; antiviral, antifungal, antibakteriyel, antitümör, antipretik, antienflamatuvar, antialerjizik. sitotoksik ve antioksidan çalışmaları örnek verilebilmektedir (Zeybek ve John, 1992).

Araştırmacılar 1928’li yılında Alexander Fleming’in bulmuş olduğu “100 yılın icadı” olarak kabul edilen penisiline alternatif yeni antibiyotik arayışlarına girmiştir. Özellikle antibiyotiğin keşfedilmesi ile antibiyotik etki gösteren metabolitlerin arayışına düşmüş, antimikrobiyal etkileri araştırmaya başlamışlardır. 1944’lü yıllarda likenlerin içerdikleri sekonder metabolitlerinden olan ve sadece likenlere özgü liken asitleri’nin keşfedilmesiyle antimikrobiyal çalışmaları yapılmış ve liken asitlerinin yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği keşfedilmiştir. Aynı zamanda likenlerin içerdikleri sekonder metabolitler sayesinde popülerleşmiş olan antioksidan içerik çalışmaları da hastalıkların tedavisinde kullanılacak ilaç üretiminde araştırma kaynağı olmaktadır (Burkholder ve ark., 1944).

Günümüzde SARS/COVID-19 pandemisi de göz önüne alınarak düşünüldüğünde artık mikrobiyal kaynaklı hastalıklar gelecekte hayatımızın kaçınılmaz bir parçası olacağı öngörülmektedir. Artan hastalıklardan dolayı, küresel çapta araştırmacılar antiviral ve antibiyotik arayışlarına önem vermektedirler.

Likenler ile ilgili yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları ülkemizde ne yazık ki oldukça kısıtlı olmaktadır. Biyotik faktörler ile antimikrobiyal çalışmaların önemini arttırdığı bu günlerde, yapılan bu çalışmada Tokat yöresinden toplanan *Usnea flipendula* ve *Evernia prunastri* liken türlerinden hazırlanan metanol, etanol ve aseton ekstraktları ile tampon çözelti ile hazırlanan su ekstraktının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinin yanı sıra organik solventler ile elde edilen liken ekstraktlarının antioksidan içeriğinin test edilmesi çalışmalarına dayanmaktadır.

Likenler ile yapılacak biyolojik aktivite çalışmalarına katkı sağlaması planlanan bu çalışmada, günümüzde ve gelecekte muhtemel mikrobiyal hastalıkların, özellikle bakteriyel kaynaklı hastalıkların iyileştirilmesinde literatüre ışık tutacağı ön görülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Likenler ve Tarihçesi

Likenler, mantar “mikobiyont” ve bir ya da birden fazla fotosentetik alglerin bir araya gelmesi ile oluşmuş, mantar ve alglerin tek başlarına gösterdikleri dış görünümünden farklı bir görünüm oluşturmaları ile ortaya çıkan fizyolojik birliktelilere denilmektedir.

Likenlerin tarihçesi M.Ö 4. Yüzyıla kadar dayanmaktadır. O çağlarda Yunanlı Theophrastus ilk defa “Liken” terimini kullanmıştır. Fakat Theophrastus’un liken olarak adlandırdığı bu canlılar, günümüzde tanımlanan likenler olmayıp çiğer otları (Hepaticae) dir. Daha sonraki zamanlarda bilim insanları, modern çağın teknolojilerine sahip olamadıklarından likenleri karayosunları ile birçok kez karıştırmışlardır. 19 yy.’la kadar likenler tam olarak tanımlanamamakla birlikte 1803 yılında Eric Acharichus liken terimini açıklamak için “sored”, “izid” ve “sifel” terimlerini, liken üzerinde bulunan kısımları ayırt edici karakterler olarak kullanmıştır. (Hale, 1974) Modern anlamda likenler üzerine ilk sınıflandırmayı da 1810 yılında Yunan asıllı Acharicus yapmıştır (Ahmadjian, 1973). Ama bu çağlarda hala likenlerin simbiyotik birliktelik gösteren mikroorganizmalardan oluştuğu tam olarak keşfedilememiştir. Günümüzde kabul edilen

liken terimini tam olarak açıklayan, alman botanikçisi Schwenderer likenleri “iki ilişkisiz organizmanın birliği sonucu oluşan yapı” olarak tanımlamıştır (Karamanoğlu, 1971).

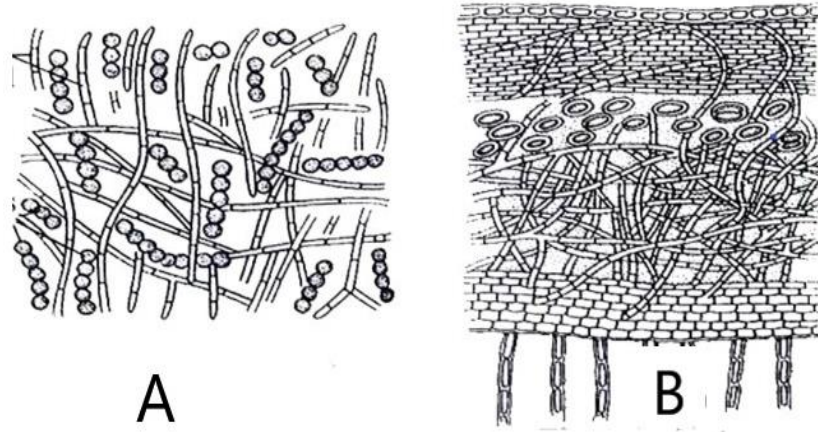
Araştırmacılar liken kavramını tam olarak tanımladıktan sonra likenleri, ilk önce yosun olarak adlandırmış ve bitkiler alemine yerleştirmişlerdir. Daha sonra likenler “lichenes” başlığı altında toplanmıştır (Mazeti ve Bubak, 1909).

2.2 Likenlerin Yapısı

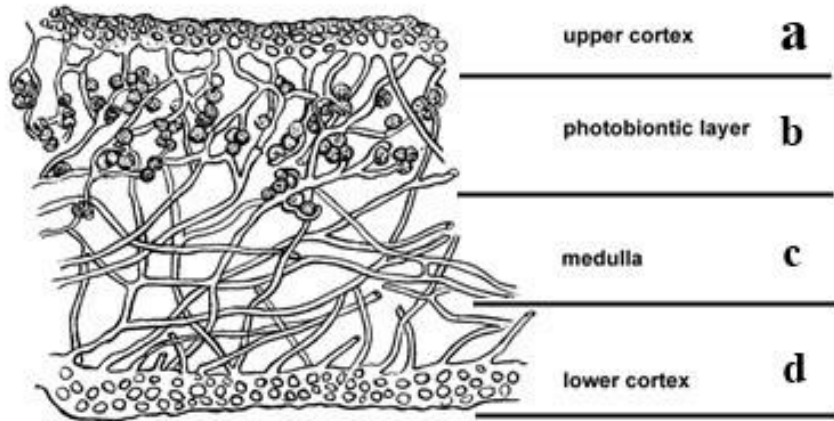
Liken yapıları genellikle bir mantar ve bir algin bir araya gelmesi ile oluşmuştur. Fakat bazı durumlarda, alglerin birden fazla mantar türü ile oluşturduğu yapılar da mevcuttur. Ayrıca algler yerine siyanobakteriler de liken yapısında görülebilmektedir. Liken yapısının “mikobiyont” bölümünü mantarlar oluşturmaktadır. Liken yapısında bulunan mantarlar ise; Ascomycetes, Basidiomycetes ve Deuteromycetes sınıfı üyeler oluşturmaktadır (Brodo, 2001). Liken yapısını oluşturan bir diğer kısım ise; algler bulunan “fotobiyont” bölümdür. Genellikle fotobiyont bölümü *Chlorophyceae* sınıfına ait *Trentepohlia* ve *Trebouxia* cinsleri oluşturmaktadır (Henderson ve Prentice, 1969; Solak, 2016).

Fotobiyont ve mikobiyont yapı incelendiğinde iki farklı bölümün kendi arasında bir simbiyotik ilişkide olduğu görülmektedir. Mikobiyont yani mantarların oluşturduğu bölümde, fotobiyont kısım için büyüme, üreme ve hayatta kalmak için gerekli olan su ve minarallerin iletimini sağlanmaktadır. Alglerin oluşturduğu fotobiyont kısım da ise adından da anlaşılacağı üzere fotosentetik mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Bu bölümde mantar için gerekli karbonhidrat ve vitamin aktarımı sağlanır. Bu yaşam alışkanlıkları ile birbirlerinin fayda sağlaması, likenleri oldukça zor koşullara karşı hayatta kalmasına olanak sağlamaktadır (Nash, 2008; Dayan, 2001).

Likenlerin yapısı daha detaylı incelendiğinde, ilk bakışta mantar hiflerinin olduğu kısımlar görülmektedir. Bu kısma “tallus” adı verilir. Tallus yapısı üzerine alglerin gelmesi ile de bütün olarak liken yapısı oluşur. Ayrıca çevresel olaylara ya da alg ve mantarların simbiyotik oluşumuna bağlı olarak tallus yapısı değişkenlik göstermektedir. Alg ve mantar hücrelerinin tallus bölümünde homojen olarak bulunması durumuna “homeomerik tallus”, mantarların kümeleşme gösterdiği bölgelere ise “heteromerik tallus” denilmektedir. (Şekil 2.1) Tallus yapısına daha yakından bakılacak olursa; tallusun mantar hifleri ile kaplı olduğu bölgeye “medulla”, alglerin bulunduğu bölgeye ise “gonid” denilmektedir. (Şekil 2.2) (Yücel, 2018).



Şekil 2.1 Likenlerde bulunan homomerik ve heteromerik tallus tipleri: A) Homomerik tallus B) Heteromerik tallus (Smith., 1921)



Şekil 2.2 Yaprak likeninin şematik kesiti: a) Dış korteks sıkıca örülmüş mantar hiflerinin dış katmanıdır. b) Fotobiyont kısım alglerden oluşmaktadır. c) Medula bölümünde gevşek yapı oluşturan hifler d) Mantarların sabitleyici hifleri. Mantarın substrata sıkıca bağlandığı bölüm (Smith., 1921)

2.3. Likenlerin Sınıflandırılması

Likenler sınıflandırırken birbirleri arasında ayırt edici olan tallus yapıları, epifitik olarak geliştikleri bölgelere (bitki ve kaya üzeri vb.) ya da tallus içeriğini oluşturan mantarların çeşitlerine göre sınıflandırmak mümkündür.

2.3.1. Tallus yapılarına göre likenler

Likenlerin yapısı incelendiğinde mantar ve alg florasının bulunduğu bölgenin yoğunluğuna göre tallus isminin değiştiği bilinmektedir. Algler ve mantarların tallus içerisinde homojen olarak dağılım göstermesi durumuna “homomerik” liken olarak adlandırılmaktadır. Eğer alg florası tallus yapısının üst bölgesine yakın bir yerde

yoğunluk göstermesi, mantar florasının ise alt bölgeye yakın bir yerde yoğunluk göstermesi durumunda ise “heteromerik” liken denildiği bilinmektedir.

Bir liken tallusunun görünümü, öncelikle mantar florasının oluşturduğu mikobiyont tarafından belirlenmektedir. Alg florasının oluşturduğu fotobiyont bölgenin belirlediği sadece birkaç liken türüne rastlanmaktadır. Filementöz cinslerde *Coenogonium*, *Ephebe*, *Cystocoleus* ve *Racodium* fotobiyont bölgenin belirlediği bir tallus morfolojisine sahiptir.

Likenler, yaşadıkları bölgelere ve iklim şekillerine göre tallus yapıları bulundukları bölgeye uyum sağlamak amacıyla farklı fizyolojik formlarda bulunmaktadır. Tallus yapılarına göre likenler yaygın olarak üç şekilde gözlemlenmektedir. Bunlar Foliose (yapraksı), Crustose (kabuksu) ve Fruticose (çalımsı) olarak isimlendirilmektedir (Wong, 2011). Ancak istisnai bir durum olarak fotobiyont bölgenin siyanobakterilerden oluşması durumunda bir dizi ek özel tip olan “jelatimsi” likenlerde mevcuttur. Burada dikkat edilmesi gereken husus bütün siyanobakterilerin oluşturduğu tallus tipleri jelatinimsi liken olarak adlandırılmamaktadır.

Crustose (kabuksu) Likenler

Ağaç kabuklarında, kaya ya da benzeri substratlar üzerin de görülebilen liken türleridir. Tallusları kabuk şeklinde olan bu likenler üzerinde bulunduğu substrata çok kuvvetli bir şekilde bağlanması ile bilinmektedir. Toplanmaları oldukça güç olan bu liken türleri kesinlikle üzerinde bulunduğu substrat kazınmadan toplanması neredeyse imkansızdır.

Kabuksu likenlerde dehidrasyon yalnızca üst, açıkta kalan bölge ile sınırlı olmaktadır. Eğimli kaya yüzeyleri gibi ekstrem habitatlarda, yüzey suyundan faydalanmalarından dolayı hayatta kalabilmektedir. Temel olarak kabuksu likenler farklı habitatlarda görülmelerinden dolayı çok sık kullanılsa da alt tipler ile de isimlendirilmektedirler. Bunlar: pudralı, endolitik, endofleotik, skuamuloz, peltat, pulvinat, lobat, efigurat ve sülfuritik crustose olarak adlandırılmaktadırlar. Kabuksu likenler tallus organizasyonu bakımında kendi aralarında hetoremer veya homomer tallus tipleride görülebilmektedir.

Kabuksu likenlerin alt tipleri kısaca açıklanmak gerekirse: pudralı liken tipine örnek olarak *Lepreria* türü örnek verilir. Bu türde tallus toz halinde görülmektedir organize olmuş bir tallus, fizyolojik olarak gözlemlenememektedir (Sharnoff, 2014). Endolitik ve endofleotik kabuksu likenler incelendiğinde sırasıyla endolitik kaya içerisinde gelişim gösteren, endofleotik ise ağaç yapraklarının veya gövdelerinin kutikula tabakasının altında gelişim gösteren türlerdir. *Lecideaceae* familyasına ait liken türleri endolitik olarak isimlendirilmektedir ve çoğu durumda bir üst korteks oluşumu gözlemlenir. (Wessels ve Schoeman 1988). Üst korteks mantar hiflerinin oluşturduğu sağlam bir kabuk tabakasından oluşmaktadır. *Acrocordia conoidea*, *petractis clausa*, *Rinodina immersa*, *Verrucaria baldensis* üst korteks oluşturan bazı türlere örnek olabilmektedir (Pinna ve ark., 1998).

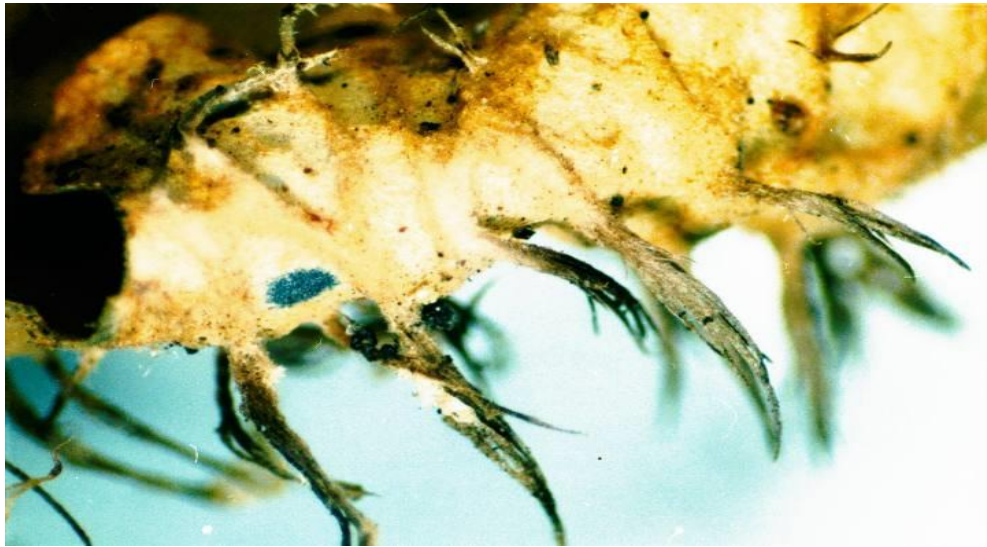
Endolitik ve endofleotik likenler, üst korteks oluşturmaları bakımından birbirleri arasında farklılık göstermektedir. *Rhizocarpon* veya *Placynthium* türleri örnek olarak alındığında

üst korteks oluşum aşamasında protallus olarak isimlendirilen bir yapı oluşturmaktadır. Bu yapı fotobiyontsuz beyaz, koyu kahverengi veya siyah bir bölge şeklinde görülmektedir. Protallusun asıl yapısı likenin su ihtiyacını karşılaması için suyun emilimini sağlayarak likenin iç bölgelerine aktarılmasını sağlamaktadır. Bu sayede liken su ihtiyacını karşılayarak, kuraklık stresine karşı da korunmaktadır. (Lakatos ve ark., 2006)

Foliose (yapraksı) Likenler

Merkezden başlayarak dairesel olarak gelişim gösteren loblardan oluşan tallus tipidir. Lob şekilleri genellikle konkav ve konveks tipte bulunmaktadır. Tallus, umbilikus (merkez noktadan zemine tutunmuş) bölge üzerinden “rizin” denilen kök yapıları ile substrata bağlanma yeteneğine sahiptir. Pek çok yapraksı liken tallusun kenarları radyal büyüme göstermesinden dolayı yaprak benzeri bir görüntü ortaya çıkarmaktadır. *Parmelia sp.*, *Umbilicaria sp.* ve *Xanthoria sp.* gibi bazı yapraksı likenlere örnek verilebilir. (Barak, 2015)

Laciniate (düzensiz sivri loblar halinde) likenler, tipik olarak gözlemlenen yaprak likenleridir. Tallus yapıları homomer ve çoğu zaman heteromer yapıda olmaktadır. *Collema*, *Leptogium*, *Physma* türleri bu yapıya örnek verilebilir. Laciniate tipi yapraksı likenler farklı habitat koşullarına ve ekstrem hava olaylarında hayatta kalabilmek için substrata bağlanan alt korteksleri farklılık göstermektedir. Substrata bağlanan bölge bitkilerdekine benzer şekilde sili, trikom ve rizin yapısında farklılaşmaktadır. Bulundukları habitatlara göre tropikal ve ılıman yağmur ormanlarında *Stictis* ve *Pseudocyphellaria*, Alp ve okyanus ormanlarında *Lobaria* ve *Nephroma* veya arktik tundralarda bulunan *Peltigera* türleri farklılaşmış alt kortekse sahiptir. (Nash 2008)



Şekil 2.3 *Peltigera praetextata* 'ya ait alt korteks ve rizin yapısını gösteren herbaryum örneği fotoğrafı (Uebel, 2007)

Umbilicate türü yapraksı likenler, tek bir merkezden oluşan dairesel tallusa sahiptir. Tallus tek bir noktadan alt kortekse tutunmaktadır bu durum isminden de anlaşılacağı üzere umbilicate (göbeksi) bir şekilde görülmektedir. *Parmeliaceae*, *Physciaceae* ve *Umblicariaceae* ailesi umlicate likenlere örnektir.

Hava sıcaklığının oldukça yüksek, nemin düşük olduğu bölgelerde bulunan *Xanthomaculina convoluta* ve *Chandropsis semivirdis* türleri de yapraksı likenlere örnek olmaktadır. Bu likenler higroskopik (nem çekici) özellik göstermektedir. Kuru halde iken nem kaybını önlemek için liken tallusu bir paket şeklini alarak sıkıca kapanmaktadır (Bu" del ve Wessels 1986). Liken suya maruz bırakıldığında ise tallus yapısı açılarak fotobiyont kısım güneş ışığına maruz kalmaktadır. Bu durumda fotosentezi önemli ölçüde artırarak likenin enerji ihtiyacı karşılanmaktadır (Lange ve ark. 1999).

Fruticose (çalımsı) Likenler

Tallus yapıları adeta bir çalı şeklinde dallanma gösterdiklerinden dolayı, dalsı ya da çalımsı liken olarak adlandırılmaktadır. Talluslar merkez noktadan dallanma göstererek gelişmektedir. Bütün talluslar merkez noktada birleşmektedir. Tallus tiplerine göre diğer liken türlerinden farklı olarak dalsı likenler; fotobiyont ve mikobiyont kısımları bir bütün halde görüldüğünden dolayı ayırt edilememektedir. (Solak., 2016)

Çalımsı likenlerin en belirgin bir diğer özelliği de bulunduğu substrattan kolayca ayrılabilir bu durum diğer liken türlerine nazaran toplanmalarını kolaylaştırmaktadır. Bazı çalımsı likenler dorsiventral (iki farklı yüzeye sahip) talluslara sahiptir. *Sphaerophorus melanocarpus* ve *Evernia prunastri* bu gruba örnek liken türleridir. Fakat çalımsı likenlerin çoğunluğu saçak şeklinde bulunan ve radyal simetrik tallusa sahip türlerden oluşmaktadır. *Sphaerophorus globus* cinsi, *Ramalina spp.* *Usnea spp.* Türleri yaygın görülen çalımsı likenlerdir. Çalımsı likenler boyutları birkaç metre uzunluğa kadar büyüme gösterebilmektedir. Habitatları kurak çöllerden nemli yağmur ormanlarına kadar görülebilmektedir (Nash, 2008).



Şekil 2.4. *Evernia prunastri*’ye ait mikroskop görüntüsü kesiti: Thallusun iki farklı bölümden oluştuğu gözlemlenmektedir. (Yeşil renk üst korteks, beyaz renk alt korteks) (Menekşeoğlu, 2021)

2.4 Likenlerde Üreme

Likenlerde üreme, liken bileşenin bir *Ascomycetes* (Askılı mantar) ve en az bir tür alg ya da siyanobakteri türünü içermesinden dolayı üremeleri diğer tek tip mikroorganizmalardan ya da bitkilerden farklı olarak görülmektedir. Likenlerde üreme eşeyli olarak ve eşeysiz olarak iki farklı biçimde gerçekleşmektedir.

Likenlerin büyük bir kısmı eşeysiz olarak çoğalmaktadır. Liken tallusunu oluşturan ve “sored” adı verilen bölgede mantar hiflerine sarılı siyanobakteri veya algler küçük parçalar halinde tallusun üst korteksinden rüzgarlar veya başka dış etmenler yardımıyla taşınarak, yeni likenleri meydana getirir.



Şekil 2.5 *Evernia prunastri* tallusu (yeşil) üzerinde sored bölgesi (beyaz) (Eubel, 2007).

Eşeyli üreme de ise sadece liken tallusun içerisindeki mikobiyont bölgede gerçekleşmektedir, algler bu yapının içerisinde vejetatif olarak çoğalmaktadır. Likenlerde eşeyli üreme daha yakından incelendiğinde likeni oluşturan mikobiyont kısımdaki mantar türüne göre değişiklik gösterdiği gözlemlenmektedir. Bu mantarlar eşeyli çoğalmaları bakımından şu şekilde isimlendirilmektedir; *Ascomycetes* mantarlarında askosporlar, *Bacidomycetes* mantarında Basidosporlar, *Pythcomcetes* mantarlarında ise oosporlar ve zigosporlar olarak gerçekleşmektedir. (Bowler ve Rundel, 1975)

Ascomycetes mantarlarındaki eşeyli üreme yapısı askosporlar incelendiğinde mantarlar askus denilen mantar hifleri üzerinde çıkıntı keseleri oluşturmaktadır. Bu hif üzerindeki keseler fruktifikasyon (üreme) organları olarak isimlendirilmektedir.

Likenlerin mikobiyont bölgesini oluşturan mantarlar fruktifikasyon organlarının morfolojik durumuna göre farklı isimlerde adlandırılmaktadır. *Pyrenomycetales* takımında fruktifikasyon organları kapalı dar ağızlı bir şekilde ise “peritesyum”, *Discomycetales* takımında ise ağızı açık, konkav şekilde ise “apotesyum” oluşturmaktadır. (Karamanoğlu 1971)

Fruktifikasyon organlarının sporlarının bulunduğu bölge olan himeniyum tabakası içerisinde cinsel sporları taşıyan “askus” hücreleri bulunmaktadır. Askuslar içerisindeki aynı ya da farklı hiflerdeki erkek ve dişi üreme hücreleri olan “Askoginium” ve “antreidium” un birbirleri ile birleşmesi ile üreme gerçekleşmektedir. (Stephen S, 2014)



Şekil 2.6 *Usnea spp.* türüne ait fruktifikasyon organları: Spor keseleri açılmış apotesyum, tallusun üst korteksi üzerinde görülmektedir (Menekşeoğlu, 2021)

2.5 Liken Metabolitleri

Likenler, mikroorganizmalar arasında simbiyotik tür olmalarından dolayı oldukça zengin hücre metabolitleri içermektedirler. Aynı zamanda likenlenlere özgü liken asitleri de içermelerinden dolayı, liken metabolitlerini araştırmacılar tarafından değerli kılmaktadır. Likenler içerdikleri metabolitler bakımından birincil metabolitler (hücre içi) ve ikincil metabolitler (hücre dışı) olarak iki ana bileşik grubuna ayrılmaktadır.

Likenlerin içerdiği başlıca birincil metabolitler hücre duvarlarına bulunan proteinler, aminoasitler, polioller, karatenoidler, polisakkaritler ve vitaminlerdir. Bu metabolitler genellikle sulu ortamda çözünerek ekstrakte edilebilmektedir (Fahselt, 1994). Liken metabolitlerinin bir kısmı mikobiyont florada diğer bir kısmı ise fotobiyont florada sentezlenmektedir. Liken tallusu kompleks bir yapıda olmasından dolayı hangi biyomolekülün nereden sentezlendiği tam olarak belirlemek kolay olmamaktadır. Likenlerin sahip olduğu birincil metabolitler likene özgü metabolitler değildir. Birçok yüksek yapılı bitkilerde, serbest yaşayan mantarlarda, bakterilerde ve alglerde likenlerde bulunan birincil metabolitler ortak olarak rastlanmaktadır (Kolukısa, 2019).

Likenlerde üretilen metabolitlerin çoğu genel olarak birincil metabolitler yerine ikincil metabolitlerdir. Genellikle ikincil metabolitler incelendiğinde liken tallusunun mantar ortağının hiflerinde bulunan fungal ikincil metabolitleri olmaktadır. Bu ürünler sulu ortamda çözünmeyip sadece organik çözücüler ile ekstrakte edilebilmektedir (Bačkorová ve ark., 2012). Liken ikincil metabolitleri bir kez sentezlendikten sonra son derece kararlı bir kristal yapı oluşturmaktadır. Bu sayede sentezlenen ikincil metabolitler kolay bir şekilde yapısı bozulmamaktadır (Rundel, 1978).

Liken ikincil metabolitleri histolojik olarak liken tallusunun “medulla” ya da korteks bölgesinde görülmektedir. En yaygın kortikal bileşikler usnik asit ve atronorindir. Atronorin haricinde bulunan bütün sekonder metabolitler pigmentli yapıdadır (Marques, 2013).

Likenlerde ikincil metabolitlerin üretilmesi ışığın şiddeti, UV gelme açısı, yükseklik, sıcaklık dalgalanmaları ve mevsimsellik gibi dış faktörlerden etkilenmektedir. Bu gibi etmenlerden dolayı aynı tür liken örneğinin içerdiği metabolit miktarı önemli ölçüde değişiklik gösterebilmektedir. Aynı zamanda likenin yaşı, tallusun konumu ve substrat zenginliği gibi faktörlerde liken metabolitlerini üretilmesini etkileyen faktörlerdendir.

Likenlerin ikincil metabolitleri, çeşitli biyosentetik yollar ile üretilir; polimanolaat, şikimik asit ve mevalonik asit yolları sayesinde biyosentezi sağlanmaktadır. Liken bileşiklerin çoğu fenolik gruplara aittir. Depsidler, depsidon, dibenzofuran, ksantonlar ve naftokinonlar gibi aromatik bileşikler karbonil grubu ya da metilen grubu içeren poliketid yolu ile üretilmektedir. Diğer yollardan üretilen bileşikler ise esterler, terpenler, steroidler ve terfenikkinonlar olmaktadır. Bu bileşiklerin üretimi fungal partnerin simbiyotik birlikteliğinin başarılı bir oluşumundan kaynaklanmaktadır. (Fahselt, 1994b; Cohen ve Towers, 1995; Elix, 1996; Muller, 2001; Brunauer ve Stocker, 2005; ve Shukla 2010).

Likenlerde bulunan sekonder metabolitleri incelendiğinde aromatik ve alifatik yapıda 1050’den fazla bileşik tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin keşfi ile araştırmacılar liken metabolitlerini ekstrakte ederek çeşitli biyolojik aktivite çalışmalarında bulunmuşlardır. Yapılan araştırmalar sonucu liken ikincil metabolitlerinin antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, antitümoral, anti-allerjen, büyüme inhibitörü vb. aktivitelere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca pigment üretimi ve pestisit yapımı gibi endüstriyel üretimler için de yine liken metabolitlerinden yararlanılmaktadır (Açıkgöz, 2017).

2.6) Likenlerin Kullanım Alanları

Likenler, yüz yıllardan beri biyolojik aktivitelerinden dolayı, çeşitli medeniyetler tarafından çoğunlukla ilkel tıp olmak üzere yaygın olarak kullanılmıştır (Dayan, 2001). Tedavi amaçlı kullanılmasının yanı sıra antik mısırdaki liken ekstraktları boya yapımında ve parfümeride kullanıldığına dair bulgular da mevcuttur. *Rocella sp.* *Parmelia ochroleciha* mor bir pigmente sahip olmasından dolayı eski çağlarda boya olarak kullanılmaktaydı. 18 yy. da ise sanayileşmenin başlaması ile tekstil ürünlerinin boyanmasında *Evernia sp.* türleri yine boyar madde olarak kullanılmıştır. Liken pigmentlerinin kullanımı sadece tekstil endüstrisinde kısıtlı olmayıp laboratuvarlarda kullanılan bir pH indikatörü olan turnusol kağıdının yapımında sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (Trease ve Evans, 1978).

Eski çağlarda ve günümüzde ilkel kalmış kabileler arasında Yeni Zelanda maroileri özellikle sarkık yapıda olan *Usnea* türlerini kullanarak yaraları iyileştirmede ve hijyen amacıyla ped ve bez yapımında likenlerden yararlanmıştır. Aynı zamanda bu likenler Avrupa, Asya ve Afrika'da ateş düşürücü ve ağrı kesici olarak kullanıldığı bilinmektedir. Öksürük, dispepsi, diyabet, kan ve kalp hastalıkları, kanamalar, akciğer tüberkülozu, bronşit ve diğer birçok hastalığın tedavisinde yine likenlerden yararlanıldığı bilinmektedir (Mitrovic ve ark., 2011).

2.7 Likenlerin Antioksidan Aktivitesi

Gıdalarda antioksidan bileşikler, sağlığı koruma faktörü olarak önemli bir rol oynamaktadır. Tipik bir besindeki antioksidan bileşiklerinin çoğunluğu bitkisel kaynaklardan elde edilir ve çok çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip bileşik sınıflarına aittir. Doğal olarak elde edilen antioksidan kaynakları başlıca kepekli tahıllar, meyveler ve sebzelerdir. İçerdikleri E vitamini, C vitamini, karotenler ve fenolik bileşikler çeşitli hastalıklara yakalanma riskinde azaltma potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Yine bilimsel kanıtlar antioksidanların kanser ve kalp hastalıkları dahi birçok kronik hastalıkların riskini azalttığı bilinmektedir. Antioksidanlar, hücre içi reaktif oksijen türlerini (ROS) ve oksidatif stresin neden olduğu hastalık etmen faktörlerinin azaltılmasında önemli bileşiklerdir. Özellikle serbest radikallerin ve katalitik metallerin şelatlanmasını sağlayarak bu radikallerin olası negatif etkilerini en aza indirdiği bilinmektedir (Miller, 2000).

Likenlerin tedavi edici özelliklerinin bilinmesinden dolayı araştırmacılar uzun yıllardan beri likenlerin antioksidan aktiviteleri ile ilgili araştırmalara yönelmiştir. Literatür incelendiğinde likenlerin antioksidan özellikleri ile ilgili çok sayıda rapor mevcuttur.

Behera ve ark., (2008) liken tallusunu oluşturan mikobiyont florayı in vitro ortamda kültürleyerek *U.ghattensis*, *H.podocarpa*, *A. awasthi* ve *P.tinctorum* türü likenlerden elde edilen mantarların antioksidan özelliklerini incelemiştir. Bu likenler arasında *A. Awasthi* ve *U. Ghattensi*in özleri *H. Podocarpaya* kıyasla daha fazla antioksidan aktivite

gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre içerdikleri antioksidan özelliklerinden dolayı oksidatif strese karşı yenilenebilir bir kaynak olarak likenlerin kullanılabilceği öneri sürülmektedir.

Susithra ve ark., (2011) yaptığı çalışmada *Usnea spp.* Türlerinin in vitro antioksidan potansiyelini değerlendirmiştir. Antioksidan analiz yöntemleri DPPH radikal süpürme aktivitesi, hidroksil radikal süpürme aktivitesi, nitrik oksit radikal temizleme aktivitesi ve hidrojen peroksit analizleri yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre farklı organik çözücüler ve farklı fraksiyon sonuçları değerlendirilerek Su-I'in Su-II bileşiğine kıyasla daha etkili bir bileşik olduğu raporlanmıştır.

Luo ve ark., (2010) tüketilebilir bir liken türü olan *Ramalina conduplicans*'ın antioksidan aktivitesi incelemiştir. Liken ekstraktlarının radikal indirgenme gücü ve radikal süpürme aktivitelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca TLC ve HPLC gibi kromatografik yöntemler aracılığı ile antioksidan bileşik içerikleri analiz edilerek radikal süpürme aktivitesinde rol alan metabolitlerin sekikaik ve homosekikaik asit olduğu tespit edilmiştir.

Kosanic ve ark., (2012) yılındaki araştırmasında *Umbilicaria* türlerinden; *U.cylindrica*, *U. Crustulosa* ve *U. Polyphylla* likenleri kullanılarak in vitro antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri araştırılmıştır. Bu türler arasında *U. Polyphylla* en yüksek serbest radikal süpürme aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. (1 mg/ml konsantrasyonda %72 inhibisyon). Radikal süpürme ve DPPH radikali indirgenme aktivitesinin yüksek olması içerdiği güçlü flavonoidlere sahip olmasından dolayı antioksidan kapasiteye etki ettiği düşünülmektedir.

Ganesan ve ark., (2015) antioksidan ve antibakteriyel çalışmasında Hindistan Tamil Nadu bölgesinden toplanan *P. Austrosinensis*, *P.hababianum* ve *P.tinctorum* likenleri DPPH ve Ferric indirgenme aktiviteleri incelenmiştir. *P.tinctorum* asetona çözeltisi, *P.hababianum* ve *P.asutrosinensis* benzen çözeltisi yüksek antioksidan aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca çalışmaya ek olarak *Salmonella typhimurium* üzerinde agar disk difüzyon yöntemi ile test edilen özütler en yüksek antibakteriyel aktiviteyi *P.tinctorum* 13.77 mm olarak belirlenmiştir.

2.8) Antibiyotiklerin Keşfi ve Potansiyel Durumu

1940' yıllarında antibiyotiklerin kullanılmaya başlanmasından önce bakteriyel kaynaklı enfeksiyonların çeşidi, günümüze göre daha azdı. Ancak burada dikkat edilmesi gereken nokta enfeksiyonların o yıllarda insanlar üzerinde öldürücü etki göstermesiydi. Özellikle II. Dünya savaşında salgın hastalıkların başında olan frengi, zatürre, menenjit gibi enfeksiyonlar o dönemlerde ölümcül olmaktaydı. Alexander Fleming'in bu salgın hastalıklarının önüne geçebilmesi ve can kaybının en aza indirebilmesi için 1928 yılında keşfetmiş olduğu, mucizevi bir ilaç olarak kabul edilen penisilinin antibiyotik olarak kullanımı 1940'lı yılların başlarına dayanmaktadır. O yıllarda süre gelen 2.dünya

savaşında penisilinin aylık üretimi 650 milyon birimi geçmiş ve ölüm oranlarını büyük oranda düşmesi sağlanmıştır bu sayede “100 yılın icadı” olarak kabul edilmektedir (Derderian, 2007)

1950’li yıllara gelindikçe antibiyotiklerin enfeksiyonlarla mücadele amacıyla bilinçsizce kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Bu durumun sonucu olarak bakteriyel kaynaklı enfeksiyonlarda mevcut antibiyotiklerin öldürücü etkileri kaybolarak enfeksiyonlar antibiyotiğe dirençli hale gelmiştir. İlaç firmaları bu durumu önleyebilmek ve piyasadaki üstünlüklerini koruyabilmek amacıyla sentetik antibiyotik üretimlerini arttırmış, günü kurtarma arayışına koyulmuşlardır. Bu durumun sonuçları da yine bakteriyel direnç gözlemlenerek enfeksiyonları önlemede antibiyotikler yetersiz kalmıştır. Günümüzde 1940 ile 1960’lı yıllarda üretilen çoğu antibiyotiklerin ilkel formları klinik olarak kullanılamamaktadır çünkü çoğu mikroorganizmaların antibiyotik dirençleri o yıllarda üretilen ilaçlara karşı oldukça dayanıklıdır (Hede, 2014).

Bakteriler, tehdit ortamı algıladıklarında hücre içi madde erişimini kapatabilir, antimikrobiyal ajanlara karşı direnç mekanizması geliştirebilir, antimikrobiyal maddeleri hücre duvarlarından hücre pompaları ile dışarı atabilir ya da enzimatik parçalanma yollarıyla antibiyotik etki gösteren ajanı etkisizleştirebilir. Başarılı bir direnç mekanizması oluşturmak amacıyla bakteriler bu yolların bir ya da birkaçını modifiye ederek kalıtsal olarak da aktarabileceği, güçlü bir savunma stratejisi ortaya koymaktadır (Sheldon, 2005). Bakterilerin antibiyotik direnç mekanizmaları incelendiğinde tanımlanan ilk antibiyotik direnç mekanizması “penisilinaz” olmaktadır (Abraham ve Chain, 1940).

Özellikle insan ve hayvanlarda görülen antibiyotik dirençleri, başta gelişmiş ülkeler olmak üzere antibiyotik kullanımını küresel bir tehdit haline getirmiştir. Bazı Avrupa ülkelerinde günlük 1 tona yakın antibiyotik tüketimi, gelecekte önlenmesi mümkün olmayan bakteriyel salgınların ortaya çıkmasına zemin hazırlaması kaçınılmazdır. Bu senaryo ışığında, ilaç firmaları ve araştırmacılar antibiyotik tüketiminde bazı kısıtlamalar getirerek sentetik olarak antibiyotik üretiminden yavaş yavaş uzaklaşma eğilimine girmektedir. Likenlerde aralarında olmak üzere bilim dünyası sentetik antibiyotiklere nazaran doğal kaynaklar kullanılarak yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılması önem kazanmıştır (Kosanic ve Rankovic 2019).

2.9 Antibiyotiklerin Çalışma Mekanizması

Bir önceki bölümde belirtildiği üzere antibiyotikler, insanlığın yaşamına girerek günümüzde salgın halde bulunmayan ya da öldürücü nitelikte olmayan hastalıkların önlenmesinde büyük rol almaktadır. Nitekim bu duruma ek olarak antibiyotikler zamanla etkili olan bakteri gruplarına artık etki gösterememektedir. Bu durumu daha iyi anlayabilmek için antibiyotiklerin bakteriler üzerinde çalışma ve etki mekanizmaları bilinmesi gerekmektedir.

Bakteri hücresinin basit olarak anatomisi incelendiğinde, gram pozitif bakteriler hücre duvarı adı verilen sert bir kabukla çevrili sitoplazmik bir membrandan oluşmaktadır. Bu durumun aksine gram negatif bakteriler ise “outer membrane” (OM) adı verilen ikincil bir lipid zarı ile çevrili hücre duvarından meydana gelmektedir. OM, bu özelliği sayesinde gram negatif bakterilere ek bir koruyucu kalkan özelliği göstererek bakteri hücrelerine birçok maddenin girmesini engellemektedir (Hauser, 2015). Ancak bakteri hücresinin difüzyonla yaşamını sürdürebilmesi için hücre duvarı üzerinde “porin” adı verilen kanallar bulunmaktadır. Bu kanallar sayesinde antibiyotiklerde bu zayıf geçidi kullanarak hücreyi etkisiz hale getirebilmektedir.

Bakterilerin bu iki farklı özelliği göz önüne alınarak antibiyotiklerin çalışma mekanizmaları etki ettikleri bölgeye ya da yapıya göre ayrılmaktadır. Başlıca antibiyotiklerin etki mekanizması şu şekildedir:

1. Hücre duvarı sentezine etki eden antibiyotikler
2. Nükleik asit sentezine etki eden antibiyotikler
3. Protein sentezine etkiden antibiyotikler

2.9.1 Hücre duvarını hedef alan antibiyotikler

Hücre duvarına sahip bakteriler, uzun şeker polimerlerinden oluşan bir peptidoglikandan meydana gelen hücre duvarına sahiptir. Peptidoglikan yapı transglikosidazların ve peptit zincirlerinin glikan ipliklerine çapraz bağlanması ile meydana gelmektedir. Peptit zincirlerinin D-alanin-alanin kısmı, penisilin bağlayıcı proteinler (PBP)’ler varlığında glisin kalıntıları ile çapraz olarak bağlanmaktadır (Kahne, 2005). Bu çapraz bağlanma bakteri hücre duvarını güçlendirmektedir PBP’ler biri sitoplazmik membrana gömülü diğer bir bölgesi ise periplazmik aralığa uzanan iki farklı bölümden oluşmaktadır. Periplazmik bölgede enzimin aktif bölgesi yer almaktadır. Penisilin ve diğer β -laktamlar bu enzimlerin substrat olarak analogu olmaktadır. Bu nedenle enzimlere penisilin bağlayan proteinler adı verilmiştir. (Reynolds, 1989).

Beta-laktam antibiyotikler

β -laktam ajanlarının ilk hedefleri Penisilin bağlayan proteinler (PBP)’ler olmaktadır. β -laktam halkası normalde PBP ile bağlanan peptit zincirinin D-alanin bölümünün antagonist olduğu varsayılmıştır. PBP-laktam halkası ile etkileşime girerek yeni bir peptidoglikan tabakasını sentezlemesini engellemektedir. Bu durumun sonucu olarak peptidoglikan yapı bozulur ve bakteri hücresinin parçalanması sağlanır (Dzidic ve ark., 2008).

Tablo 2.9.1 Bazı Oral β -laktam antibiyotikler (Holten ve Onusko 2000)

Sınıf	İlaç	Antimikrobiyal Spektrum
Doğal Penisilin	Penisilin V	<i>Streptococcus</i> türleri ve ağız bölgesinde yaşayan anaeroblar
Penisilinaza dirençli penisilin	Cloxacilin (Tegopen)	Metisiline hassas <i>Staphylococcus aureus</i> ve <i>Streptococcus</i> türleri
	Dicloxacilin (Dynapen)	
	Nafcilin (unipen)	
	Oxacilin (Prostaphlin)	
Aminopenisilin	Amoksisilin	Penisilin V'in kapsadığı bakterilere ek olarak <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Enterococcus</i> türleri, <i>Proteus mirabilis</i> ve <i>Escherichia coli</i> nin bazı türleri
	Ampisilin	
	Bacampisilin	
β -laktam- β -laktamaz inhibitör kombinasyonu	Amoksisilin klavulanat (augmentin)	Aminopenisilinin kapsadığı bakterilere ek olarak β -laktamaz üreten metisiline duyarlı <i>S.aureus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> ve <i>Morexella</i>
Antipseudomonal penisilin	Karbenisilin (Geosilin)	<i>Pseudomonas</i> ve <i>Klebsiella</i> türlerine karşı sınırlı etkinlik
I. Jenerasyon sefalosporin	Sefadroksil (Duricef) Sefalekssin (Keflex) Sefaridin (Velocef)	Metisiline duyarlı <i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>P.mirabilis</i> ve <i>Klebsiella</i> türleri
II.Jenereasyon sefalosporin	Sefaklor (Ceclor)	I.jenerasyona kıyasla β -laktamaz üreten mikroorganizmaların daha gelişmiş kapsamı
	Sefprozil (Cefzil)	Metisiline hassas <i>S.aureus</i> , <i>H. Influenzae</i>
	Sefuroksim (ceftin)	<i>M. catarrhalis</i> , <i>E. Coli</i> , <i>P.mirabilis</i> ve <i>Klebsiella</i> türleri
Karbapenem	Lorakarbef (Lorabid)	II.jenerasyon sefalosporin bakterilerin tamamı
III.jenerasyon sefalosporinler	Sefdinir (omnicef)	III.jenerasyon sefalosporin bakterilerin tamamına ek olarak genişletilmiş gram-negatif bakteri etkinliği, <i>Proteus vulgaris</i> ve <i>Providencia</i> türleri

Glikopeptidler

Yalnızca gram pozitif bakterilere karşı etki göstermektedir. Glikopeptidler öncü peptidoglikan alt birimin peptid yanzinciri olan D-alanin D-alanin bölgesine bağlanmaktadır. Büyük bir ilaç molekülü olan vankomisin, bu D-alanin alt birimine PBP bağlanmasını önleyerek hücre duvarını inhibe etmektedir (Grundmann ve ark., 2006).

2.9.2 Protein sentezinin inhibe edilmesi

Bakterilerde santral dogma, ilk olarak bakteriyel DNA'daki bilgiler, mesajcı RNA (m-RNA) olarak adlandırılan transkripsiyon işlemini sentezlemek için kullanılmaktadır. Daha sonra ribozom adı verilen makromoleküler yapıda translasyon olarak bilinen bir işlem gerçekleşerek m-RNA da bulunan proteinler sentezlenir. Protein biyosentezi ribozomlar ve sitoplazma tarafından katalizlenmektedir. Bakteriyel 70s ribozom, iki ribonükleotik alt birim olan 30s ve 50s alt birimlerinden oluşmaktadır. Antimikrobiyaller bakteri ribozomunun 30s veya 50s alt birimlerini hedef alarak protein sentezini inhibe etmektedir.

30 s ribozomal alt birimin inhibe edilmesi

Aminoglikozitler

Aminoglikozitler (AG) negatif yüklü dış membran (OM) bağlanan ve porin üzerinde geniş gözeneklerin oluşmasına yol açarak antibiyotiklerin hücre içerisine nüfuz etmesine izin veren pozitif yüklü moleküllerdir. Antibiyotiklerin bu yolda ana etki hedefi ribozomdur. Antibakteriyellerin ribozomlara bağlanabilme olayı enerjiye bağımlı aktif taşıma mekanizması ile gerçekleşmektedir. Bu durum da oksijen ve aktif bir proton taşıyıcına bağımlı olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı AG, aerobik koşullarda çalışarak anaerobik bakterilere karşı zayıf bir aktiviteye sahiptir. Aminoglikozitler hücre duvarını sentezini etki eden β -laktam ve glikopeptitler gibi antibiyotik türevleri ile ortak çalışmada bulunur. AG'ler hücre içerisindeki 30s alt birimin 16s r-RNA'sı ile etkileşerek yanlış okuma ve mRNA çevirisine neden olarak proteinin üç boyutlu yapısının oluşmasını erkenden sonlandırmaktadır (Vannuffel ve ark., 2002; Johnston ve ark., 2002).

Tetrasiklinler

Aminoglikozit yapıdaki antibiyotikler, sindirim yolu ile emilemeyip sadece kas içerisine intravasküler yoldan etki göstermektedir. Tetrasiklin, kloratetrasiklin, doksisisilin veya minosiklin gibi tetrasiklin türevleri t-RNA'nın A bölgesini bağlanmasını inhibe ederek korunmuş bölge sekanslarını etki etmektedir (Wise, 1999).

50s Ribozomal alt birimin inhibe edilmesi

Kloroamfenikol

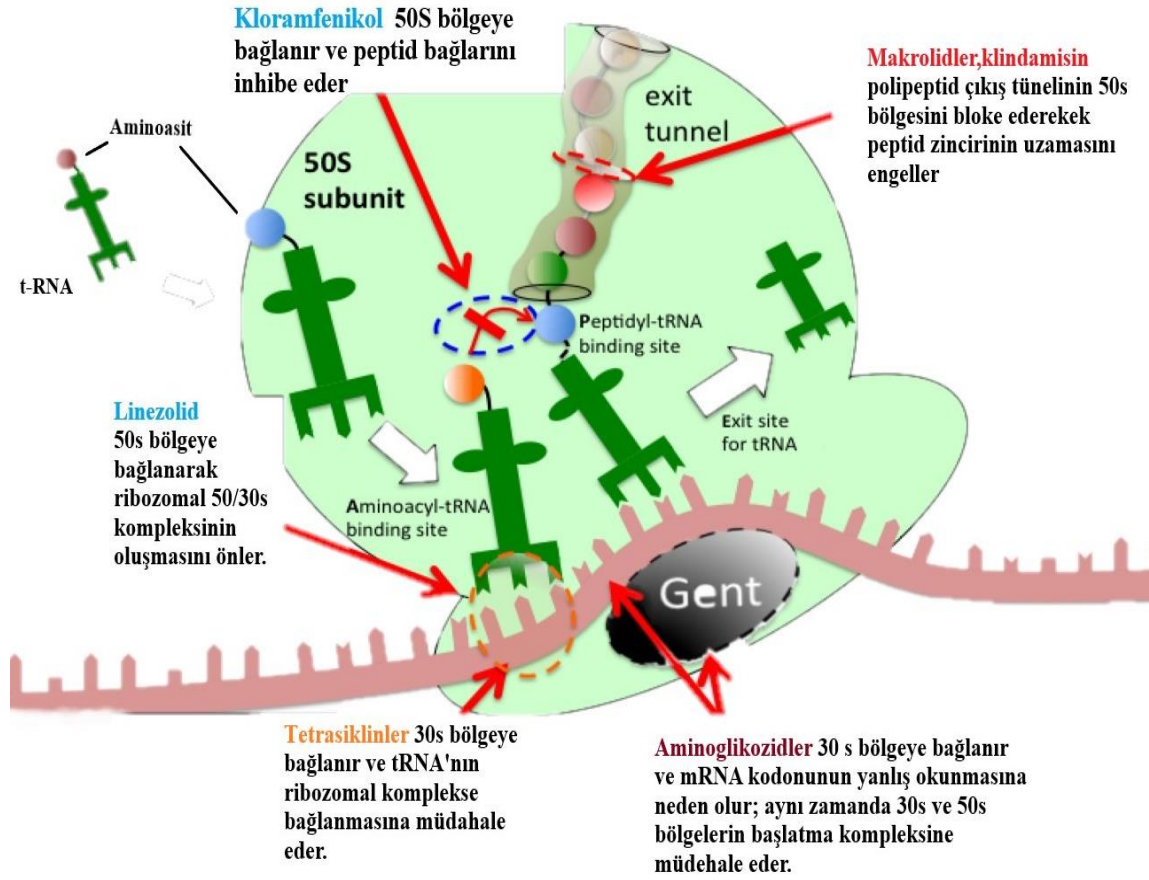
Ribozomun 50s alt biriminin 23s r-RNA'sının peptidil transferaz boşluğunda korunmuş dizilerle etkileşime girer. Dolayısıyla t-RNA'nın ribozomun A bölgesi ile bağlanmasını engelleyerek protein sentezini inhibe eder.

Makrolitler

Makrolitler, linkozamidler ve streptograminler ile benzer etki göstermektedir. Etki mekanizması 50 s ribozomal alt birimin 23 r-RNAsının korunmuş bölgeleridir. Burada kloroamfenikolden farklı olarak protein sentezinin erken aşamasında etki göstermektedir. Peptidil transferanz merkezinde peptid zincirlerinin ayrılmasına neden olmaktadır.

Okzalidinonlar

Linezolid, Okzalidinonlar içerisinde klinik olarak onay alan ilk antibakteriyel ve tamamen sentetik bir antimikrobiyal ajandır. Okzalidinon birkaç aşamalı olarak protein sentezini inhibe etmektedir bunlar; ilk olarak 23S r-RNA ya bağlanarak protein sentezinin inhibisyonu ikincil olarak 70s alt birimin inhibisyonunu bastırarak t-RNA ile etkileşime girmektedir (Kapoor ve ark., 2017) .



Şekil 2.9.2 Protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerin etki mekanizması illüstrasyonu (Anonim, 2016)

2.9.3 DNA replikasyonunun inhibisyonu

Kinolonlar

Florokinolonlar (FK) yaygın olarak kullanılan antibakteriyel ilaçlardır. Kinolon türevi ilaçlar yapısında flor ihtiva etmesinden dolayı florokinolon türevleri de bulunmaktadır. Tüm florokinolonlar bakteri DNA sına etki ederek bakteriyi öldürücü etki göstermektedir. Çalışma mekanizması DNA jiraz (tip II topoizomerez) hedef alarak yüksek afinite ile bağlanmaktadır. FK'lar tip II topoizomerezlerin α - alt birimine müdahale ederek DNA ipliklerini keserek tekrar mühürlüme işlevlerini getirir. Sonuç olarak hatalı paketlenmiş DNA- enzim kompleksi replikasyon çatalının ilerlemesini inhibe eder, böylece bakteriyel DNA sentezi engellenir. Bu duruma ek olarak hatalı olan DNA durdurulur ve hücre nekrozuya sonuçlanır (Blondeu, 2004).

Folik asit mekanizması inhibitörleri

Sülfonamidler ve trimetoprim

Bu ilaçların her biri, folik asit metabolizmasındaki farklı aşamaları engellemektedir. Sülfonamidler, enzim için doğal substrat olan p-amino benzoik asitten daha yüksek ilgi ile rekabetçi bir şekilde dihidropteroat sentazı inhibe etmektedir. Trimetoprim gibi ajanlar folik asit sentezinin bir sonraki aşamasına etki eder ve Dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe etmektedir (Yoneyama, 2006).

2.10 Antibiyotik Test Yöntemleri

Antibiyotik test yöntemleri, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının ve halk sağlığı merkezlerinin vazgeçilmez araştırma yöntemleridir. Antibiyotikler, genel olarak bakterilere geniş spektrumda tasarlanırsa da günümüzde bakteriyel direnç sahip bakteri suşlarının artmasından dolayı artık her bakteriye aynı tür antibiyotik etki edememektedir. Klinik laboratuvarlarda teşhis konulduktan sonra antibiyotik tedavisine başlamadan önce izole edilen bakteriler *in vitro* ortamda yetiştirilerek antibiyotiklere duyarlılık testleri yapılmaktadır. Bu sayede o bakteri suşuna etkili antibiyotikler tespit edilerek en doğru antibiyotik tedavisinin uygulanmasında yardımcı olmaktadır.

Ayrıca antibiyotik test yöntemleri hangi mikroorganizmaya *in vitro* ortamda hangi antibiyotiğin etkili olduğunun belirlenmesinin yanında, uygulanacak ilaç dozunun bakteriler üzerinde minimum durdurucu etkisinin ölçülmesinde de oldukça önemlidir. Bu sayede verilecek doz miktarının minimal konsantrasyondaki etkisi *in vitro* ortamda tahmin edilerek ileri antibiyotik araştırmalarına da ışık tutmaktadır.

2.10.1 Broth makro dilüsyon testi

En eski antimikrobiyal test yöntemlerinden biri olan makro sıvı tüp dilüsyon yöntemi, test tüplerine eklenen sıvı bir besiyerinde antibiyotiklerin ikişer kat seyreltilerek eklenmesi amacına dayanmaktadır (Ericsson ve ark., 1971). Prosedür, eşit hacimde sıvı besiyerinin deney tüplerine ilk aşamada enjekte edilmektedir. Antibiyotik test edilecek maddenin sıvı çözeltisi hazırlanarak, ilk tüpten başlayacak şekilde son tüpe kadar seri dilüsyonlarla aktarılması sağlanır bu sayede antibiyotik madde konsantrasyonu ikişer kat olacak şekilde seyrelmektedir (örn. 16,8,4,2,1 mg/ml). En son aşama olarak bütün tüplerin üzerlerine standart hale getirilmiş bakteri süspansiyonundan standart hacimde eşdeğer olarak aşılması yapılır ve bir gece boyunca 35 °C’de inkübasyonu sağlanır (Jorgensen ve Turnidge, 2007). İnkübasyon sonrası tüpler göz ile incelenerek bulanıklık incelemesi yapılır. Bulanıklığın oluşmaya başladığı en düşük konsantrasyon belirlenerek, bir önceki konsantrasyon büyümeyi engelleyen antibiyotik konsantrasyonu, yani minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri olarak belirlenir. Bu yöntemin kesinliği antibiyotiklerin seri dilüsyonlarının manuel olarak hazırlanmasına bağlı olarak + veya – iki kat konsantrasyon hatası olarak kabul edilir. Tekniğin avantajı kantitatif bir sonucun elde edilmesidir. Makrodilüsyon yönteminin temel dezavantajı, her test için antibiyotik

solüsyonlarının hazırlanmasının zahmetli ve iş gücü gerektirmesidir. Ayrıca manuel çalışmada hata olasılığı daha yüksektir (Balows, 1972).

2.10.2 Broth mikrodilüsyon testi

Makro dilüsyon testinin minyatürize edilmiş ve otomasyona uygun hale getirilmiş yöntemidir. Mikro dilüsyon, küçük tek kullanımlık mikrokuyucuklar kullanılarak yapılmaktadır. Standart mikro dilüsyon tepsileri her biri 0.1 ml'lik hacim içeren 96 adet kuyucuktan oluşmaktadır. Her bir tepside iki kat dilüsyon aralığına sahip 8 farklı dilüsyon aralığı ve 12 farklı antibiyotiğin test edilebilmesi mümkün olmaktadır. Testin en büyük avantajı otomasyona uygun olarak önceden sıvı besiyeri ile doldurulmuş hazır mikrokuyucukların ticari olarak satılmasıdır. Burada yapılması gereken sadece test edilecek antibiyotiğin seyreltilmesi ve test edilecek mikroorganizmanın standart aşî kültüründen inokülasyonudur. Makrodilüsyon yöntemine göre mikroorganizmaların gelişimi küçük hacimlerinden dolayı gözle net olarak ayırt edilemeyebilir. Bu yüzden test otomasyona dayalı bir spektrofotometrik okuma yapılarak mikrobiyal üreme gözlemlenir. Makro dilüsyon yöntemine göre test nispeten biraz pahalı olmakla beraber, getirdiği avantaj olan iş gücünün azaltılması ve otomasyona uygun olması sebebiyle klinik olarak tercih edilmesini ön plana çıkarmaktadır (Tenover, 2009; Balouri ve ark., 2016).

2.10.3 Antimikrobiyal gradyan yöntemi

Antimikrobiyal gradyan difüzyon yöntemi, mikrobiyal duyarlılığı belirlemek için bir katı agar ortamında, antimikrobiyalin konsantrasyon gradyanının oluşturulması ilkesine dayanmaktadır. E-test (bioMerieux ABBIODISK) prosedürü olarak da bilinen bu yöntem, antibiyotiğin azalan konsantrasyonlarını içeren şerit "strip" test kağıtlarının mikroorganizma emdirilmiş agar plaka üzerine yerleştirilmesi esasına dayanmaktadır. İnkübasyon sonrası inhibisyon incelendiğinde elips bir şekilde inhibisyon çapı olduğu gözlemlenir. Şeridin azalan konsantrasyonlarına paralel olarak azalan inhibisyon çapı, antibiyotik konsantrasyonun agar plaka üzerine difüzyonu bu sayede belirlenebilmektedir (Reller ve ark., 2009).

Antimikrobiyal gradyan yönteminde, E-test şeritleri diğer agar difüzyon yöntemlerine nazaran biraz pahalı olmaktadır. Bu yöntem bazı antibiyotiklerin özel inkübasyon ortamı gerektiren ve üremesi güç olan mikroorganizmaların test edilmesinde en uygun olanı olduğu için tercih edilmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta E-test yöntemi ile broth dilüsyon yönteminin benzerlik göstermesidir. Aradaki fark E-testin katı agar plaka üzerinde antibiyotik maddenin azalan konsantrasyonlarının test edilmesi iken, sıvı broth yönteminde sıvı besiyerinde seri dilüsyon ile antibiyotik maddenin azalan konsantrasyonlarının test edilmesidir. Minimal inhibisyon konsantrasyonunun yorumlama kriterleri asla standart olmayıp birbirleri ile karıştırılmamalıdır. Çünkü

antibiyotik etken maddenin difüzyonu biri katı ortamda diğeri ise sıvı ortamda gerçekleşmektedir (Prakash ve ark., 2008).

2.10.4 Agar disk difüzyon metodu

1940 yılında geliştirilen agar disk difüzyon testi, birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak kullanılan antimikrobiyal duyarlılık testidir. Günümüzde laboratuvar standartları enstitüsü (CLSI) tarafından bakteriler ve mayalar üzerinde standart test yöntemi olarak kabul edilmiştir. Zor üreyen bakterilerin hepsi doğru bir şekilde test edilemese de bu yöntemle: *Streptococci*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis* gibi bazı güç üreyen bakterileri test etmek için, spesifik kültür ortamı, çeşitli inkübasyon koşulları ve inkübasyon bölgelerini yorumlamada standardizasyon kriterlerini belirlemede yararlanılmaktadır.

Bu test yönteminde, agar plakalar üzerine mikroorganizmaların standartlaştırılmış kültürünün aşılması gerçekleştirilir. Ekim yapılan mikroorganizmalar üzerine standardize edilmiş (yaklaşık 6 mm) çapındaki kâğıt antibiyotik diskler yerleştirilir. Petri kapları uygun olan inkübasyon koşullarında kontamine olmayacak şekilde inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonrası agar üzerine yerleştirilen antibiyotik disklerinin agar plaka içerisine nüfus etmektedir. Bu süre sonunda nüfus eden antibiyotik bölgeleri bir çap oluşturarak mikroorganizmaların büyümesini engeller. Bu sayede büyüme inhibisyon çapı adı verilen bu bölgeler ölçülerek antibiyotiğin mikroorganizmaya etkisi belirlenebilmektedir.

Antibiyogram testi, bakteriler üzerinde kalitatif sonuçlar sağlamaktadır. Bakterilerin antibiyotik maddeye duyarlı, orta duyarlı veya dirençli olduğu gözlemlenebilir. Klinisyenin hastaya uygulayacağı antibiyotik seçiminde ilk yanıtı basit bir yöntem olan agar disk difüzyon testi ile almaktadır. Ancak tedavi uygulamasında bu yöntemden tek başına yararlanılamamaktadır. Çünkü test mikroorganizmaların öldürücümü (bakteriyosidal) yoksa üremeyi durdurucu (bakteriyostatik) mu etki olduğunu belirleyememektedir. Yine de disk difüzyon yöntemi ilk aşamada birçok avantaj sağlamaktadır. Basitlik, düşük maliyet kararlı test edilebilme kabiliyeti ve sonuçların yorumlanma kolaylığı yöntemin tercih edilme nedenlerindendir (Reller ve ark., 2009).

2.10.5 Otomatik sistemler ile antimikrobiyal test yöntemleri

Bilgisayar destekli otomatik antimikrobiyal testler, genellikle manuel test yöntemlerine göre daha kısa sürede, daha keskin sonuçlar ve daha az iş gücüyle sonuç alınmaktadır. Hassas optik algılama sistemleri bakteriler için optimum gelişimi sağlarken, bakterilerin büyümesini de takip edebilmektedir. Food and Drug administration (FDA) tarafından onaylanmış birçok otomatik test araçları bulunmaktadır.

Bir başka otomatik sistem olan Vitek 2 sistemi (bioMe'rieux) klinik laboratuvarlarda son derece yaygın olan test sistemidir.

Mikrolitre hacimlerinde antibiyotikleri 64 kuyucuklu bir mikrolaka üzerinde test edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Vitek için bakterilerin antibiyogram testleri için ticari olarak satılan hazır test kartları da mevcuttur. Enstrüman 30-240 eş zamanlı antibiyotik testini çalışabilecek şekilde tasarlanmıştır. Cihaz gram pozitif, gram negatif ve gram negatif aerobik bakterilerin ve *S.pneumoniae*'nin 4-10 saatlik bir periyotta test edilmesine olanak sağlamaktadır. Sistemin ilk versiyonu olan Vitek 1 sistemi ise hala bazı laboratuvarlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Sistem Vitek 2 ye göre 45 kuyucuklu mikrolaka kullanırken *S.pneumoniae*'nin test edilmesine olanak sağlamamaktadır (Felmingham ve Brown, 2001) .

MicroScan WalkAway (Siemens Healthcare Diagnostic) tarafından geliştirilen sistemde 40-97 mikrodilüsyon tepsilerinde bakterilerin antimikrobiyal gelişimlerini takip eden bağımsız bir inkübatör/okuyucu cihaz kombinasyonudur. Cihaz büyümeyi takip edebilmek için bir fotometre kullanarak mikro okuyucu tabaları inkübe edebilmektedir. Florojenik substrat içeren negatif duyarlılık test panelleri ise cihaza ait florometre ile 3,5-7 saat aralığında sonuçları okuma yapabilmektedir. Ana çalışma prensibi bakteri bulanıklığıdır en geç 18 saat içerisinde gram negatif ve gram pozitif bakteriler için test sonuçları alınabilmektedir (Felmingham ve Brown, 2001).

BD phoenix otomatik mikrobiyoloji sistemi (BD diagnostics) antibiyotiklerin katlı dilüsyonlarını inoküle eden 84 kuyucuklu bir mikrolate test sistemidir. Phoenix sistemi hem türbidometrik hem de kolorimetrik büyüme algılayıcısı kullanarak mikrolate içerisindeki her bir kuyucuğu 20 dakikada bir takip etmektedir. Ayrıca cihaz için gram negatif, gram pozitif, *S.pneumoniae*, β -hemolitik ve viridans grubu streptokoklar için test panelleri mevcuttur. MİK sonuçları 6-16 saatte okunabilmektedir.

2.11 Likenlerin Antimikrobiyal özellikleri

Araştırmacıların doğal antimikrobiyallere yönelmesi ile likenlerin ilaç endüstrisindeki potansiyel değeri hızla artmaktadır. Doğal antibiyotikler arasında likenlerde bulunan ikincil metabolitler ve bunların antimikrobiyal özellikleri ilaç piyasasında azımsanmayacak kadar önemlidir (Nascimento ve ark., 2000). Antimikrobiyal etki gösteren liken metabolitlerinden bazıları *Usnea spp.* türlerinden elde edilen usnik asit, pulvunik asit, evernik asit türevleri ve likenstrenik asit gibi biyoaktif bileşikler olmaktadır. Liken ikincil metabolitlerinin esterleri olan depsidonlar ve depsitler araştırmalar arasında en umut verici biyoaktif antimikrobiyal bileşiklerdir. Likenlerde bulunan ikincil metabolitler sadece antibiyotiklere hassas bakteri suşlarına değil, bakteriyel dirence sahip bakteri suşlarına da etki göstermektedir. İlaç endüstrisinde %50 ya kadar liken türünün doğal antibiyotik kaynağı olduğu bilinmektedir (Sharnoff, 1997).

Ayrıca liken metabolitleri arasında antifungal aktivitede bulunmaktadır. *Neurospora crassa* küfö üzerinde yapılan, liken ikincil metabolitlerinden olan usnik asit ve bazı liken depsidlerinde bulunan monosiklik bir fenol olan hamatomik asit denemelerinde küfün büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettiğı gözlemlenmiştir (Hale, 1974), Likenlerin antifungal özelliklerinin bulunması ile tarımda yoğun olarak kullanılan sentetik pestisitlere doğal bir alternatif olmaktadır. Tarım için kullanılan doğal pestisitler, sentetik pestisitlere göre çevre üzerinde daha az kirletici etkiye neden olmaktadır.

Lawrey (1977) liken ekstraktlarının ve liken ürünlerinin fungal sporları inhibe ettiğini bildirmiştir. Ayrıca Gardner ve Mueller (1981) yılında yaptığı çalışmada test edilen sekiz farklı likenik asitin *Funaria hygrometrica*'nın spor çimlenmesini ve spor oluşumunu engellediğı gözlemlenmiştir. Liken ekstraktlarının diğer mantar türleri üzerinde gelişimini engellediğı bilinmektedir, *Parmelia moliuscula*'nın alkol ve sulu liken ekstraktlarının *Penicillium* ve *Rhizopus* türlerinin büyümesini inhibe ettiğı gözlemlenmiştir (Henningson ve Lundstrom 1970).

Haluwin (2004) üç liken türü olan *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* ve *C.pertentosa*, likenlerini kullanarak bitki patojeni olan 8 farklı mantar üzerinde antimikrobiyal araştırması gerçekleştirmiştir. Deney sonuçlarına göre elde edilen liken ekstraktlarından *P.ultimum* ve *P.infestans* üzerinde büyüme inhibisyonu gösterdiği gözlemlendi. Liken ekstraktlarının mantarların gelişimi üzerine antifungal olarak çalışması likenik asitlerin neden olabileceğı raporlanmıştır.

Tiwari ve ark., (2011) de yaptığı çalışmada *Bulbothrix setscgwanensis*, *Everniastrum nepalense*, *Heterodermia diademata*, *Parmelaria thomsonii* gibi dört farklı liken türünün aseton, metabol ve kloroform ekstraktlarının in vitro antifungal aktiviteleri 6 farklı bitki patojeni matlarda test edilmiştir. Test mantarları *Aspergillus flavus*, *A.fumigatus*, *Alternaria alternata*, *F.solani*, *F.roseum* ve *Penicillium citrinum* kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak sentetik mantar önleyici ilaç olan Ketokonazol kullanılmıştır. Antifungal aktivite Bauer-Kirby disk difüzyon testi kullanılarak analiz edildi. Test sonuçlarına göre liken ekstraktlarının aseton ve metanol özleri, test edilen bitki patojenleri üzerinde kloroform ekstraktına göre daha etkili bulunmuştur. *Fusarium oxysporum*, *F.solani* *F.roseum* üzerinde aseton ve metanol özleri nispeten diğer bitki patojenlerine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Burkholder (1944) Yılında yayınladığı bir çalışmada, penisline alternatif bir antibiyotik olarak belirttiğı liken metabolitlerinin antimikrobiyal aktivitesini çalışmıştır. 40 kadar liken türünün 27 farklı bakteri suşu üzerinde antimikrobiyal testleri yapılmış, özellikle *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* a karşı gelecek vaad eden antimikrobiyal potansiyele sahip olduğu raporlanmıştır. Böylece burkholder'ın yaptığı çalışma liken metabolitlerinin antimikrobiyal özellikleri kanıtlanmış ve doğal antibiyotik çalışmalarına likenlerde dahil olmuştur.

Balaji ve ark., (2006) yılında yaptığı çalışmada *Rocella montagne* türü likenin antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon yöntemi ile 6 farklı insan patojenine karşı test etmiştir. Mikrobiyal aktiviteyi araştırmak için likenleri dört farklı organik solvent (heksan, etil asetat, aseton ve metanol) kullanarak ekstrakte etmiştir. Deney bulgularına göre metanol ekstratında en etkili antimikrobiyal yanıtı elde etmiştir.

Karagoz ve ark., (2009), *Peltigera polydactyla* ve *Ramalina farinacea* nın sulu ve etanol ekstraktlarını kullanarak bazı patojen bakteriler üzerine aktivitesini incelemişlerdir. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* üzerinde inhibisyon aktiviteleri gözlemlendi. Deney sonuçlarına göre etanol ekstraktının sulu ekstrakta göre mikrobiyal aktivitesi daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Ristic ve ark., (2016) yaptığı çalışma da *Nelanelia subaurifera* ve *Melanelia fuliginosa*'nın antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Fitokimyasal aktivitesi ise HPLC-UV ile belirlendi. Antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi ile belirlenirken, antimikrobiyal aktivite Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemi ile ölçülmüştür. Sitotoksik aktivite ise MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Fitokimyasal aktivite ölçümlerinde liken ekstraktlarında bulunan ikincil metabolitler depsidler, dibenofuran (usnik asit) bileşikler tespit edilmiştir. Liken ekstraktlarının antioksidan aktivitesi IC₅₀ 121.52 ila 424.51 ug/ml arasında tespit edilirken minimum inhibisyon değerleri ise 1 mg ile 0.0625 mg arasında değişkenlik göstermiştir. Liken türleri arasında en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi gösteren tür *M.subaurifera* türü olduğu raporlanmıştır.

Aoussar ve ark., (2020) çalışmasında Fas bölgesinden toplanan *Evernia prunastri*, *Ramalina farinacea* ve *Pseudevernia furfuracea* türü likenlerin aseton ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Antibakteriyel etki sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* ve *Staphylococcus aureus* patojen mikroorganizmalar üzerinde test edilmiştir.. Çalışmada *P. Furfuracea* tüm suşlar için 0.039-0.15 mg/ml. *E.prunastri* den elde edilen ekstrakt, 0.039-0.15 mg/ml *R.farinacea* ekstresi 0.078-0.625 mg/ml arasında minimal inhibisyon aktiviteleri göstermiştir. Çalışmanın sonucuna göre en güçlü antimikrobiyal aktivite 0.039 mg/ml olarak *Evernia prunastri* ile *Pseudevernia furfuracea* metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* karşı elde edilmiştir.

Bailon ve ark., (2019) Antarktik habitatlardan topladığı liken örneklerinin antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Toplanan örnekler kurutularak öğütüldü ve 1:10 w/v oranında aseton ve metanol organik solventleri karıştırılarak ekstraksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Elde edilen total kuru ekstraktlar alınarak *Staphylococcus aureus* ATCC:14775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC:27853 ve *Vibrio alginolyticus* ATCC:17749' a karşı antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. Antibakteriyel aktivite

sadece *S. aureusa* karşı gözlemlenirken antimikrobiyal aktivite 31.25 ug/ml ile 7.81 ug/ml arasında raporlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite 31.25 ug/ml de %98,43 bakteri inhibisyonu olarak elde edilmiştir.

3 MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan liken türleri

Deney çalışmalarında kullanılan *Evernia prunastri* ve *Usnea flipendula* liken örnekleri rakımı 1.215 m olan Tokat Bozatalan köyü, Çeten deresi mevkiinden 02.03.2020 tarihinde toplanmıştır. Toplanan liken örneklerinin deney proseslerinde ayırt edilebilmesi için *Usnea flipendula* (L-1) *Evernia prunastri* (L-2) olarak işaretlenmiştir. Toplanan liken örnekleri Tokat Gaziosmanpaşa üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik bölümünde Prof. Dr. İsa KARAMAN tarafından teşhis edilmiştir.

3.1.2 Çalışmada kullanılan bakteri suşları

Antibakteriyel çalışılmalarda kullanılan bakteri suşları Prof. Dr. İsa KARAMAN stok kültüründen yetiştirilmiştir. Çalışmada kullanılan bakteriler çalışma proseslerinde isimlendirilmesi kolay olması açısından Human Pathogen Bacteria (HPB) olarak numaralandırılmıştır. Çalışmada kullanılan bakteriler;

- HPB-35: *Bacillus cereus* (DSMZ: 4312)
- HPB-41: *Streptococcus pyogenes* (ATCC:7)
- HPB-71: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC: 29133728)
- HPB-96: *Acinetobacter baumannii* (Hastane suşu)
- HPB-125: *Salmonella enteritidis* (Hastane suşu)
- HPB: 130: *Staphylococcus aureus* (ATCC: 25923)
- HPB-132: *Enterococcus faecalis* (ATCC: 29212)
- HPB-137: *Escherichia coli* (ATCC: 25922)

3.1.3 Çalışmada kullanılan fungus türleri

- *Phoma tracheiphila* (mal secco)
- *Didymella lycopersici* (domates kanseri)
- *Venturia inaequalis*
- *Colletotrichum coccodes*
- *Fusarium oxysporum*
- *Alternaria alternata*
- *Sclerotinia sclerotiorum*
- *Aspergillus niger*

3.1.4 Kullanılan kimyasal maddeler

- Aseton
- Metanol
- Etanol
- İmipenem, streptomisin ve gentamisin antibiyotik diskleri (OXOİD)
- Sefaperazon Sulbaktam ve Penisilin G toz antibiyotikleri
- Toz flukonazole ve Nystatin diski (OXOİD)
- 0.2 M Tris-EDTA tamponu
- Nutrient Agar besiyeri
- Nutrient Broth besiyeri
- Alpha Tokoferol %95 HPLC grade
- DPPH reaktifi (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ,
- Gallik asit çözeltisi
- Sodyum Karbonat (NaCO_3)
- Sıvı Nitrojen

3.1.5 Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri

- UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu UVmini-1240)
- Spektrofotometre küveti
- Dijital hassas terazi (Precisa)
- Aerobik inkübatör (MEMMERT)
- Vorteks
- Buzdolabı
- Derin dondurucu
- Class 2 Steril kabin
- Otomatik pipetler (100-1000 ul, 10-100 ul)
- Pipet uçları
- Eppendorf, falcon ve vida kapaklı deney tüpleri
- Bek alevi
- Metal öze
- Distile su
- Pens
- Steril boş antibiyotik diskleri (OXOİD)
- Cam petri kapları
- Beher
- Porselen ve metal havan
- Manyetik karıştırıcı
- Erlenmayer
- Otoklav cihazı (Hirayama)
- Termoshaker

- Santrifüj
- Sonikatör
- Etüv
- Nitrojen Tankı



3.2 Yöntem

3.2.1 Likenlerin toplanması

Likenler toplanırken, arazi gezilerek olası liken lokasyonları belirlenmiştir. Likenler, farklı ağaçlardan ve lokasyonlardan aynı türlerin toplanmasına dikkat edilmiştir. Toplama aşamasında tallusun substrattan ayrılması dikkatlice yapılarak, yabancı bitki materyallerin olabildiğince temizlenmesi sağlanmıştır.



Şekil 3.2.1 *Usnea flipendula*'nın ağaç üzerindeki görüntüsü



Şekil 3.2.2 *Evernia prunastrin*in ağaç üzerindeki görüntüsü

3.2.2 Likenlerin temizlenmesi ve sıvı nitrojenle muamele edilmesi

Toplanan liken türleri, deney aşamasına geçilmeden önce etiketlemeleri yapılarak tallus kısımları yabancı materyallerden elle temizlenmiştir. Temizleme işleminden sonra likenler metal havana alınarak sıvı nitrojenle muamele edilmiştir. Bu sayede ekstraksiyon aşamalarında likenler çözücüsü ile muamele edilerek metabolitlerin daha iyi bir çözünme sağlanması öngörülmüştür.

3.2.3 Liken örneklerinin organik solventlerle ekstraksiyonu

Liken türleri, sıvı azot ile parçalamadan sonra L-1 ve L-2 olarak etiketlenerek steril falkon tüplerine 10'ar gram olacak şekilde ayrılmıştır. Organik solventlerle ekstraksiyonda her iki liken türü de ayrı ayrı olmak üzere 10 gram liken örneğine 120 ml organik solvent olacak şekilde örnekler alınarak, 250 ml'lik beherlere aktarıldı üzerlerine etanol, aseton ve metanol solventleri ayrı ayrı eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldı.

24 saat sonra örnekler alındı ve filtre kağıdından geçirilerek süzüldü. Süzüntü 100 ml lik beherlere alınarak, 30 °C'de Etüve yerleştirildi. Organik solventin tamamen uçması sağlanana kadar etüvde bekletildi.



Şekil 3.2.3 Liken örneklerinin Etüv içerisinde kurutulması

Kurutma işleminden sonra ekstraktlar jilet yardımı ile kazındı ve test işlemine hazır olabilmesi için steril cam petrilere aktarılarak buz dolabında (+4°C)'de muhafaza edildi.

3.2.4 Tampon çözelti ile ekstraksiyona

Toz haline getirilen liken örnekleri her iki tür liken içinde ayrı ayrı olacak şekilde 2'şer gram tartıldı ve steril falkon tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 2:14 oranı olacak şekilde 14 ml 0.2 M Tris-EDTA tamponu eklendi. falkon tüpleri sonikatöre götürülerek 15 atım 15 soğuma süresi ve 20 döngü olacak şekilde sonikasyona maruz bırakıldı. Sonikasyon sonrası homojen haline getirilen örnekler 4°C'de 4dk 15.000 RPM'de santrifüj işlemine tabi tutuldu. Süpernatant kısım alınarak 15 ml'lik steril falkon tüplerine aktarıldı kalan pellet bir miktar daha tampon çözelti ile sulandırılarak tekrardan süpernatant elde edildi. Elde edilen süpernatantlar her iki liken türü içinde ayrı ayrı olmak üzere L-1-BUF ve L-2-BUF olarak etiketlenerek -18 °C'de muhafaza edildi (Doucet B. ve ark., 2001)

3.2.6 Antibakteriyel agar disk difüzyon testi

Agar disk difüzyon yönteminde, steril petri kaplarına Nutrient agar (NA) uygun miktarda döküldü. Bakterilerin agar plaklara ekimi için 18-24 saatlik sıvı besiyerin de yetiştirilen saf kültürlerden 0.5 Mc Farland standardında ayarlanarak aşı kültürü oluşturuldu (Şahin, 2009). Her bakteri suşu için ayrı ayrı oluşturulan aşı kültürlerinden 100 µl alınarak NA içeren petri kaplarına drigalski spatülü ile yayma ekimi yapıldı.

Disk difüzyon yöntemi için önceden hazırlanan ekstraktlardan 100 mg alınarak 1.5 ml çözücüsü içerisinde tamamen çözünene kadar bekletilerek çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden alınan 20 µl'lik hacim (1,3 mg/disk) 6 mm çapındaki (OXOİD, blank disc) boş disklerle emdirildi. Ayrıca tampon çözelti ile oluşturulan ekstraktın süpernatantı doğrudan alınarak 20 µl boş disklerle emdirildi Pozitif kontrol olarak IPM: imipenem (10 µg/disk) ve S: Streptomisin (10 µg/disk) ve CN: Gentamisin (10 µg/disk) kullanıldı. Negatif kontrol olarak boş disklerle ekstraksiyonda kullanılan organik solventler (Metanol, Aseton, Etanol) ve Tampon çözelti olan Tris-EDTA tamponundan 20 şer µl emdirildi. Bakteriler 36,5 C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında oluşan inhibisyon çapları milimetrik cetvel kullanılarak ölçüldü. Çalışma 3 paralel yürütülerek sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır (Biemer J.J 1973).

3.2.7 Antifungal agar disk difüzyon yöntemi

Antifungal denemelerinde, antibakteriyel disk disk difüzyon yönteminde kullanılan Kirby-Bauer testi olarak da adlandırılan test yöntemi modifiye edilerek funguslar üzerinde test edilmiştir. İlk olarak fungus gelişimi için gerekli olan besiyeri Potatos Dextrose Agar hazırlanarak steril şartlarda petri kaplarına döküldü. Fungusların petri kaplarına ekimi için, stok saf fungus kültüründen steril swaplar ile fungus sporları alındı. Alınan fungal sporlar besiyeri içeren boş petri kaplarına agar plakanın bütün yüzeyini kapsayacak şekilde ekimi yapıldı.

Antifungal denemelerinde kullanılan ekstraktlar, yine bakteriyel disk difüzyon yönteminde olduğu her liken ekstraktının kendi çözücülerini ile çözeltileri oluşturuldu. Oluşturulan liken çözeltileri 20 şer µl (1,3 mg/ml) hacim 6 mm çapındaki (OXOİD, blank

disc) boş disklerle emdirildi. Ayrıca tampon çözelti ile hazırlanan liken su ekstraktları da boş disklerle doğrudan emdirildi. Pozitif kontrol olarak Flukonazol ve Nistatin antifungalları kullanıldı. Flukonazol 150 mg'ı alınarak 5 ml steril su içerisinde çözeltisi oluşturularak, 20 µl (0,6 mg) ve 40 µl (1,2 mg) boş disklerle emdirildi, NS: Nistatin ise hazır olarak (100 µg) OXOID antifungal diski kullanıldı. Negatif kontrol olarak Ekstraksiyonda kullanılan organik solventler ve tampon çözelti boş disklerle 20 µl olarak emdirildi. Funguslar akar gelişimi önlenmesi ve bakteriyel kontaminasyonu önlemek amacıyla steril şartlarda termo plastik film (PARAFİLM®) ile sarıldı. İnkübasyon için funguslar oda sıcaklığında tutularak inhibasyon zonları belirlenene kadar en az 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda oluşan inhibasyon çapları milimetrik cetvel yardımıyla ölçüldü.

3.2.9 Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin tespiti

Agar disk difüzyon yönteminde etkili bulunan organik solvent ekstraktlarının MİK değerleri broth makro dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Broth makro dilüsyon yönteminde 1 er ml broth alınarak 12 farklı vida kapaklı deney tüplerine aktarıldı. Ekstreler 2 mg/ml olacak şekilde kendi çözücülerinde çözülerek ilk deney tüpünden 11. Deney tüpüne kadar ikişer katlı seri dilüsyonları yapıldı. Bu sayede sırasıyla 1mg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml 31.25 µg/ml, 15,6 µg/ml 7.81 µg/ml 3.9 µg/ml 1.9 µg/ml 0.9 µg/ml konsantrasyon aralığına kadar ekstraktlar test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak 1 mg/ml konsantrasyonda sefaperazon+sulfabaktam ve penisilin G toz antibiyotikleri 1:1 ağırlık/hacim (w/v) oranında steril distile suda çözeltileri hazırlandı ve aynı şekilde ikişer katlı seri dilüsyonları yapıldı. Negatif kontrol olarak organik solventlerin 1:1 hacim/hacim (v/v) broth ile seyreltilerek seri dilüsyonları yapıldı. Mikroorganizmaların saf kültürlerinden 0.5 McFarland oranında alınarak sıvı besiyerin de aşı kültürü oluşturuldu bu aşı kültüründen 100 µl alınarak bütün tüplere inoküle edildi. Deneyde kullanılan 12. Tüp ise kontrol olarak etiketlenerek sadece 1 ml broth içerisine 100 µl bakteri inoküle edildi. Mikroorganizmaları içeren deney tüpleri alınarak 36,5 C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizmaların üremelerinin olmadığı en düşük ekstre konsantrasyonu MİK değeri olarak değerlendirilmiştir (Andrews, 2001).

3.2.10 Liken ekstelerinden toplam fenolik madde tayini

Antioksidan çalışmalarından önce liken ekstraktlarında bulunan fenolik bileşiklerin varlığının araştırılması amacıyla öncelikli olarak Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayini yapılmıştır. Bu sayede antioksidan çalışmasını destekleyecek olan fenolik bileşiklerin gallik asit eşdeğer miktarı araştırılmıştır.

Stok gallik asit çözeltisi hazırlanması

20 mg gallik asit tartılarak 20 ml saf metanolde çözüldü böylece 1 mg/ml oranında gallik asit stok çözeltisi elde edildi. Stok gallik asit çözeltisinden alınarak 1:1 oranında seyreltilme işlemi yapıldı ve derişimleri 1 mg ila 0.025 mg/ml aralığında gallik asit çözeltileri elde edildi

%10'luk sodyum karbonat Na_2CO_3 hazırlanması:

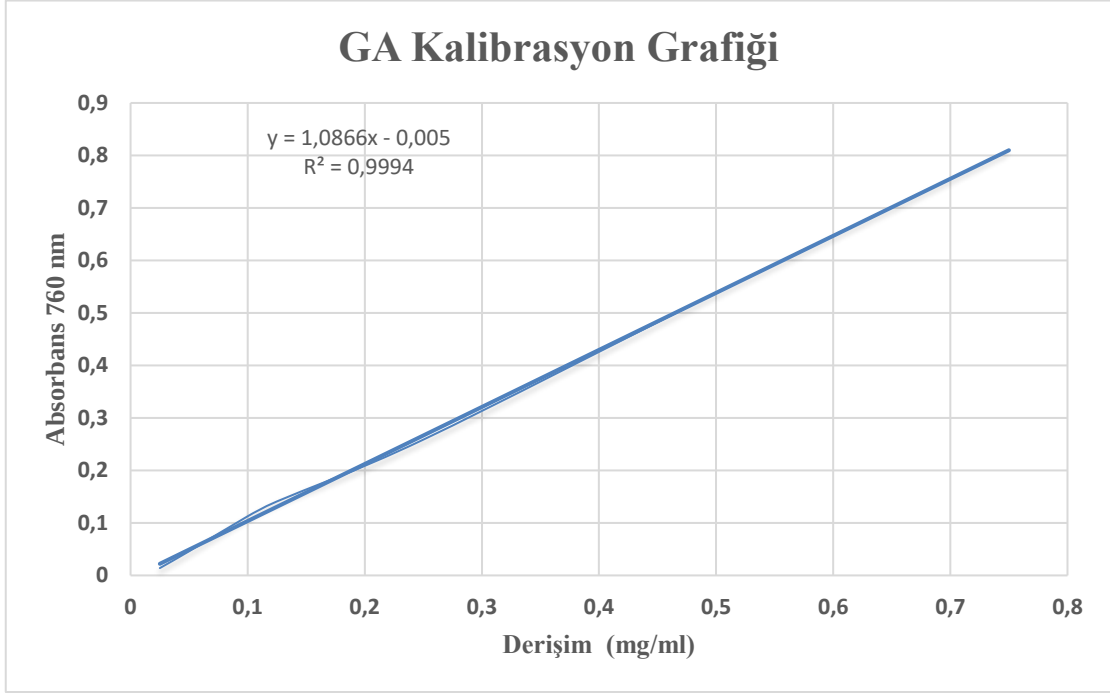
1 gr Na_2CO_3 tartılarak saf su ile 10 ml ye tamamlandı.

0.5N folin reaktifi hazırlanması:

5 ml folin reaktifi stok çözeltisinden alınarak saf su ile 20 mL'ye tamamlandı.

Gallik asit kullanarak standart grafik oluşturmak amacı ile farklı derişimlerde hazırlanan gallik asit çözeltilerinden 100'er μL alınarak boş deney tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 4.5 ml saf su ile hacimleri 4.6 ml'ye tamamlandı. Aynı işlem paralel olarak da 10 mg/ml konsantrasyonda metanol ile hazırlanan ekstrakt çözeltileri içinde tekrarlanarak toplam hacimleri 4.6 ml'ye tamamlandı. Gallik asit çözeltilerine ve ekstraktlara 100 er μL Folin reaktifi eklendi ve en son olarak bütün deney tüplerine 300 μL Sodyum karbonat (Na_2CO_3) eklenerek toplam hacim 5 ml'ye tamamlandı. 30 dk beklendikten sonra 760 nm'de spektrofotometre yardımıyla absorbansları okundu. Liken ekstraktlarına eş değer miktarda GA standartını belirlemek amacıyla elde edilen absorbanslar kullanılarak kalibrasyon grafiğı oluşturuldu (Singleton ve ark., 1999).

Çizelge 3.2.10 Folin cioalteu yöntemi ile belirlenen gallik asit (GA) standartları kalibrasyon eğrisi



3.2.11 DPPH yöntemi ile antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

DPPH giderme aktivitesi Blois (1958) metoduna göre tayin edilmiştir. Organik solventlerle hazırlanan liken ekstraktları 10 mg/mL derişimde, standart olarak kullanılan α - tokoferol ise 1 mg/ml derişimde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Numuler, stok çözeltiden 40 μ l, 80 μ l, 100 μ l, 200 μ l ve 300 μ l çalışılırken; Standart 10 μ l, 20 μ l, 40 μ l, 80 μ l ve 120 μ l hacimlerde çalışılmıştır. Numuneler ve standarttan belirtilen hacimlerde çözeltiler alınarak son hacmi 3 ml olacak şekilde metanol ile tamamlanmıştır. Üzerlerine 1 ml 0.26 mM DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) radikalinden 1 ml eklenerek toplam hacim 4 ml ye tamamlanmıştır. Numuneler ve standart 30 dk boyunca karanlık bir ortamda bekletildikten sonra UV-VİS spektrofotometre kullanılarak 517 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbans verileri kullanılarak % inhibisyon grafiği oluşturulmuş oluşturulan grafiğin eğim denklemi kullanılarak da IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

4.1.1 Antibakteriyel aktivite

Yapılan çalışmalarda likenlerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenebilmesi için ilk olarak agar disk difüzyon testi yapılmıştır. Agar disk difüzyon testinde etkili olan numune örneklerinin minimal inhibisyon değerlerinin (MİK) belirlenebilmesi amacıyla Broth macro dilüsyon tekniği ile çalışılmıştır. Çizelge de bulunan kısaltmalar Liken 1 örneği için *Usnea filipendula*, Liken 2 örneği için ise “*Evernia prunastri*” türlerini yansıtmaktadır.

Disk difüzyon ve Broth makro dilüsyon testlerinde negatif kontrol olarak kullanılan aseton, metanol ve etanol organik solventleri antibakteriyel etkileri birbirlerine oldukça yakın ve pozitif kontrollere ve liken ekstraktlarına göre oldukça düşük etki göstermiştir

4.1.2 Agar disk difüzyon yöntemiyle antibakteriyel aktivite

Usnea filipendula (Liken 1) ve *Evernia prunastri* (Liken 2) likenlerine ait tampon çözeltilerle hazırlanan su ekstraktları ile yapılan disk difüzyon testinde, kullanılan bakteri türleri arasında hiçbirinde inhibisyon çapına rastlanmamıştır. Test edilen bakteri türleri arasında tampon çözeltiler ile hazırlanan su ekstraktının, kullanılan bakteri türlerinde antibakteriyel etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir.

Organik solventlerle hazırlanan liken ekstraktlarının her iki liken türü için de yapılan çalışmalarda kullanılan bakteri türlerinin tamamında farklı oranlarda inhibisyon çapları tespit edilmiştir.

Usnea filipendula (Liken 1) ve *Evernia prunastri* (Liken 2) likenlerine ait organik solvent ekstraktlarının disk difüzyon yönteminde en yüksek antibakteriyel etkiye *Usnea filipendula*’nın Aseton ekstresinin (18 mm) inhibisyon çapı ile *Streptococcus pyogenes* üzerinde tespit edilirken; *Evernia prunastri*’nin Aseton ekstresinin (20 mm) inhibisyon çapı ile *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella enteritidis* bakteri türlerinde tespit edilmiştir.

Usnea filipendula (Liken 1) ve *Evernia prunastri* (liken 2) likenlerine ait organik solvent ekstraktlarının disk difüzyon yönteminde en düşük antibakteriyel etkiye *Usnea filipendula*’nın metanol ekstresinin (10 mm) inhibisyon çapı ile *Streptococcus pyogenes* üzerinde; etanol ekstresinin (10 mm) inhibisyon çapı ile *Enterococcus faecalis* ve *Escherichia coli* üzerinde tespit edilirken; *Evernia prunastri*’nin metanol ekstresinin (9 mm) inhibisyon çapı ile *Escherichia coli* bakteri türü üzerinde tespit edilmiştir.

Disk difüzyon deneyinde kullanılan mukayese antibiyotiklerden sadece gentamisin, liken türlerinin aseton ekstraktlarının inhibisyon çaplarına yaklaşık değer verirken, streptomisin ve imipenem antibiyotikleri, liken ekstraktlarından yüksek inhibisyon

Çapları göstermiştir. Genel olarak, çalışılan bakteri türleri üzerinde mukayese antibiyotikler ve test örneklerinin antibakteriyel etkilerinin sıralaması yapılırsa: Liken rneklerinin aseton ekstraktları<Gentamisin<Streptomisin<İmipenem olarak sıralanmaktadır.

Tablo 4.1.1 Disk difüzyon yöntemiyle elde edilen bakteriyel inhibisyon çaplar

Çalışmada kullanılan bakteriler	İnhibisyon zonları (mm)					
	Li-1 (AS)	Li-1 (ET)	Li-1 (MET)	Li-2 (AS)	Li-2 (ET)	Li-2 (MET)
HPB-35 <i>Bacillus cereus</i> (DSMZ: 4312)	14	12	12	17	12	12
HPB-41: <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC:7)	18	12	10	18	12	12
HPB-71: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC: 29133728)	14	11	11	20	11	11
HPB-96: <i>Acinetobacter baumannii</i>	17	14	14	17	13	14
HPB-125: <i>Salmonella enteritidis</i>	17	13	12	20	13	12
HPB-130: <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC:25923)	17	11	11	18	11	11
HPB-132: <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC:29212)	17	10	12	15	11	14
HPB-137: <i>Escherichia coli</i> (ATCC: 25922)	14	10	12	18	10	9

Li-1: *Usnea flipendula*, Li-2: *Evernia prunastri*, (AS): Aseton zt, (ET): Etanol zt

(MET): Metanol zt

* Rakamlar inhibisyon çaplarını göstermektedir her disk 6 mm çapındadır.

Tablo 4.1.2. Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin inhibisyon çapları

Çalışmada kullanılan bakteriler	İnhibisyon zonları (mm)					
	CN (10 µg)	S (10 µg)	IMP (10 µg)	AS	ET	MET
HPB-35: <i>Bacillus cereus</i> (DSMZ: 4312)	18	22	34	—	—	—
HPB-41: <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC:7)	D	20	38			
HPB-71: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC: 29133728)	18	20	33	7	7	7
HPB-96: <i>Acinetobacter baumannii</i>	17	22	35	7	7	7
HPB-125: <i>Salmonella enteritidis</i>	18	20	37	—	8	8
HPB-130: <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC:25923)	18	20	35	7	8	7
HPB-132: <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC:29212)	17	22	35	8	8	—
HPB-137: <i>Escherichia coli</i> (ATCC: 25922)	18	23	36	8	—	10

AS: Negatif kontrol aseton, ET: Negatif kontrol etanol, MET: Negatif kontrol metanol

CN: Gentamisin 10 µg S: Streptomisin 10 µg IMP: Imipenem 10 µg

(—): Üreme gözlemlenmedi

D: Denenmedi

4.1.3 Minimal inhibisyon değeri (MİK)

Usnea filipendula (Liken 1) ve *Evernia prunastri* (Liken 2) likenlerine ait organik solvent ekstraktlarının broth makro dilüsyon yönteminde en düşük numune konsantrasyonu olan minimal inhibisyon değeri *Usnea filipendula*'nın aseton ekstresinin 1,95 (µg/ml) numune konsantrasyonu ile *Acinetobacte boumannii* belirlenirken; *Evernia prunastri* için aseton ekstresinin 1,95 (µg/ml) numune konsantrasyonu ile *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri türleri üzerinde tespit edilmiştir. *Usnea filipendula* (Liken 1) ve *Evernia prunastri* (Liken 2) likenlerine ait organik solvent ekstraktlarının broth makro dilüsyon yönteminde en yüksek numune konsantrasyonu olan minimal inhibisyon değeri *Usnea filipendula* ve *Evernia prunastri* türlerinin genel olarak Metanol ekstrelerinin 62.5 (µg/ml) numune konsantrasyonu ile *Bacillus cereus*, *pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* bakteri türleri üzerinde tespit edilmiştir.

Minimal inhibisyon deneyinde kullanılan mukayese antibiyotiklerden Penisilin- G ve sefoperazon/sulbaktam antibiyotikleri bakteriler üzerinde yaklaşık dozajlarda MİK değerleri belirlenirken. Sadece *Bacillus cereus* ve *Salmonella enteritidis* üzerinde penisilin G sefoperazon/sulbaktama göre oldukça düşük etki göstermektedir.

Çalışmada kullanılan negatif kontroller olan organik solventlerin antibakteriyel etkileri bütün bakteri türleri için yaklaşık konsantrasyonda etki gösterip maksimum 125 µl/ml oranında minimum inhibisyon konsantrasyonu tespit edilmiştir.

Tablo 4.1.3 HPB:35 *Bacillus cereus*'a göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri

HPB:35 <i>Bacillus cereus</i> (DSMZ:4312)		
Çalışmada kullanılan liken türleri	DİSK DİFÜZYON SONUÇLARI (mm)	MİK DEĞERİ (µg/ml)
Liken 1: Etanol	12	31,25
Liken 1: Aseton	14	31,25
Liken 1: Metanol	12	62,5
Liken 2: Etanol	12	31,25
Liken 2: Aseton	17	15,6
Liken 2: Metanol	12	62,5
İmipenem	34	—
Streptomisin	22	—
Gentamisin	18	—
Penisilin- G	—	125
Sefoperazon Sulbaktam	—	0,9
N.K Metanol	N/A	250
N.K Etanol	N/A	250
N.K Aseton	N/A	250

(—): Test edilmedi, N/A: Yanıt yok

N.K: Negatif Kontrol

* Negatif kontrol olan organik solventler 1:1 oranda (µl/ml) seri dilüsyonlarda çalışılmıştır

Tablo 4.1.4 HPB-41: *Streptococcus pyogenes* (ATCC:7) göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri

HPB-41: <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC:7)		
ÇÖZÜCÜSÜNE GÖRE LİKEN EKSTRAKTLARI	DİSK DİFÜZYON SONUÇLARI (mm)	MİK (µg/ml)
Liken 1: Etanol	12	31,25
Liken 1: Aseton	18	3,90
Liken 1: Metanol	10	31,25
Liken 2: Etanol	12	15,6
Liken 2: Aseton	18	7,81
Liken 2: Metanol	12	31,25
İmipenem	38	—
Streptomisin	20	—
Penisilin- G	—	3,2
Sefoperazon Sulbaktam	—	3,9
Metanol	N/A	250
Etanol	N/A	250
Aseton	N/A	250

(—): Test edilmedi, N/A: Yanıt yok N.K: Negatif kontrol

* Negatif kontrol olan organik solventler 1:1 oranda (µl/ml) seri dilüsyonlarda çalışılmıştır

Tablo 4.1.5 HPB-71 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC: 29133728) göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri

HPB-71 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC: 29133728)		
ÇÖZÜCÜSÜNE GÖRE LİKEN EKSTRAKTLARI	DİSK DİFÜZYON SONUÇLARI (mm)	MİK (µg/ml)
Liken 1: Etanol	11	31,25
Liken 1: Aseton	14	7,81
Liken 1: Metanol	11	62,5
Liken 2: Etanol	11	31,25
Liken 2: Aseton	20	1,95
Liken 2: Metanol	11	62,5
İmipenem	33	—
Streptomisin	20	—
Gentamisin	18	—
Penisilin- G	—	0,8
Sefoperazon Sulbaktam	—	1,9
N.K Metanol	7	125
N.K Etanol	7	125
N.K Aseton	7	125

(—): Test edilmedi, N/A: Yanıt yok N.K: Negatif kontrol

* Negatif kontrol olan organik solventler 1:1 oranda (µl/ml) seri dilüsyonlarda çalışılmıştır

Tablo 4.1.6 HPB-96 *Acinetobacter baumannii* göre inhibisyon çap ve MİK değerleri

HPB-96 <i>Acinetobacter baumannii</i>		
ÇÖZÜCÜSÜNE GÖRE LİKEN EKSTRAKTLARI	DİSK DİFÜZYON SONUÇLARI (mm)	MİK (µg/ml)
Liken 1: Etanol	14	15,6
Liken 1: Aseton	17	1,95
Liken 1: Metanol	14	7,81
Liken 2: Etanol	13	31,25
Liken 2: Aseton	17	3,9
Liken 2: Metanol	14	15,6
İmipenem	35	—
Streptomisin	22	—
Gentamisin	17	—
Penisilin- G	—	N/A
Sefoperazon Sulbaktam	—	3,81
N.K Metanol	7	125
N.K Etanol	7	125
N.K Aseton	7	125

(—): Test edilmedi, N/A: Yanıt yok

N.K: Negatif kontrol

* Negatif kontrol olan organik solventler 1:1 oranda (µl/ml) seri dilüsyonlarda çalışılmıştır

Tablo 4.1.7 HPB-125: *Salmonella enteritidis* göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri

HPB-125: <i>Salmonella enteritidis</i>		
ÇÖZÜCÜSÜNE GÖRE LİKEN EKSTRAKT LARI	DİSK DİFÜZYON SONUÇLARI (mm)	MİK (µg/ml)
Liken 1: Etanol	13	15,6
Liken 1: Aseton	17	7,81
Liken 1: Metanol	12	15,6
Liken 2: Etanol	13	15,6
Liken 2: Aseton	20	3,9
Liken 2: Metanol	12	31,25
İmipenem	37	—
Streptomisin	20	—
Gentamisin	18	—
Penisilin- G	—	25,9
Sefoperazon Sulbaktam	—	3,8
N.K Metanol	8	250
N.K Etanol	8	125
N.K Aseton	N/A	125

(—): Test edilmedi, N/A: Yanıt yok N.K: Negatif kontrol

* Negatif kontrol olan organik solventler 1:1 oranda (µl/ml) seri dilüsyonlarda çalışılmıştır

Tablo 4.1.8 HPB-130 *Staphylococcus aureus* (ATCC:25923) göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri

ÇÖZÜCÜSÜNE GÖRE LİKEN EKSTRAKTLARI	DİSK DİFÜZYON SONUÇLARI (mm)	MİK (µg/ml)
Liken 1: Etanol	11	15,6
Liken 1: Aseton	17	3,90
Liken 1: Metanol	11	15,6
Liken 2: Etanol	11	15,6
Liken 2: Aseton	18	1,95
Liken 2: Metanol	11	15,6
İmipenem	35	—
Streptomisin	20	—
Gentamisin	18	—
Penisilin- G	—	N/A
Sefoperazon Sulbaktam	—	7,6
N.K Metanol	7	250
N.K Etanol	7	250
N.K Aseton	7	125

(—): Test edilmedi, N/A: Yanıt yok

N.K: Negatif kontrol

* Negatif kontrol olan organik solventler 1:1 oranda (µl/ml) seri dilüsyonlarda çalışılmıştır

Tablo 4.1.9 HPB-132 *Enterococcus faecalis* (ATCC:29212) göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri

ÇÖZÜCÜSÜNE GÖRE LİKEN EKSTRAKTLARI	DİSK DİFÜZYON SONUÇLARI (mm)	MİK (µg/ml)
Liken 1: Etanol	10	62,5
Liken 1: Aseton	17	3,90
Liken 1: Metanol	12	62,25
Liken 2: Etanol	11	62,25
Liken 2: Aseton	15	15,6
Liken 2: Metanol	14	31,25
İmipenem	35	—
Streptomisin	22	—
Gentamisin	17	—
Penisilin- G	—	12,9
Sefoperazon Sulbaktam	—	7,6
N.K Metanol	N/A	125
N.K Etanol	8	125
N.K Aseton	8	125

(—): Test edilmedi, N/A: Yanıt yok N.K: Negatif kontrol

* Negatif kontrol olan organik solventler 1:1 oranda (µl/ml) seri dilüsyonlarda çalışılmıştır

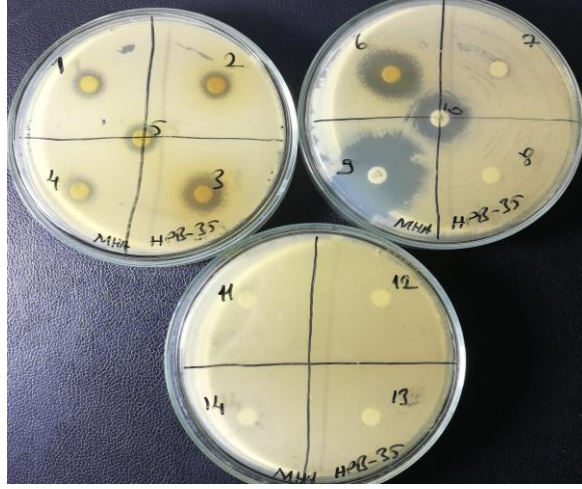
Tablo 4.1.10 HPB-137 *Escherichia coli* (ATCC: 25922) göre inhibisyon çapı ve MİK değerleri

Çözücüsüne Göre Liken Ekstraktları	DİSK DİFÜZYON SONUÇLARI	MİK (µg/ml)
Liken 1: Etanol	10	31,25
Liken 1: Aseton	14	3,90
Liken 1: Metanol	12	31,25
Liken 2: Etanol	10	31,25
Liken 2: Aseton	18	1,95
Liken 2: Metanol	9	62,5
İmipenem	36	—
Streptomisin	23	—
Gentamisin	18	—
Penisilin- G	—	1,6
Sefoperazon Sulbaktam	—	1,9
N.K Metanol	N/A	125
N.K Etanol	N/A	125
N.K Aseton	N/A	125

(—): Test edilmedi, N/A: Yanıt yok

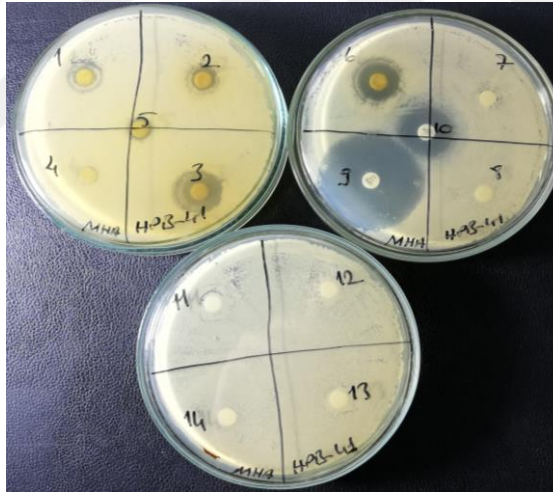
N.K: Negatif kontrol

* Negatif kontrol olan organik solventler 1:1 oranda (µl/ml) seri dilüsyonlarda çalışılmıştır



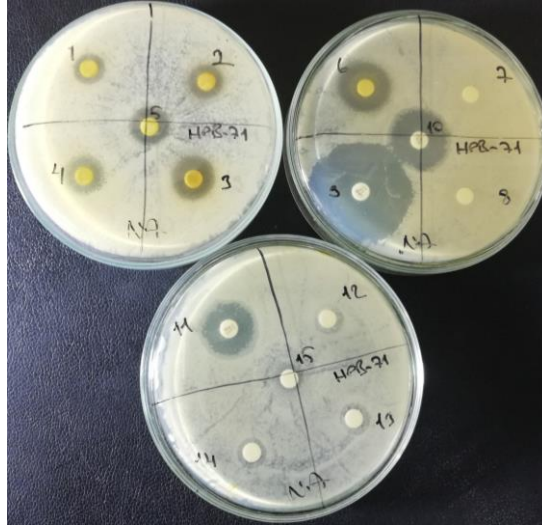
Şekil 4.1.1 HPB:35 *Bacillus cereus*'a ait inhibisyon çap sonuçları

*1: Liken-1-metanol, 2: Liken-1-etanol, 3: Liken-1-aseton 4: Liken-2-metanol, 5: Liken-2-etanol, 6: Liken-2-Aseton 7: Liken-1-Su Ekstrakt 8: Liken-2-su ekstrakt 9: imipenem 10: Streptomisin 11: Negatif Kontrol-metanol 12: Negatif kontrol-etanol 13: Negatif kontrol aseton 14: Negatif kontrol tampon çözelti



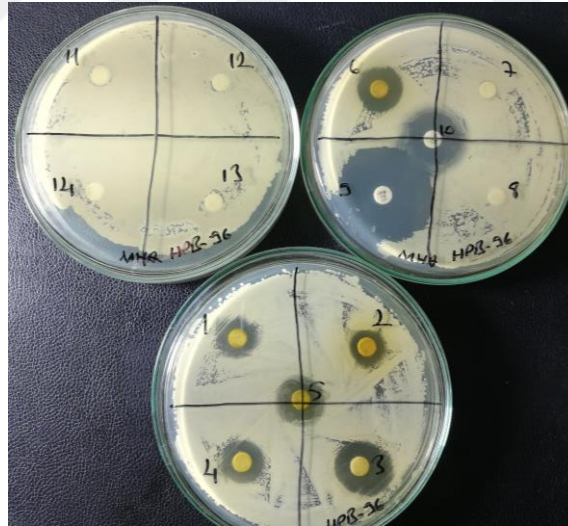
Şekil 4.1.2 HPB-41: *Streptococcus pyogenes* (ATCC:7) ait inhibisyon çap sonuçları

* 1: Liken-1-metanol, 2: Liken-1-etanol, 3: Liken-1-aseton 4: Liken-2-metanol, 5: Liken-2-etanol, 6: Liken-2-Aseton 7: Liken-1-Su Ekstrakt 8: Liken-2-su ekstrakt 9: imipenem 10: Streptomisin 11: Negatif Kontrol-metanol 12: Negatif kontrol-etanol 13: Negatif kontrol aseton 14: Negatif kontrol tampon çözelti



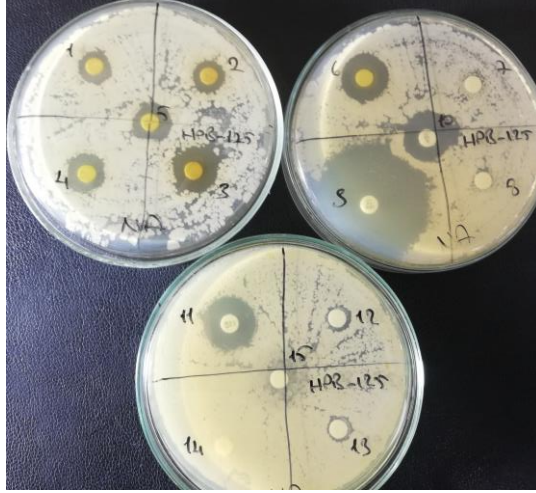
Şekil 4.1.3: HPB-71 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC: 29133728) ait inhibisyon çap sonuçları:

*1: Liken-1-metanol, 2: Liken-1-etanol, 3: Liken-1-aseton 4: Liken-2-metanol, 5: Liken-2-etanol, 6: Liken-2-Aseton 7: Liken-1-Su Ekstrakt 8: Liken-2-su ekstrakt 9: imipenem 10: Streptomisin 11: Gentamisin 12: Negatif Kontrol-metanol 13: Negatif kontrol-etanol 14: Negatif kontrol aseton 15: Negatif kontrol tampon çözelti



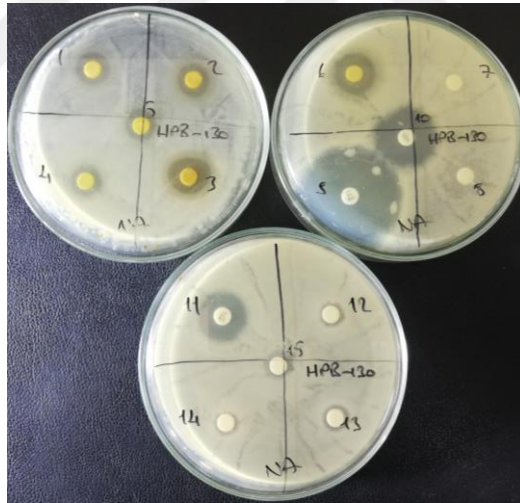
Şekil 4.1.4 HPB-96 *Acinetobacter baumannii* ait inhibisyon çap sonuçları

*1: Liken-1-metanol, 2: Liken-1-etanol, 3: Liken-1-aseton 4: Liken-2-metanol, 5: Liken-2-etanol, 6: Liken-2-Aseton 7: Liken-1-Su Ekstrakt 8: Liken-2-su ekstrakt 9: imipenem 10: Streptomisin 11: Negatif Kontrol-metanol 12: Negatif kontrol-etanol 13: Negatif kontrol aseton 14: Negatif kontrol tampon çözelti



Tablo 4.1.5 HPB-125: *Salmonella enteritidis* ait inhibisyon çapı ve MİC değerleri

* 1: Liken-1-metanol, 2: Liken-1-etanol, 3: Liken-1-aseton 4: Liken-2-metanol, 5: Liken-2-etanol, 6: Liken-2-Aseton 7: Liken-1-Su Ekstrakt 8: Liken-2-su ekstrakt 9: imipenem 10: Streptomisin 11: Gentamisin 12: Negatif Kontrol-metanol 13: Negatif kontrol-etanol 14: Negatif kontrol aseton 15: Negatif kontrol tampon çözelti



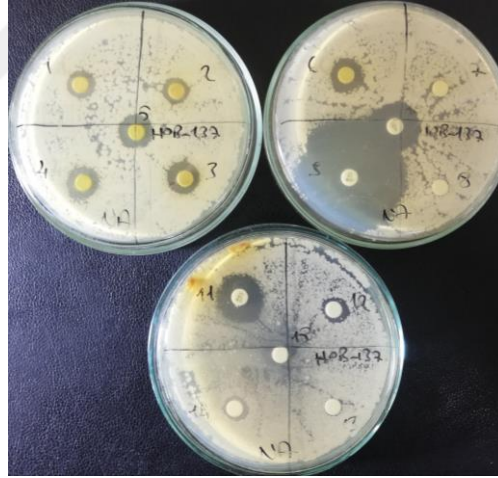
Şekil 4.1.6 HPB-130 *Staphylococcus aureus* (ATCC:25923) ait inhibisyon çap sonuçları

*1: Liken-1-metanol, 2: Liken-1-etanol, 3: Liken-1-aseton 4: Liken-2-metanol, 5: Liken-2-etanol, 6: Liken-2-Aseton 7: Liken-1-Su Ekstrakt 8: Liken-2-su ekstrakt 9: imipenem 10: Streptomisin 11: Gentamisin 12: Negatif Kontrol-metanol 13: Negatif kontrol-etanol 14: Negatif kontrol aseton 15: Negatif kontrol tampon çözelti



Şekil 4.1.7 HPB-132 *Enterococcus faecalis* (ATCC:29212) ait inhibisyon çap sonuçları

*1: Liken-1-metanol, 2: Liken-1-etanol, 3: Liken-1-aseton 4: Liken-2-metanol, 5: Liken-2-etanol, 6: Liken-2-Aseton 7: Liken-1-Su Ekstrakt 8: Liken-2-su ekstrakt 9: imipenem 10: Streptomisin 11: Gentamisin 12: Negatif Kontrol-metanol 13: Negatif kontrol-etanol 14: Negatif kontrol aseton 15: Negatif kontrol tampon çözelti



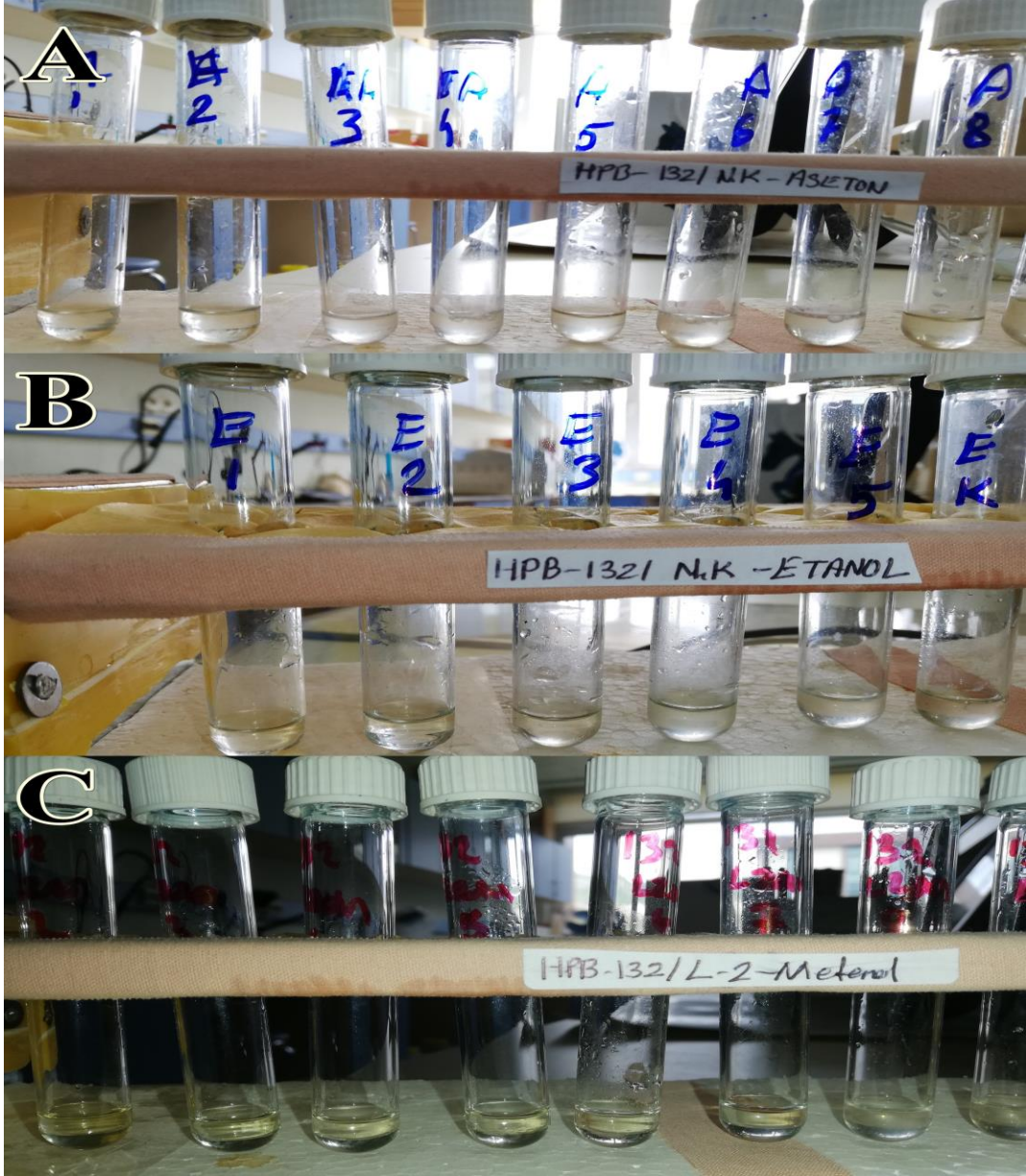
Şekil 4.1.8 HPB-137 *Escherichia coli* (ATCC: 25922) ait inhibisyon çap sonuçları

*1: Liken-1-metanol, 2: Liken-1-etanol, 3: Liken-1-aseton 4: Liken-2-metanol, 5: Liken-2-etanol, 6: Liken-2-Aseton 7: Liken-1-Su Ekstrakt 8: Liken-2-su ekstrakt 9: imipenem 10: Streptomisin 11: Gentamisin 12: Negatif Kontrol-metanol 13: Negatif kontrol-etanol 14: Negatif kontrol aseton 15: Negatif kontrol tampon çözelti



Şekil 4.1.9 HPB:35 *Bacillus cereus* a ait broth makro dilüsyon görüntüsü

*Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (soldan sağa) sıralanmıştır. Sırasıyla A) Pozitif kontrol sefaperzon/sulbaktam antibiyotiğin MİK değeri (10.tüp) B) *Usnea flipendula*’nın metanol ekstraktının MİK değeri (5.tüp) C) *Evernia prunastri*’nin aseton ekstraktının MİK değeri (7.tüp)



Şekil 4.1.10 HPB-132 *Enterococcus faecalis* (ATCC:25923) ait broth makro dilüsyon görüntüsü

*Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (soldan sağa) sıralanmıştır. Sırasıyla A) Negatif kontrol asetonun MİK değeri (2.tüp) B) Negatif kontrol etanolün MİK değeri (3.tüp) C) *Evernia prunastri*'nin (Liken-2) metanol ekstraktının MİK değeri (6.tüp)

4.1.4 Likenlerin antifungal özellikleri

Likenlerin, organik solventlerle (metanol, etanol,aseton) özütleri ve tampon çözelti kullanılarak elde edilen su ekstraktı agar disk difüzyon yöntemi ile *Venturia inaequalis* (Elma kara lekesi), *Phoma tracheiphila*, *Fusarium oxysporum*, *Didymella lycopersici* (domates kanseri), *Colletotrichum coccodes*, *Aspergillus niger*, *Sclerotonia sclerotiorum*, *Alternaria alternata* bitki patojenleri üzerinde test edilmiştir. Aynı zamanda organik solventler ve tampon çözelti negatif kontrol olarak test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak Nistatin (OXOİD) ve toz haldeki flukonazole antifungalları kullanılarak liken ekstraktları ile inhibisyon çaplarının kıyaslanması amaçlanmıştır. Çalışma üç tekrarlı yürütülerek oluşan inhibisyon çapları milimetrik cetvel ile ölçülerek sonuçların aritmetik ortalaması alınmıştır.

Tampon çözelti kullanılarak likenlerden elde edilen tampon çözelti ekstraktının, 20 µl hacmi doğrudan test edilmiş, çalışmamızda kullanılan bitki patojenleri üzerinde herhangi bir inhibisyon çapına rastlanmamıştır.

Çalışmamızda kullanılan Negatif kontrol grupları olan organik solventlerin ve tampon çözeltinin 20 µl'lik hacimleri deneyde kullanılan bütün bitki patojeni funguslar üzerinde inhibisyon çapı oluşturmamıştır. Negatif kontrollerin antifungal aktivitesi tespit edilememiştir. Organik solventler ile yapılan ekstraktlarda sadece *Alternaria alternata* patojeni üzerinde inhibisyon çapına rastlanmamıştır.

Usnea flipendula'nın 20 µl aseton özütü, *Venturia inaequalis* (elma karalekesi) fungusu üzerinde 11 mm lik inhibisyon çapı ile en yüksek antifungal aktivite göstermiştir.

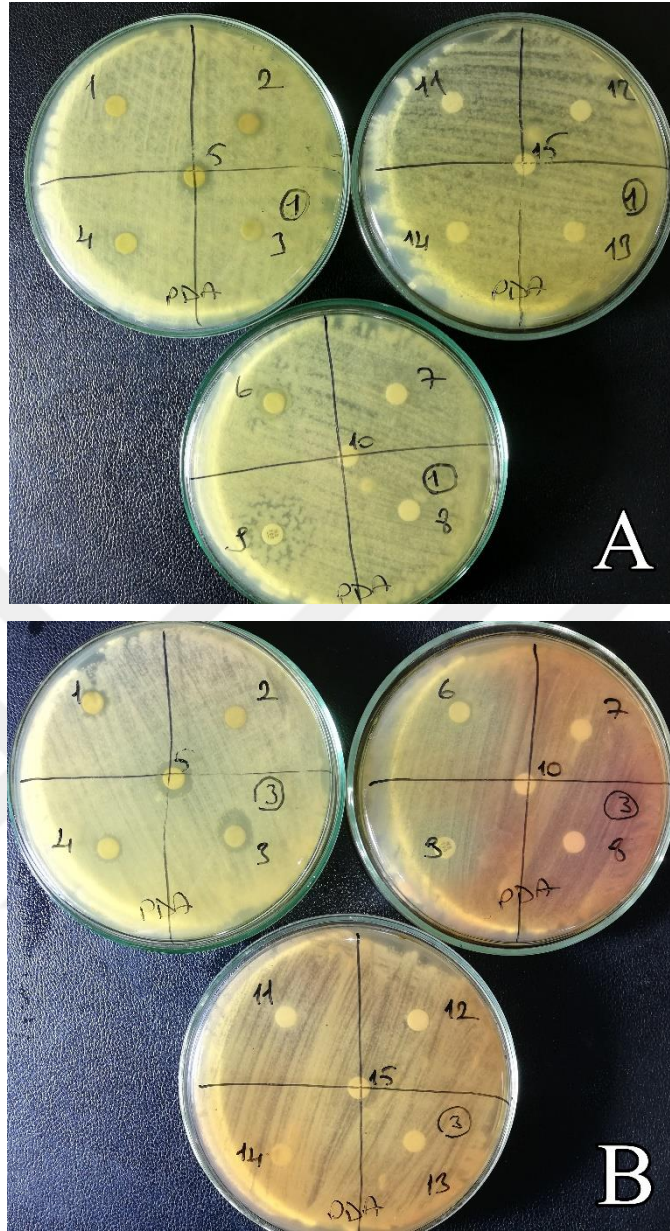
Evernia prunastri'nin 20 µl etanol özütü, *Fusarium oxysporum*, fungusu üzerinde 13 mm lik inhibisyon çapı ile en yüksek antifungal aktivite göstermiştir.

Pozitif kontrol olarak kullanılan hazır antifungal diskin Nystatine (OXOİD) 100 µg lık konsantrasyonu *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum coccodes* hariç diğer bütün patojenlerde belirli oranlarda inhibisyon zonu oluşturmuştur. Nystatin için en yüksek antifungal aktivite (41 mm) inhibisyon çapı ile *Alternaria alternata* üzerinde tespit edilmiştir.

Tablo 4.1.4 Liken türlerinin ve kullanılan ekstraksiyon çözeltilerinin funguslar üzerindeki inhibisyon değerleri

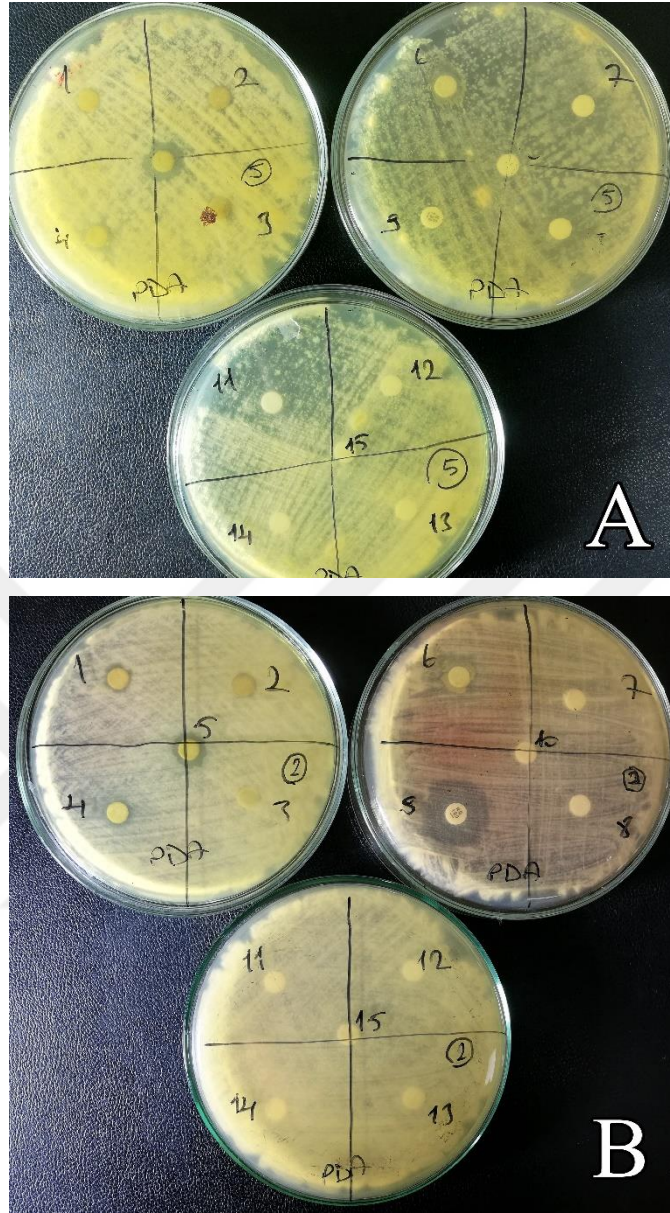
Liken özütleri	İnhibisyon çapı (mm)							
	<i>Venturia inequalis</i> (Elma kara lekesi)	<i>Phoma tracheiphila</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Didymella lycopersici</i> (domates kanseri)	<i>Colletotrichum</i> <i>coccodes</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Sclerotonia</i> <i>sclerotiorum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
Liken 1: Etanol	—	7	—	—	—	—	—	—
Liken 1: Aseton	11	—	—	—	—	—	—	—
Liken 1: Metanol	9	—	—	8	—	—	—	—
Liken 2: Etanol	12	—	13	10	10	—	11	—
Liken 2: Aseton	8	7	—	—	—	8	—	—
Liken 2: Metanol	7	—	—	7	8	—	—	—
Liken 1- Buffer Ekstrakt	—	—	—	—	—	—	—	—
Liken 2 – Buffer Ekstrakt	—	—	—	—	—	—	—	—
Nystatine	18	—	—	20	—	28	22	41
Fluconazole (20 µl)	—	—	—	—	—	24	—	—
Fluconazole (40 µl)	—	—	—	—	—	28	—	—
N.K Metanol	—	—	—	—	—	—	—	—
N.K Etanol	—	—	—	—	—	—	—	—
N.K Aseton	—	—	—	—	—	—	—	—

Liken 1: *Usnea flipendula*, Liken 2: *Evernia prunastri* N.K: Negatif Kontrol (-): üreme gözlemlenemedi



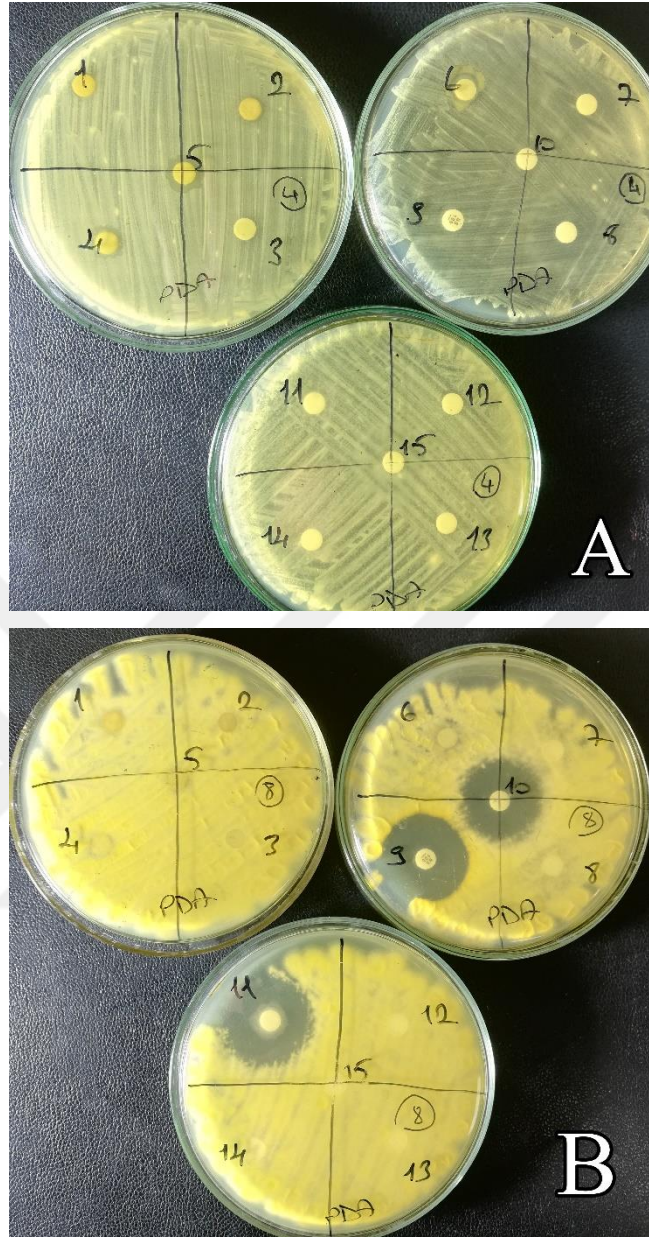
Şekil 4.1.11 A) *Phoma tracheiphila* B) *Venturia inaequalis* (Elma kara lekesi) ait inhibisyon zonları

* 1) *Usnea flipendula* metanol ekstraktı 2) *Usnea flipendula* etanol ekstraktı 3) *Usnea flipendula* aseton ekstraktı 4) *Evernia prunastri* metanol ekstraktı 5) *Evernia prunastri* etanol ekstraktı 6) *Evernia prunastri* aseton ekstraktı 7) *Usnea flipendula* su ekstraktı 8) *Evernia prunastri* su ekstraktı 9) pozitif kontrol Nistatin 10 Flukonazol 20 µl 11) Flukonazol 40 µl 12) Negatif kontrol etanol 13) Negatif kontrol metanol 14) Negatif kontrol aseton 15) Negatif kontrol tampon çözelti



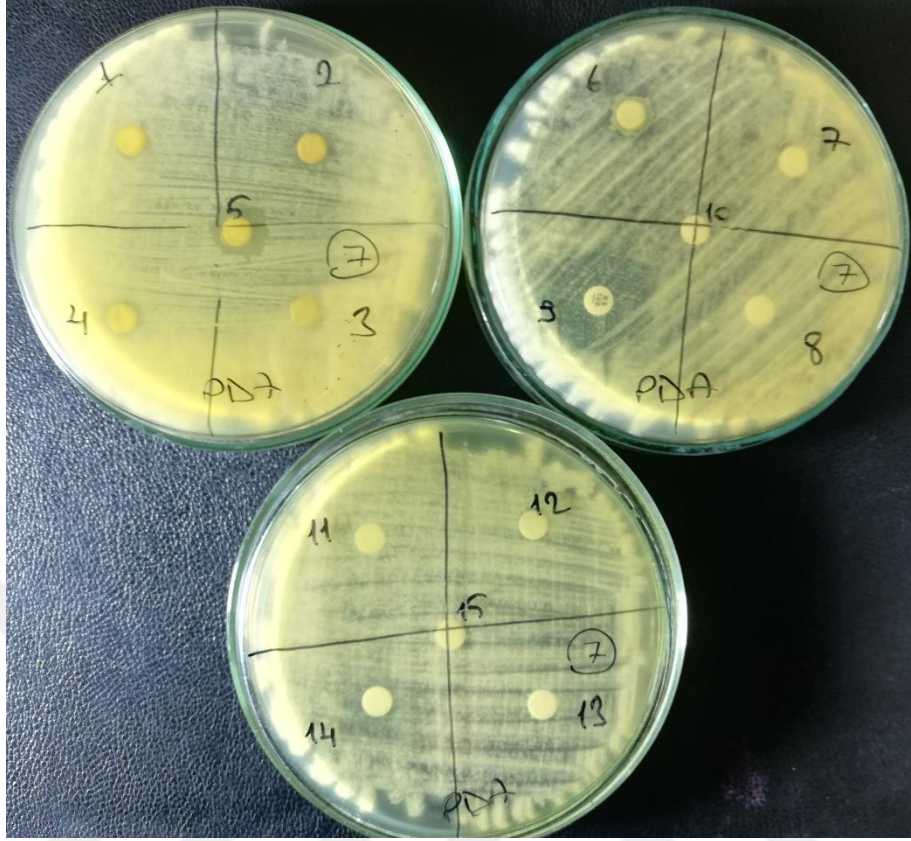
Şekil 4.1.12 A) *Fusarium oxysporum* B) *Didymella lycopersici* (domates kanseri) ait inhibisyon zonları

* 1) *Usnea flipendula* metanol ekstraktı 2) *Usnea flipendula* etanol ekstraktı 3) *Usnea flipendula* aseton ekstraktı 4) *Evernia prunastri* metanol ekstraktı 5) *Evernia prunastri* etanol ekstraktı 6) *Evernia prunastri* aseton ekstraktı 7) *Usnea flipendula* su ekstraktı 8) *Evernia prunastri* su ekstraktı 9) pozitif kontrol Nistatin 10) Flukonazol 20 µl 11) Flukonazol 40 µl 12) Negatif kontrol etanol 13) Negatif kontrol metanol 14) Negatif kontrol aseton 15) Negatif kontrol tampon çözelti



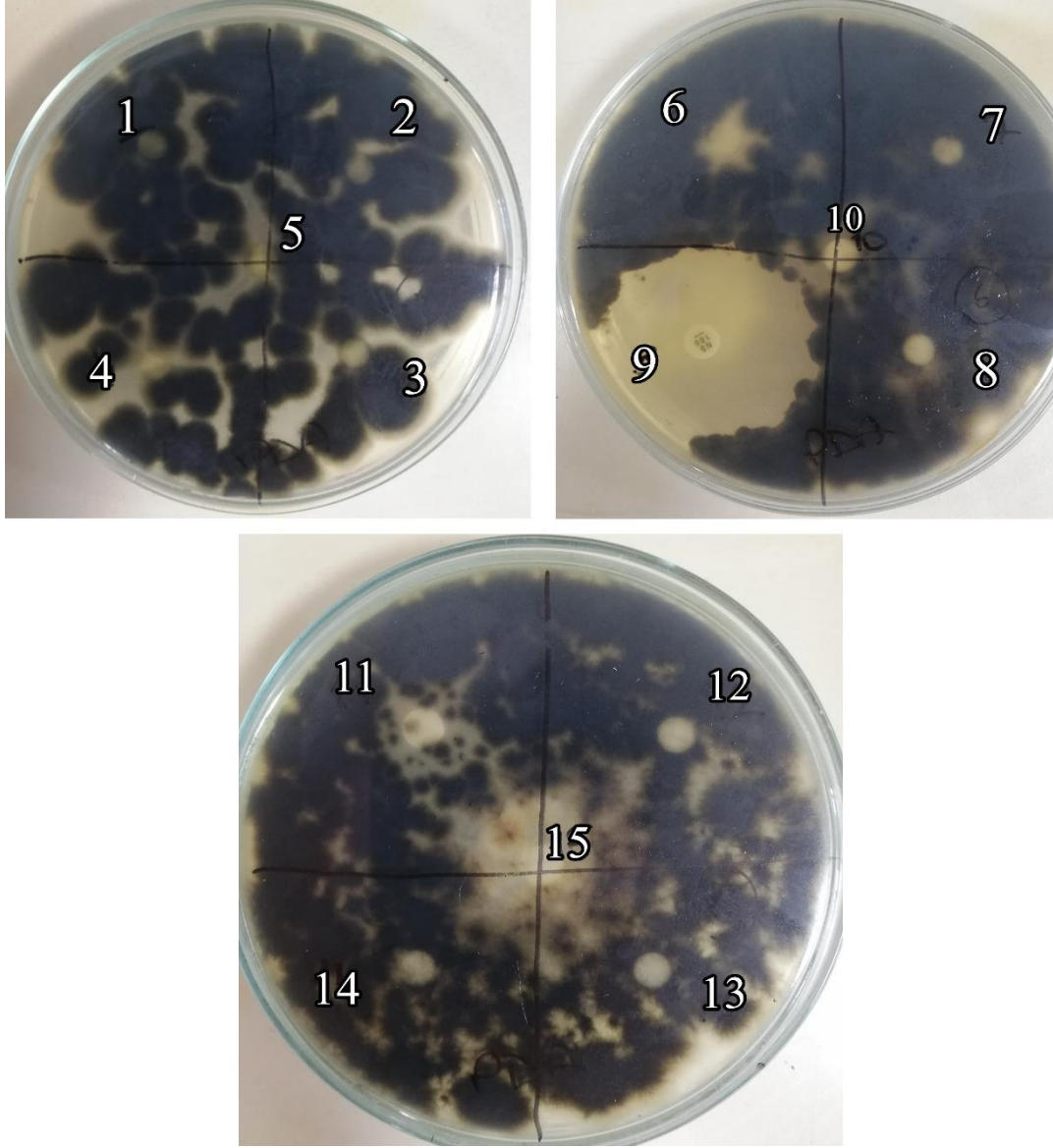
Şekil 4.1.13 A) *Colletotrichum coccodes* B) *Aspergillus niger* ait inhibisyon zonları

* 1) *Usnea flipendula* metanol ekstraktı 2) *Usnea flipendula* etanol ekstraktı 3) *Usnea flipendula* aseton ekstraktı 4) *Evernia prunastri* metanol ekstraktı 5) *Evernia prunastri* etanol ekstraktı 6) *Evernia prunastri* aseton ekstraktı 7) *Usnea flipendula* su ekstraktı 8) *Evernia prunastri* su ekstraktı 9) pozitif kontrol Nistatin 10 Flukonazol 20 µl 11) Flukonazol 40 µl 12) Negatif kontrol etanol 13) Negatif kontrol metanol 14) Negatif kontrol aseton 15) Negatif kontrol tampon çözelti



Şekil 4.1.14 Liken ekstraktlarının *Sclerotinia sclerotiorum* üzerindeki antifungal aktiviteleri

* 1) *Usnea flipendula* metanol ekstraktı 2) *Usnea flipendula* etanol ekstraktı 3) *Usnea flipendula* aseton ekstraktı 4) *Evernia prunastri* metanol ekstraktı 5) *Evernia prunastri* etanol ekstraktı 6) *Evernia prunastri* aseton ekstraktı 7) *Usnea flipendula* su ekstraktı 8) *Evernia prunastri* su ekstraktı 9) pozitif kontrol Nistatin 10) Flukonazol 20 µl 11) Flukonazol 40 µl 12) Negatif kontrol etanol 13) Negatif kontrol metanol 14) Negatif kontrol aseton 15) Negatif kontrol tampon çözelti



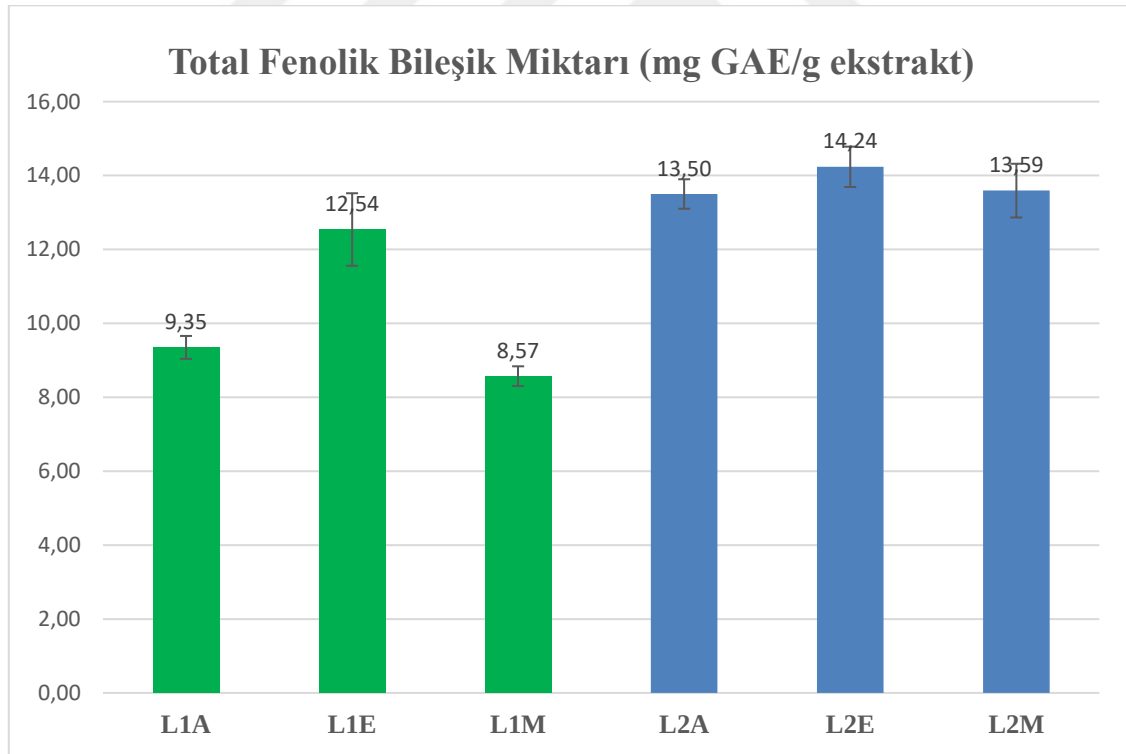
Şekil 4.1.15 Liken ekstraktlarının *Alternaria alternata* üzerindeki antifungal aktiviteleri

* 1) *Usnea flipendula* metanol ekstraktı 2) *Usnea flipendula* etanol ekstraktı 3) *Usnea flipendula* aseton ekstraktı 4) *Evernia prunastri* metanol ekstraktı 5) *Evernia prunastri* etanol ekstraktı 6) *Evernia prunastri* aseton ekstraktı 7) *Usnea flipendula* su ekstraktı 8) *Evernia prunastri* su ekstraktı 9) pozitif kontrol Nistatin 10 Flukonazol 20 µl 11) Flukonazol 40 µl 12) Negatif kontrol etanol 13) Negatif kontrol metanol 14) Negatif kontrol aseton 15) Negatif kontrol tampon çözelti

4.1.5 Toplam fenolik madde tayini

Antioksidan çalışmalarından önce sıklıkla kullanılan toplam fenolik madde tayini çalışmaları, antioksidan madde içeriğinin belirlenmesinde tamamlayıcı deney yöntemi olarak görülmektedir. Çünkü fenolik bileşiklerin doğal yapıları gereği antioksidanların temel kaynağı olmaktadır. Çalışmamızda toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesinde popüler bir yöntem olan Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak liken ekstraktlarının toplam fenolik madde kapastesi Gallik aside eş değer olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik madde tayinlerinde gallik aside eş değer miktarda fenolik bileşiğin ifade edilmesinin nedeni bir numune içerisindeki fenoliklerin, folin reaktifi ile reaksiyona girmesi ile elde edilen sonucun tam olarak olmayıp sadece yaklaşık değeri vermesinden kaynaklanmaktadır. Fakat gallik asit kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçlarının evrensel literatürde değişmediği için gallik asitin toplam fenolik içeriği kesin değer olarak kabul edilmiştir. Bu sayede numuneler test edilirken gallik aside eş değer miktarda fenolik madde içeriği kıyaslaması yapılmaktadır (Badea ve ark., 2019).

Çizelge 4.1.5 Farklı çözücüler ile elde edilen liken ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğinin gallik aside eş değer miktarları.



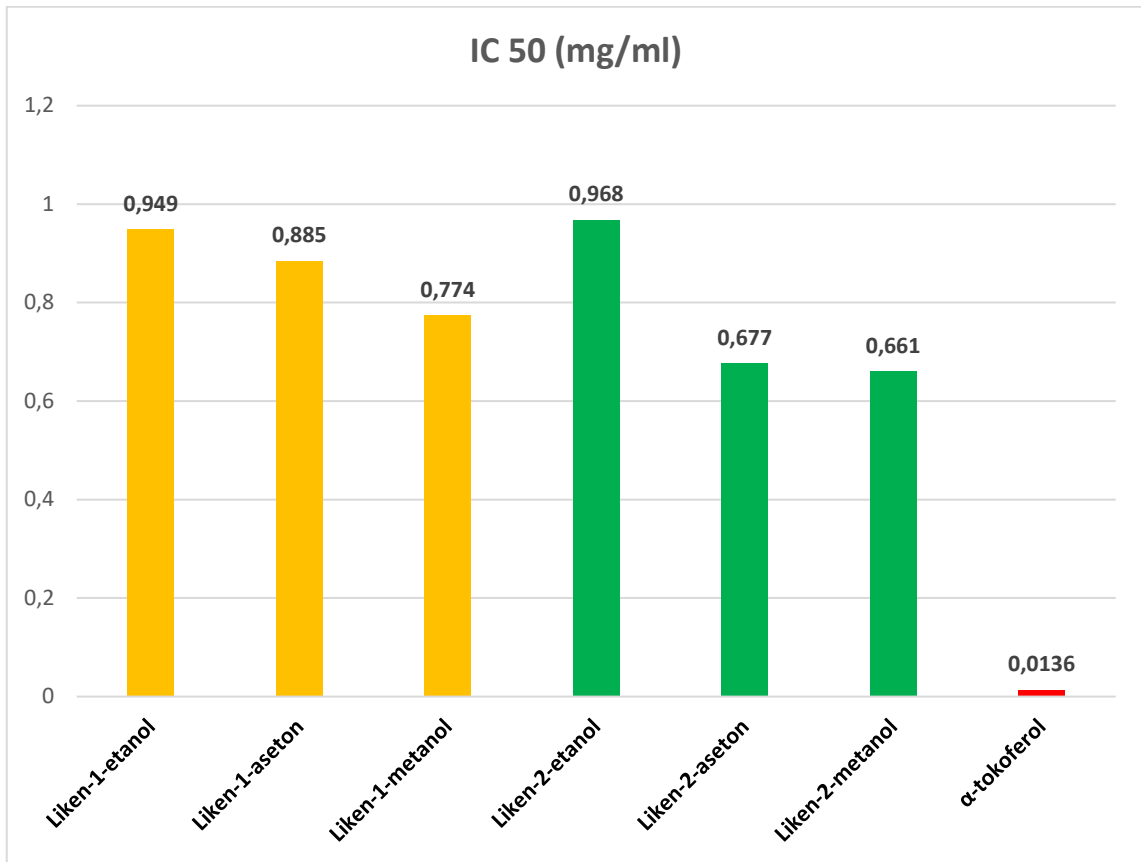
L1M: *Usnea flipendula* metanol ekstraktı, L1E: *Usnea flipendula* etanol ekstraktı,
L1A: *Usnea flipendula* aseton ekstraktı,
L2M: *Evernia prunastri* metanol ekstraktı,
L2E: *Evernia prunastri* etanol ekstraktı,
L2A: *Evernia prunastri* aseton ekstraktı

4.1.6 Antioksidan aktivite

Evernia prunastri ve *Usnea flipendula* liken türlerinin organik solvent ekstraktlarının antioksidan içerik tayini DPPH yöntemi ile blois (1958) metoduna göre yapılmıştır. DPPH reaktifi organik solvenler ile hazırlanan ekstraktlar ile muamele edilerek spektrofotometrede 517 nm’ de ölçümü yapılmıştır. Deneyin amacı DPPH reaktifinin çözelti içerisindeki olası hidrojen verici bir antioksidan kaynağı ile tepkimeye girerek indirgenme temeline dayanmaktadır. Ortamda antioksidan kaynağı bulunması durumunda DPPH reaktifi rengi (koyu mor)’dan antioksidan içeriği test edilecek numune konsantrasyonu artışına paralel olarak açılarak daha açık renkli (açık sarı) bir görüntü oluşturmaktadır. Bu durum analiz edilecek madde içerisinde bulunan antioksidan indirgenme gücüne bağlı olarak stabil halde bulunan bir nitrojen radikali olan DPPH reaktifinin, antioksidan kaynağı tarafından DPPH üzerine proton temini ile DPPH-H formuna dönüştürerek serbest radikallerin giderilmesine olanak sağlamaktadır.

Organik solventlerle elde edilen liken ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde, antioksidan indirgenme gücünün referans oluşturması amacıyla antioksidan kapasitesi bilinen yapay standart antioksidanlar kullanılmıştır., α -tokoferol çeşitli konsantrasyonları ile test edilen liken numunelerinin farklı konsantrasyonlarıyla, ilk aşamada DPPH radikalinin oluşturduğu % indirgenme gücü belirlenmiştir. % indirgenme gücü bir antioksidan kaynağının DPPH reaktifi ile tepkimeye girmesiyle test edilen konsantrasyonun ne kadarının reaktif üzerinde indirgeme kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Oluşturulan % indirgenme gücü grafiğinin eğim denklemi kullanılarak da IC_{50} değeri belirlenmektedir. IC_{50} değeri DPPH’ radikalinin %50 sini temizlemek için gereken ekstrakt konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) olarak tanımlanmaktadır. Bu değer düşük olması test maddesinin düşük konsantrasyonlarında bile antioksidan indirgenme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Farklı bir ifadeyle numune örneğinin daha düşük konsantrasyonlarda bile radikalın %50’sini temizleme yeteneğine sahip olduğu söylene bilinir (Yavuz, 2019).

Çizelge 4.1.6 Liken ekstraktları ve standart antioksidanların IC₅₀ değerleri



Liken-1 metanol: *Usnea flipendula* metanol ekstraktı,

Liken-1-etanol: *Usnea flipendula* etanol ekstraktı,

Liken-1-aseton: *Usnea flipendula* aseton ekstraktı,

Liken-2-metanol: *Evernia prunastri* metanol ekstraktı,

Liken-2-etanol: *Evernia prunastri* etanol ekstraktı,

Liken-2-aseton: *Evernia prunastri* aseton ekstraktı

*Liken örnekleri 10 mg/ml ve standart olan a-tokoferol 1 mg/ml konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır.

4.2 Tartışma

Geçmişten günümüze likenler ile ilgili yapılan biyoaktivite çalışmaları incelendiğinde liken metabolitlerinin antimikrobiyal özellikleri oldukça popüler bir araştırma konusu olmuştur. Metabolitlerin içerdikleri yüksek antimikrobiyal etkileri nedeniyle araştırmacılar farklı liken türleri ile çalışarak antibiyotik ve antifungal etkilerini incelemişlerdir.

Yapılan bu çalışmada likenlerin farklı çözücüler ile ekstraksiyonu sağlanarak antibakteriyel ve antifungal etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızın ana teması antimikrobiyal etki olurken günümüzde popülerleşen antioksidanlar ve fenolik içerikleri katkı sağlayacağı düşünülmüştür. Kısaca çalışmamızı iki ana başlığa ayırmak gerekirse antimikrobiyal etki çalışmaları ve antioksidan kapasite çalışmalarından oluşmaktadır.

Çalışmamızın ilk bölümü olan antimikrobiyal çalışmalarından, antibakteriyel çalışmaları iki farklı metod üzerinden çalışılmıştır. İlk olarak Kirby Bauer disk difüzyon metodu olarak da adlandırılan agar disk difüzyon yöntemi ile elde ettiğimiz ekstraktın antimikrobiyal etkileri mukayese standart antibakteriyeller ile karşılaştırılarak bir ön bilgiye ulaşılmıştır. Katı agar üzerinde antimikrobiyal etkileri belirlendikten sonra sıvı besiyerin de bakterilerin minimum inhibisyon değerleri, antibakteriyel maddenin katlı seri dilüsyonları yapılarak belirlenmiştir. MİK değerleri makro dilüsyon yönteminde manuel çalışıldığı için + ve – ikişer katlı konsantrasyon hata payı olarak kabul edilmektedir.

Çalışmamızda kullanılan organik solventler arasında aseton ekstraktının etanol ve metanol ekstraktına göre daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sökmen ve ark., (2012) yılında yaptığı çalışmada Giresun bölgesinden topladığı *Pseudevernia furfuracea* (L.) ve *Evernia prunastri* likenlerinin aseton ekstraktlarının *S.calmii*, *B.pumilis*, *A.baumannii*, *B.megaterium*, *E.faecium* bakteri üzerinde agar disk difüzyon yöntemi ve broth micro dilüsyon yöntemi ile antibakteriyel etkileri incelemişlerdir. *Evernia prunastri* liken türünün aseton ekstraktının yaklaşık minimal inhibisyon değerleri test edilen mikroorganizmalar üzerinde yaklaşık 15 mm inhibisyon çapı oluştururken. En düşük minimal inhibisyon konsantrasyonu ise *E.faecium* üzerinde 62.5 µg/ml olduğu belirlenmiştir.

Aslan ve ark., (2006) yılında yaptığı bir başka çalışmada ise Artvin yöresinden topladığı *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri* ve *Neofuscella pulla* türü likenlerini 300 µg/disk metanol ekstraktların ile elde edilen antibakteriyel çalışmalarında *Evernia prunastri* liken türünün metanol ekstraktının test edilen bakteriler üzerinde agar disk difüzyon yönteminde çoğunluk olarak inhibisyon zonu oluşturmadığı, inhibisyon çapı oluşturan bakterilerde ise 4 ila 14 mm arasında inhibisyon çapları belirlemişlerdir. Çalışmalarında kullanılan *Evernia prunastrinin*

metanol ekstraktının Minimal inhibisyon değerleri ise *Evernia prunastri* için 31.25- 15.6 µg/ml konsantrasyon aralığında etkin olduğu tespit edilmiştir.

Yıldız ve ark., (2019) yılında yaptığı bir çalışmada ise Trabzon yöresinden toplanan *Usnea flipendula* liken türünün metanol ekstraktının antimikrobiyal etkileri on farklı mikroorganizma üzerinde çalışılmış sadece *S.aureus* üzerinde (4 mm) inhibisyon çapı oluşturduğu tespit edilirken, MİK değeri olarak da 1250-625 µg/mL konsantrasyon aralığında numune etkinliği tespit edilmiştir.

Genel olarak yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı lokasyonlardan toplanan liken türlerinin farklı ekstraksiyon solventleri kullanılarak elde edilen antimikrobiyal etkilerinin farklı miktarları agar disk difüzyon inhibisyon çaplarını doğrudan etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca çalışmalar incelendiğinde agar disk difüzyon yönteminde elde edilen inhibisyon çapları ile minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri 'de paralellik göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan aseton ekstraktlarının antibakteriyel etkilerinin disk difüzyon yöntemindeki inhibisyon çaplarına bağlı olarak MİK değerlerinin de daha düşük konsantrasyonlarda etkinlik göstermesi literatür ile doğrulanmaktadır. Aynı zamanda literatür ışığında aseton ekstraktının diğer organik solventlere nazaran daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği de yine çalışmamızla paralellik göstermektedir. (Osmanağaoğlu ve ark., 2019)

Bitki patojenleri ile yapılan antifungal çalışmamızda ise liken metabolitlerinin antifungal aktivitesi, kullanılan konsantrasyonda daha düşük inhibisyon çaplarına sahip olsa da funguslar üzerinde de antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Funguslarda daha düşük etki göstermesinin nedeni fungus hiflerinin bakterilere göre daha dayanıklı bir yapıya sahip olduğu düşünülmektedir. Yapılan antifungal çalışmamızda etanol ekstraktının kullanılan bitki patojenlerinin büyük çoğunluğu üzerinde belirli bir antifungal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni belki de etanol ekstratı ile elde edilen metabolitlerin funguslar üzerinde inhibe edici bir özellik göstermesinden kaynaklanabilmektedir. Halama ve Haluwin, (2004)'de yaptığı bir çalışmada *Evernia prunastri* *Hypogymnia physodes* ve *Cladonia portensotsa* 'nın aseton özleri sekiz farklı bitki patojeni mantar üzerinde denenmiştir. Yapılan araştırmanın sonucuna göre liken metabolitlerinin antifungal ajanlar olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Ayrıca antifungal etki gösteren liken metabolitlerinin *Usnea spp.* Türleri tarafından sentezlenen usnik asit, *Evernia spp.* Türleri tarafından sentezlenen Evernik asidin etkili olabileceği düşünülmektedir. Tiwari ve ark., (2011) yılında yaptığı bir çalışmada ise dört farklı liken türü olan *Bulbothrix setschwanensis*, *Everniastrum nepalense*, *Heterodermia diademata*, *Parmelaria thamsonii* likenlerin aseton,metanol ve kloroform ekstraktları yedi farklı bitki patojeni üzerinde (*Aspergillus flavus*, *A.fumigatus*, *Alternaria alternata* *F.solani*, *F.roseum*, *Fusarium oxysporum* ve *Penicillium citrinum*) araştırılmıştır. Likenlerin antifungal aktiviteleri Bauer-Kirby disk difüzyon testi kullanılarak analiz edilmiştir.

Likenlerin aseton ve metanol özleri, test edilen mantar türleri üzerinde daha etkili bulunurken, özellikle bazı geniş spektrumlu bitki patojenlerine karşı nispeten daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Likenlerin toplam fenolik içerikleri ve antioksidan indirgeme kapasiteleri çalışmalarında toplam fenolik içeriklerinin *Evernia prunastri* (Lİ-1) türünün aseton ekstraktı için 9,35 mg GAE/g ekstrakt, etanol için 12,53 mg GAE/g ekstrakt, metanol için 8,57 mg GAE/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. *Usnea flipendula* (Lİ-2) liken türünün aseton ekstraktı için 13,50 mg GAE/ g ekstrakt, etanol için 14,24 mg GAE/g ekstrakt, metanol için ise 13,59 mg GAE/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Antioksidan indirgenme kapasitesinin IC₅₀ değerleri ise *Evernia prunastri*'nin etanol ekstraktı 0.949 mg/ml, aseton için 0,855 mg/ml, metanol için ise 0.774 mg/ml olarak tespit edilmiştir. *Usnea flipendula* liken türünün etanol ekstraktı 0,968 mg/ml, aseton için 0,667 mg/ml, metanol için ise 0,661 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Standart antioksidan olarak kullanılan a-tokoferol ise 13.6 µg/ml konsantrasyonda tespit edilmiştir. (Yıldız ve ark., 2019) yılındaki çalışmasına göre *Usnea flipendula* ve *Viscum albüm* türü likenlerin methanol ekstraktları ile toplam fenolik içerik tayinleri *Usnea flipendula* için 6.377 mgGAE/g *Viscum albüm* için ise 6.114 mg GAE/g olarak bulunmuştur. (Mutlu S, 2008) yılında yaptığı çalışmada ise bazı liken türlerinden elde edilen su, etanol ve aseton ekstraktlarının toplam fenolik bileşik miktarı incelenmiştir. *Usnea flipendula*'nın su ekstraktının fenolik bileşik miktarı 18,6 mg GAE/g liyofizat, etanol ekstraktının 34.5 mg GAE/g liyofizat, aseton ekstraktının ise 51.6 mg GAE/g liyofizat olduğu belirlenmiştir. (Aoussar ve ark., 2018) yılında yaptığı çalışmaya göre *Pseudevernia furfuracea* (L.) ve *Evernia prunastri* (L.) likenlerinin aseton ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktiviteleri mevsimsel değişikliklere bağlı olarak incelenmiştir. *Evernia prunastri*'nin ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış aylarında toplanan türlerinin toplam fenolik madde tayinleri en yüksek ilkbahar ayında 328 µg GAE/mg ekstrak olarak belirlenirken, Antioksidan indirgenme kapasitesi bütün mevsimlerde IC₅₀ değerleri 1 mg/ml den yüksek konsantrasyonlarda belirlenmiştir. Standart olarak kullanılan troloks 9 µg/ml, askorbik asit ise 12 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda liken ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan indirgeme kapasitesi literatür ışığında incelendiğinde toplam fenolik madde miktarları ve antioksidan içeriklerinin likenlerin bulunduğu lokasyona, mevsime ve habitata bağlı olarak değişiklik gösterdiği anlaşılmaktadır. Literatür karşılaştırmasında da anlaşılabileceği üzere likenlerin antioksidan indirgenme kapasitesi çalışmamıza paralel olarak aynı trendi vermektedir.

5.SONUÇ

Yapılan çalışmada *Evernia prunastri* ve *Usnea flipendulanın* aseton,etanol,metanol ve tampon çözelti ile hazırlanan su ekstraktının birlikte bulunduğu araştırmaya, literatür ışığında rastlanmamıştır. Çalışmamızın sonucuna göre elde edilen verilerin literatüre katkı sağlayarak, yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde her iki tür liken örneğinin aseton ekstraktlarının yüksek bir antibakteriyel aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu sayede ileriki faz antibakteriyel çalışmalarında ve antibiyotik ilaç tasarımlarında kullanılması muhtemel doğal kaynaklar olacağı düşünülmektedir ayrıca bitki patojenleri üzerinde yapılan denemelerde de çalışmada kullanılan liken türlerinin antifungal aktivitesi tespit edilmiş olup, içerdikleri liken asitlerinin yüksek saflıkta elde edilmesi veya farklı bir ekstraksiyon prosesi kullanılarak ekstrakt elde edilmesi durumunda pestisit olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Tampon çözelti ile hazırlanan su ekstraktının ise liken metabolitlerini çözmede yeterli olamamaktadır. Bu durumun sonucu olarak da liken metabolitlerinin ortaya çıkarılmasında kullanılan çözücü kilit rol oynadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca çalışmada kullanılan liken türlerinin literatürde aynı isimdeki birçok çalışma bulunsada dahi bulunduğu ortama, mevsime, rakıma, substrata vb. birçok çevresel faktöre bağlı olarak metabolitlerinin değişim gösterdiği bu çalışma ile literatürdeki yeri sağlamlaştırılmıştır. Unutulmamalıdır ki aynı türden farklı liken türleri metabolitlerini çevresel faktörlere bağlı olarak sentezlemektedir. Bu durumun sonucu olarak antimikrobiyal ve antioksidan etkileri farklılık göstermektedir.

Çalışmada kullanılan liken türlerinin toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan indirgenme kapasitesi literatür ışığında incelendiğinde tıbbi aromatik bitkilere göre oldukça düşük seviyede kalmaktadır. Bu durum neticesinde yapılan çalışmanın evrensel literatürle karşılaştırması yapıldığında dahi, yeterli seviyede antioksidan içeriğine sahip olmadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda kullanılan liken türlerinin antioksidan kapasitesinin düşük olmasından dolayı antioksidan çalışmalarında ve ilaç geliştirme proseslerinde kullanımının tercih edilmemesi öngörülmektedir.

Çalışmada kullanılan liken türlerinden olan *Evernia prunastri* ve *Usnea flipendula* türü likenleri arazi çalışmamızda sadece belirli bir rakımın üzerinde ve hava kirliliğinin az olduğu bölgelerde görülmektedir. Bu durumda liken florasının yaygınlığı rakıma ve hava kirliliğine bağımlı olarak yetiştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca arazi gezileri sırasında genellikle toplamayı tercih ettiğimiz türler epifitik olarak bulunan çalımsı likenlerdir bu durumun sebebi kabuksu likenlerin substratlarından ayrılmasının oldukça güç olduğu ve kazınarak toplanması gerektiğidir bu durum da substrat parçalarının likenler arasına karışarak saf olarak liken tallusunun elde edilmesini oldukça güçlendirmektedir. Likenler toplanırken tavsiye edilmesi gereken nokta liken yüzeyi kuru ise nemlendirilerek toplanmasıdır. Bu sayede likenler substrat üzerinde parçalanmadan bir nebze de olsa kolay

ayrılabilir. Arazi gezileri sırasında bir başka dikkat çeken unsur ise liken türlerinin substrata bağlı olarak bulunduğu habitat seçmesidir. Örneğin *Evernia prusnastri* likeni sadece meşe ağaçlarında gözlemlenirken *Usnea flipendula* türü liken yabancı yemiş olarak adlandırılan ağaçların sadece bazılarında yayılım göstermektedir. İki türünde aynı ağaçta yayılım göstermesi durumu oldukça nadir rastlanmıştır.

Ekstraksiyon prosesine başlanırken metabolitlerin çözücü ile daha iyi çözünmesi için likenlerin küçük parçalar halinde parçalanması gerekmektedir. Bizim çalışmamızda parçalamayı en iyi şekilde yapabilmek için sıvı nitrojen ile dondurarak kurutma ve parçalama işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu yöntem karıştırıcı vb. mekanik parçalama yöntemlerine göre biraz pahalı olsa da en ideal parçalamanın bu yöntem ile gerçekleştiği düşünülerek, sıvı nitrojen ile parçalama tekniği tavsiye edilmektedir.



6.KAYNAKLAR

- Abraham EP, Chain E 1940 An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146:837
- Açıkgöz B. 2017 Bazı liken sekonder metabolitlerin sentezinde poliketid sentez (PKS) genlerinin ve ekspresyonlarının potansiyel etkilerinin belirlenmesi (Doktora tezi) Marmara üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü, Biyoloji anabilim dalı,
- Ahmadjian, V (1973) *The Lichens* Ed. Ahmedjian V, Hale. E, Academic Press, New York.
- Andrews, J. M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (Suppl. 1):5-16
- Anonim, Tulane university school of medicine, medical pharmacology, TMedWeb Wiki https://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/ribosomal_antibiotics
- Aoussar, N., Laasri, F. E., Bourhia, M., Manoljovic, N., Mhand, R. A., Rhallabi, N., ... & Mellouki, F. 2020. Phytochemical Analysis, Cytotoxic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Lichens. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
- Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adıgüzel, A., Sahin, F., & Özkan, H. 2006. Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliacea*., *Dermatocarpon miniatum*., *Everinia divaricata*., *Evernia prunastri*., and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical biology*, 44(4), 247-252.
- Bačkorová, M., Jendželovský, R., Kello, M., Bačkor, M., Mikeš, J., & Fedoročko, P. (2012). Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology in vitro*, 26(3), 462-468.
- Badea, M., Di Modugno, F., Floroian, L., Tit, D. M., Restani, P., Bungau, S., ... & Aleya, L. (2019). Electrochemical strategies for gallic acid detection: Potential for application in clinical, food or environmental analyses. *Science of the Total Environment*, 672, 129-140.
- Balaji, P., Bharth, P., Satyan, R. S., & Hariharan ,G. N. 2006 . In vitro Antimicrobial activity of *Rocella montagnei* Thallus extract .*Journal of Tropography medicinal Plants*, vol. 7 (2).
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Balows A. Current techniques for antibiotic susceptibility testing. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1972.
- Barak Ü.M 2015 Erciyes Dağında Yayılış Gösteren Bazı Likenleşmiş Mantarların Morforlojik, Anatomik ve Moleküler Yöntemler ile İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi) Erciyes Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü,

- Başer, K.H.C. 1990 Tıbbi Bitkiler ve Baharatların Dünyada ve Türkiye’deki Ticari ve Talep Durumu, *Tarım ve Köy işleri Derg.*, 53.
- Behera, B. C., Verma, N., Sonone, A., & Makhija, U. 2008. RETRACTED: Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. *Bioresource technology*, 99(4):776-784.
- Berry, M. J., Doucet, C. J., Lundheim, R. S., Sevilla, M. P., & Whiteman, S. A. 2001. *Anti-freeze proteins, their production and use. WO patent appl.* WO0183534-2001-11-08.
- Biemer, J. J. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 3(2), 135-140.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Blondeau, J. M. 2004. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of ophthalmology*, 49(2), S73-S78.
- Bowler, P. A., & Rundel, P. W. 1975. Reproductive strategies in lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 70(4), 325-340.
- Brodo, I. M. 2001. *Vezdaea acicularis*, an addition to the North American lichen flora *Bryologist* 104(2): 297-298.
- Brunauer, G., & stocker-wörgötter, E. 2005. Culture of lichen fungi for future production of biologically active compounds. *Symbiosis*, 38(2):187-201.
- Bu“ del, B. and Wessels, D. C. 1986. *Parmelia hueana* Gyeln., a vagrant lichen from the Namib Desert, SWA/Namibia. I. Anatomical and reproductive adaptations. *Dinteria*, 18, 3–15
- Burkholder, P. R., Evans, A. W., McVeigh, I., & Thornton, H. K. 1944. Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 30(9), 250.
- Cohen, P. A. & Towers, G. H. N. 1995. The anthraquinones of *Heterodermia oscurata*. *Phytochemistry*, 40(3):911-915.
- Crawford, S. D. 2019. Lichens used in traditional medicine. In *Lichen secondary metabolites* (pp. 31-97). Springer, Cham.
- Dayan FE, Romagni JG. 2001 Lichens As a Potential Source of Pesticides. *Pesticide Outlook*, 12: 229-32.

- Derderian, S. L. 2007. Alexander Fleming's miraculous discovery of Penicillin. *Rivier academic journal*, 3(2), 1-5.
- Džidic S, Šuškovc J, Kos B. 2008 Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol* 46:11-21.
- Elix, J.A. 1996. Biochemistry and secondary metabolites. In: NASH T. H. III (eds.): *Lichen biology*. 1st Edn., Cambridge University Press. 155–180.
- Ericsson JM, Sherris JC., 1971 Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1971; 217 (Suppl):1–90.
- F. E. Dayan, J. G. 2001 Romagni, Lichens as a potential source of pesticides, *Pestic. Outlook*. 12 229–232. doi:10.1039/b110543b.
- Fahselt D. 1994, Secondary biochemistry of lichens. *Symbiosis* 16: 117 – 165.
- Fahselt, D. 1994b. Carbon metabolism in lichens. *Symbiosis*, 17, 127–182.
- Felmingham, D., & Brown, D. F. 2001. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 81-85.
- Ganesan, A., Thangapandian, M., Ponnusamy, P., Sundararaj, J. P., & Nayaka, S. 2015. Antioxidant and antibacterial activity of Parmelioid lichens from Shevaroy hills of Eastern Ghats, India. *International Journal of PharmTech Research*, 8(9): 13-23.
- Gruber, N., & Galloway, J. N. 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), 293-296.
- Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. 2006 Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368:874-85.
- Halama, P., & Van Haluwin, C. 2004. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl*, 49(1): 95-107.
- Hale, M. 1974. *The Biology of Lichens* In: *Contemporary Biology*. Editors, EJW, Bornington, FRS and Wills, Clowe Sons, London.
- Hauser AR, 2015 editor. Cell envelope. In: *Antibiotic Basic for Clinicians*. 2nd ed. New Delhi: Wolters Kluwer (India) Pvt. Ltd.; p. 3-5.
- Hede, K. 2014. Antibiotic resistance: an infectious arms race. *Nature*, 509 (7498), S2-S3.
- Henderson, D. M., & Prentice, H. T. 1969. Contributions to the bryophyte flora of Turkey. *VIII. Edinb Roy Bot Gard Notes*.

Holten, K. B., & Onusko, E. M. 2000. Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *American family physician*, 62(3), 611-620.

Johnston NJ, Mukhtar TA, Wright GD. 2002 Streptogramin antibiotics: Mode of action and resistance. *Curr Drug Targets*; 3:335-44.

Jorgensen JH, Turnidge JD. 2007 Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1152–72.

Kahne D, Leimkuhler C, Lu W, Walsh C. 2005 Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem Rev*; 105:425-48.

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 33(3), 300

Karagoz, A., Doruoz, N., Zeybek, Z., & Aslan, A. 2009. Antibacterial activity of some lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(12): 1034–1039.

Karamanoğlu K., 1971 Türkiye'nin Önemli Liken Türleri” Ankara Eczacılık Fakültesi, Farmösötik Botanik ABD., Ankara S. 53

Kolukisa L.A 2019 Farklı liken ekstraktlarının insan periferik lenfosit kültürlerinde biyolojik aktivitelerinin incelenmesi (Yüksek lisans tezi) Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Fen bilimleri ve teknolojileri Anabilimdalı, ,

Kosanić, M., & Ranković, B. 2019. Lichen secondary metabolites as potential antibiotic agents. In *Lichen secondary metabolites* (pp. 99-127). Springer, Cham.

Kosanic, M., Rankovic, B., & Stanojkovic, T. (2012a). Antioxidant, antimicrobial, and anticancer activity of 3 Umbilicaria species. *Journal of food science*, 77(1).

Lakatos, M., Rascher, U. and Buđel, B. 2006. Functional characteristics of corticolous lichens in the understory of a tropical lowland rain forest. *New Phytologist*, 172, 679–695.

Lange, O. L., Green, T. G. A. and Reichenberger H. (1999). The response of lichen photosynthesis to external CO₂ concentration and its interaction with thallus water-status. *Journal of Plant Physiology*, 154, 157–166

Leroy, F., & De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.

Reynolds PE. 2005 Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 105:425-48

Luo, H., Wei, X., Yamamoto, Y., Liu, Y., Wang, L., Jung, J. S., ... & Hur, J. S. 2010. Antioxidant activities of edible lichen *Ramalina conduplicans* and its free radical-scavenging constituents. *Mycoscience*, 51(5), 391-395.

Marques J 2013 A framework for assessing the vulnerability of schist surfaces to lichen-induced weathering in the Upper Douro region (NE Portugal). Directores: Rubim Almeida y Graciela Paz. Universidad, Universidade de Porto, Fecha de lectura, 2013

Mazzetti H., F. Bubak 1909 Erbnisse einer botanischen Reise in das Pontische randgebirge im sandschak Trepezunt, untermomen im jahre 1907 im Auftrage de Naturwissenschaftlichen orientverienes in Wien

Miller 2000. Antioxidant activity. 9000 Plymouth Ave North, Minneapolis, Minnesota 55427. 1.800.245.5615

www.medallionlabs.com

Muller, K. 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1–2), 9–16.

Mutlu S., 2008 Bazı liken türlerinden elde edilen su, etanol ve aseton ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi (Yükseklisans Tezi) T.C Atatürk üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü eczacılık fakültesi biyokimya anabilim dalı,

Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology*, 31(4), 247-256

Nash III, T.H. (2008) *Lichen Biology*, Second Edition, Cambridge University Press. Osmanağaoğlu Ö, Yıldız A., Saçılık C.S, 2000 Türkiye'deki farklı bölgelerden izole edilen likenlerin antimikrobiyal aktiviteleri Türkiye mikrobiyoloji cemiyeti dergisi 30:17-19

Özer, Z., Tursun, N. ve Önen, H. 2001 Yabancı otlarla sağlıklı yaşam (Gıda ve Tedavi), Renk yayınları, Ankara, 134s.

Pinna, D., Salvadori, O. and Tretiach, M. 1998. An anatomical investigation of calcicolous endolithic lichens from the Trieste karst (NE Italy). *Plant Biosystems*, 132, 183–195.

Prakash V, Lewis JS II, Jorgensen JH. 2008 Vancomycin MICs with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates differ based upon the susceptibility test method used. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4528.

Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. 2009 Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*, 49(11), 1749-1755.

Ristić, S., Ranković, B., Kosanić, M., Stanojković, T., Stamenković, S., Vasiljević, P., ... & Manojlović, N. 2016. Phytochemical study and antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of *Melanelia subaurifera* and *Melanelia fuliginosa* lichens. *Journal of food science and technology*, 53(6), 2804-2816.

Rundel PW 1978 The ecological role of secondary lichen substances. *Biochem Syst Ecol* 6:157–170

Sharnoff, S. 2014. A field guide to California lichens. Yale University Press.

Sharnoff, S. D. 1997. Lichens and people. Online: <http://www.lichen.com/people.html>.

Sheldon AT 2005 Antibiotic resistance: a survival strategy. *Clin Lab Sci Summer* 18:170–180

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.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178.

Smith, A.L. (1921). *Lichens*, Cambridge University Press, Cambridge.

Sokmen, B. 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.

Solak, S. 2016. Fatih ormanlarının (Şişli, İstanbul) likenleri (Yüksek lisans tezi) Selçuk üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Biyoloji anabilim dalı,

Susithra, E., Mallikarjuna Rao, K., Ramesh, K. V., & Meena, S. 2011. Evaluation of in vitro antioxidant activity of isolated compounds of lichen, *Usnea undulate*. *Journal of pharmaceutical research*, 4(2): 352-355.

Şahin, F. M., 2009 Bazı süs bitkisi ekstraksiyonlarının antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin araştırılması (Yükseklisans Tezi), Tokat Gaziosmanpaşa üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, biyoloji bölümü, Tokat.

Mitrovic T, Stamenkovic, S Cvetkovic V., Nikolic M, S. Tosic, D. Stojicic, Lichens as source of versatile bioactive compounds, *Biol. Nyssana*. 2 (2011) 1–6

Tauxe, R. V. 2002. Emerging foodborne pathogens. *International journal of food microbiology*, 78(1-2), 31-41.

Tenover, F. C. 2009. Antibiotic susceptibility testing. *Encyclopedia of Microbiology* 3th edition s.67-77

Tiwari, P., Rai, H., Upreti, D. K., Trivedi, S., & Shukla, P. 2011. Assessment of antifungal activity of some Himalayan foliose lichens against plant pathogenic fungi. *American Journal of Plant Sciences*, 2(6), 841.

Trease, G.E., Evans, W.C. 1978: Pharmacognosy, 11th edition, Balliere Tindall, London, 75-76.

Uebel Ed, 2007, *Peltigera praetextata*. Wikimedia commons
https://commons.wikimedia.org/wiki/Peltigera_praetextata (29.04.2021)

Vannuffel P, Cocito C. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs* 1996;51 Suppl 1:20-30.

Wessels, D. C. J. and Schoeman, P. (1988). Mechanism and rate of weathering of Clarens sandstone by an endolithic lichen. *South African Journal of Science*, 84, 274–277.

Wise R. A review of the mechanisms of action and resistance of antimicrobial agents. *Can Respir J* 1999;6 Suppl A:20A-2A.

Wong G. J. 2011 Introduction to botany 135: Symbiosis Mycorrhizae and lichens” Universty of Hawai, Botany 135 syllabus.

Wood, M. (1992) The book of herbal wisdom: Using plants as medicine, Nore Atlatic Books pres, California, 374-379s.

Yavuz H., 2019 “Bazı fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi” Tokat Gaziosmanpaşa üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Kimya anabilim dalı, Yüksek Lisans Tezi,

YILDIZ, S., GÜRGEN, A., KILIÇ, C., TABBOUCHE, S., KILIÇ, A. O., & Zehra, C. A. N. (2019). Antioxidant, Antimicrobial and Anti-Quorum Sensing Activities of *Usnea filipendula* and *Viscum album*. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(4), 613-620.

Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70:1060-75.

Yücel G.D, 2018 “*Ramalina calicris* (L.) Fr. Liken Türünün Antibakteriyel ve Antioksidan Aktivitesini Araştırılması” Marmara üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi,

Zeybek, U., V. John. (1992). Likenler (Lichenes), kimyasal bileşikleri ve tıbbi kullanımları. *Pharmacia*, 32 (1) 7. 37 - 48.

7. ÖZGEÇMİŞ

