



T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



*Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf LİKEN  
TÜRÜNÜN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ VE  
ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN  
ARAŞTIRILMASI

SİNEM GÜLTEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU

İSTANBUL, 2018



T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



*Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf LİKEN  
TÜRÜNÜN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ VE  
ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN  
ARAŞTIRILMASI

SİNEM GÜLTEKİN  
(520113022)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU

İSTANBUL, 2018

**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Sinem GÜLTEKİN'in "Pseudevernia furfuracea (L.) Zopf liken türünün antibakteriyel aktivitesi ve antioksidan kapasitesinin araştırılması" başlıklı tez çalışması, 19/09/2018 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri**

Doç.Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU (Danışman)

Marmara Üniversitesi .....(İMZA).....



Doç.Dr. N. Cenk SESAL (Üye)

Marmara Üniversitesi .....(İMZA).....



Prof. Dr. Tamer ÖZCAN (Üye)

İstanbul Üniversitesi.....(İMZA).....



**ONAY**

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24/09/2018 tarih ve 2018/24-02 ..... sayılı kararı ile Sinem GÜLTEKİN'in Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

**Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

**Prof. Dr. Bülent EKİCİ**



## **TEŞEKKÜR**

Bu çalışma sürecinde kıymetli bilgilerini benimle paylaşan, tecrübe ve yol göstericiliği ile bu süreçte desteğini hiç esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU' na, çalışma süresinde laboratuvar imkanı sağlarken bilgi ve birikimleriyle desteğini gördüğüm hocam sayın Doç. Dr. N. Cenk SESAL' a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bu tez kapsamında çalışmalara 113S306-COST FA1202 no' lu proje aracılığıyla destek olan TÜBİTAK' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Ezgi UÇARKUŞ ve Barış GÖKALSIN' a, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda yanımda olan değerli arkadaşım Damla GÜNEŞ YÜCEL' e ve hayatım boyunca her konuda beni destekleyen sevgili aileme sonsuz teşekkürler ederim.

**Eylül, 2018**

**Sinem GÜLTEKİN**

## İÇİNDEKİLER / TABLE OF CONTENTS

	SAYFA
TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)	i
İÇİNDEKİLER / TABLE OF CONTENTS	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER VE KISALTMALAR / SYMBOLS AND ABBREVIATIONS	vi
ŞEKİL LİSTESİ / LIST OF FIGURES	viii
TABLO LİSTESİ / LIST OF TABLES	ix
BÖLÜM 1	1
1. GİRİŞ / INTRODUCTION	1
1.1. LİKENLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER	2
1.1.1. LİKENLERİN GRUPLANDIRILMASI	3
1.1.1.1. Tallus yapılarına göre likenler	3
1.1.1.2. Morfolojik yapılarına göre likenler	3
1.1.1.3. Tallus yapısına katılan mantarın cinsine göre likenler	4
1.1.2. LİKENLERİN ÜREME VE YAYILIŞI	4
1.2. LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİ	5
1.3. LİKENLERDE ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİK	6
1.3.1. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTEYİ BELİRLEMEDE KULLANILAN BAZI YÖNTEMLER	6
1.3.1.1. Disk difüzyon testi	6
1.3.1.2. Dilüsyon yöntemleri	7
1.3.1.3. Kuyu difüzyon yöntemi	7
1.3.1.4. E-Test	7
1.3.1.5. Otomatik ve hızlı direnç saptama yöntemi	8
1.4. LİKENLERİN ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR	8
1.5. LİKENLERDE ANTİOKSİDAN KAPASİTE	11
1.5.1. ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR	13
1.5.2. EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR	14
1.6. LİKENLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR	14

1.7. <i>PSEUDEVERNIA</i> CİNSİNE AİT BİLGİLER	15
1.7.1. <i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	15
1.8. KULLANILAN BAKTERİ SUŞLARI İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER	17
BÖLÜM 2	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM/ MATERIAL AND METHOD	19
2.1. MATERYAL	19
2.1.1. Cihazlar ve sarf malzeme	19
2.1.2. Kimyasallar	20
2.1.3. Bakteri suşları	20
2.1.4. Çalışmada kullanılan liken materyali	20
2.2. YÖNTEM	20
2.2.1. Deneysel ön hazırlıklar	20
2.2.2. Deneyin yapılışı	21
2.2.2.1. Antibakteriyel etki	21
2.2.2.2. Antioksidan kapasite	22
BÖLÜM 3	23
3. BULGULAR VE TARTIŞMA / RESULTS AND DISCUSSION	23
3.1. BULGULAR	23
3.1.1. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE	23
3.1.2. ANTİOKSİDAN KAPASİTE	26
3.2. TARTIŞMA	27
BÖLÜM 4	31
4. SONUÇLAR / CONCLUSIONS	31
KAYNAKÇA / REFERENCES	33
ÖZGEÇMİŞ	43

## ÖZET

### ***Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf LİKEN TÜRÜNÜN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ VE ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Likenler; mikobiyont olarak isimlendirilen bir mantar ve fotobiyont bir fotosentetik yeşil alg ve/veya siyanobakterinin bir araya gelmesiyle oluşan, kararlı ve devamlı ototrofik mutualistik birlikler oluştururlar ve oluşan bu birliktelik neticesinde likenler, kendilerini oluşturan organizmalara hiç benzemeyen, yepyeni fizyolojik, anatomik ve morfolojik özellikleri gösterirler. Böylece likenleri oluşturan simbiyontlar, kısıtlı yaşam koşullarında var olmalarına rağmen üstün özelliklerini ön plana çıkarma şansı bulurlar. Liken asitleri olarak bilinen ve çoğunlukla likenlere özgü olan sekonder metabolitlerin; antiprotozoal, antifungal, antioksidan, antiherbivor, antiviral, mutajen, antitümör, antibakteriyel, antiülserojenik, antinosiseptif ve anti-inflamatuar etkileri üzerine yapılan çalışmalar ve yayınlar gün geçtikçe artmaktadır. Genellikle sitotoksik özelliklerinin az olmasından dolayı bu maddeler farmakolojik araştırmalarda önemli yer tutar. Antimikrobiyal aktivite üzerine yapılan çalışmalarda likenlerin Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı farklı seviyelerde etkinlikleri olduğu görülmüştür. Bu çalışmamızda *Pseudevernia furfuracea* türüne ait likenlerden elde edilen ekstrelerin ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*, ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*, CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922 *Escherichia coli* suşları üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Ayrıca aynı örneklerin antioksidan kapasiteleri de CUPRAC metodu ile araştırılmıştır. Çalışmamızda deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki *P. furfuracea*'nın aseton ekstreleri Gram pozitif suşlarda farklı seviyelerde inhibisyon zonu oluştururken, Gram negatif bakterilere herhangi bir etkisi olmamıştır. Buna ek olarak, elde edilen sonuçlar türün yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak *P. furfuracea*'nın yeni ilaçların eldesi için doğal kaynak olma potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Liken, *Pseudevernia furfuracea*, antibakteriyel aktivite, antioksidan aktivite

## **ABSTRACT**

### **ASSESSMENT OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND ANTIOXIDANT CAPACITY**

#### **IN LICHEN *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf**

Lichens are stable, continuous autotrophic mutualistic associations of photosynthetic green algae and / or cyanobacterin with a fungus called a mycobionite. As a result of this association, lichens exhibit brand-new anatomic, physiological and morphological properties that are not at all similar to the organisms that make up it. Thus, the symbionts forming the lichens have a chance to bring their superior features to the forefront even though they exist in limited living conditions. Secondary metabolites, known as lichen acids and mostly specific to lichens; studies and publications on antibacterial, antifungal, antioxidant, antiviral, antiprotozoal, antiherbivor, mutagen, antitumor, antiulcerogenic, antinociceptive, antipyretic and anti-inflammatory effects of lichens and lichen metabolites are increasing day by day. These substances are important in pharmacological investigations because of their low cytotoxic properties. Studies on antimicrobial activity have shown that lichens have different levels of activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. In this study, antibacterial activities on strains of *Pseudevernia furfuracea* strains were tested by disk diffusion method. The antioxidant capacities of the same samples were also investigated by the CUPRAC method. In our study, experiments were run in three replications. The results obtained show that while acetone extracts of *P. furfuracea* produce inhibitory zones at different levels in Gram-positive strains, there is no effect on Gram negative bacteria. In addition, the results obtained show that the this lichen species has high antioxidant capacity. Based on results it is clear that *P. furfuracea* has the potential to be a natural resource for the disposal of new medicines.

**Keywords:** Lichen, *Pseudevernia furfuracea*, antibacterial activity, antioxidant activity

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR

$\mu$ g: Mikrogram

$\mu$ L: Mikrolitre

$\mu$ m: Mikrometre

ABTS: 2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic asit

ATCC: American Type Culture Collection

BHA: Butillendirilmiş hidroksianisol

CAT: Katalaz

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CIP 5: Ciprofloxacın 5  $\mu$ g

cm: Santimetre

CUPRAC: Cupric Reducing Antioxidant Capacity

DFO: Deferoksamin

DMSO: Dimetil sülfoksit

DPPH: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

GST: Glutasyon-S-Transferaz

GPx: Glutasyon peroksidaz

HNO<sub>2</sub>: Nitroz asit

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit

HOCl: Hipokloröz asit

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)

HUS: Hemolitik üremik sendrom

LB: Luria Bertoni

LOO•: Lipid peroksil

LOOH: Lipid peroksit

MIK: Minimal İnhibitör Konsantrasyon

mL: Mililitre

MLK: Minimal Letal Konsantrasyon

mm: Milimetre

nm: Nanometre

NO•: Nitrik oksit

NO<sub>2</sub>•: Nitrojen dioksit

<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: Singlet oksijen

O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>: Süperoksit

OH•: Hidroksil

O<sub>3</sub>: Ozon

ONOO<sup>-</sup>: Peroksinitrit

ROO•: Peroksil

ROS: Reactive Oxygen Species (Reaktif oksijen türleri)

SOD: Süperoksit dismutaz

SXT 25: Sulphamethoxazole 25 µg

TE: Troloks eşdeğeri

TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TLC: Thin Layer Chromatography (İnce tabaka kromatografisi)

UV: Ultraviyole

UV-VIS Spektrofotometre: Görünür morötesi spektrofotometre

## ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 1:** *Pseudevernia furfuracea* likeninin görünümü

**Şekil 2:** 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl *P. furfuracea* aseton ekstrelerinden hazırlanan konsantrasyonlar ve SXT 25: Sulphamethoxazole 25 µg antibiyotik diskinin *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)' te oluşturduğu inhibisyon zonları

**Şekil 3:** 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl *P. furfuracea* aseton ekstrelerinden hazırlanan konsantrasyonlar ve SXT 25: Sulphamethoxazole 25 µg antibiyotik diskinin *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)' ta oluşturduğu inhibisyon zonları

**Şekil 4:** 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl *P. furfuracea* aseton ekstrelerinden hazırlanan konsantrasyonlar ve CIP 5: Ciprofloxacın 5 µg antibiyotik diskinin *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 4122)' da oluşturduğu inhibisyon zonları

**Şekil 5:** 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl *P. furfuracea* aseton ekstrelerinden hazırlanan konsantrasyonlar ve CIP 5: Ciprofloxacın 5 µg antibiyotik diskinin *Escherichia coli* (ATCC 25922)' de oluşturduğu inhibisyon zonları

**Şekil 6:** *Pseudevernia furfuracea* aseton özütü(1) ve aseton(2) ile hazırlanan CUPRAC karışımları

**Şekil 7:** CUPRAC yöntemiyle belirlenmiş troloks kalibrasyon grafiği

## TABLO LİSTESİ

**Tablo 1:** Oksidatif strese neden olan reaktif türler

**Tablo 2:** Antioksidanların sınıflandırılması

**Tablo 3:** *Pseudevernia furfuracea* aseton ekstresi inhibisyon zonları



# BÖLÜM 1

## 1. GİRİŞ

Likenler mikobiyont mantar partner ile fotobiyont fotosentetik yeşil algler ve/veya siyanobakterilerin biraraya gelerek oluşturduğu mutualist birlikteliklerdir. Bu ortak yaşam sonucunda likenler, kendisini oluşturan mantar veya algal partnere hiç benzerlik göstermeyen, yepyeni özellikler gösterirler. Bu şekilde biraraya gelerek likenleri oluşturmuş olan simbiyontlar, zorlu yaşam şartlarında, güçlü özelliklerini ön plana çıkararak likenin yaşam şansını yükseltirler. Liken birliklerinde mantar; yaşamını sürdürmek, büyüyebilmek ve üreyebilmek için gereken karbon kaynağı olarak algi kullanırken alg, fotosentezde kullanacağı su ve minerali mantardan sağlamasının yanında, olumsuz fiziksel koşullara karşı da mantar tarafından korunur [1,2]. Mantarlar ve alglerin (ve/veya siyanobakterilerin) biraraya gelerek oluşturduğu ürün olan likenler, 'liken maddeleri' olarak isimlendirilen ve likene has sekonder metabolitleri sentezlemektedirler [3]. Likenler çevresel koşullara uyum sağlama ve savunma aracı olarak bu ürettikleri metabolitleri kullanırlar [4].

Liken maddeleri alifatik asitler,  $\gamma$ ,  $\delta$ - ve makrosiklik laktonlar, aminoasit türevleri, şeker alkolleri, kinon, monosiklik aromatik bileşikler, kromon, ksanton, dibenzofuran, depsid, depson, depsidon, steroid, terpenoid ve karotenoid gibi bileşikler içerisinde yer alırlar [5]. Tipik liken maddeleri kristal yapıda mikroskobik ürünler olup, liken yapısında önemli ölçüde kalıcı ve sabittirler [6]. Metabolizmaları sonucu açığa çıkan ve antimikrobiyal etkiye sahip bu maddeler izole haldeki mantar ve algde bulunmamaktadır [7,8]. Bu da biyolojik aktiviteye sahip bu liken maddelerinin simbiyoz yaşantıya bağımlı olduğunu göstermektedir. Liken metabolitlerinin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine ilk çalışma 1944 yılında yapılmıştır [9]. Özellikle bu maddeler Gram pozitif bakterilerde Gram negatif bakterilere oranla daha etkili bulunmuştur. Gram negatif bakterilerin daha duyarsız olma sebebi amfipatik ya da hidrofobik moleküllere daha az geçirgen olan bir dış membrana sahip olması ile açıklanmıştır [10]. Ülkemizde, son yıllarda liken kimyasının, antimikrobiyal, antioksidan gibi biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalar artmaya başlamıştır [11,12,13,14,15].

Hava kirliliği olması durumunda reaksiyon göstererek hava kirliliği biyoindikatörü olma özelliği bulunan likenler, ürettikleri bazı metabolitlerin bazı bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olmaları sebebiyle tıbbi alanda kullanılması önerilen doğa üyeleridir. Likenlerde kök sistemi bulunmadığından madde alış verişleri tüm yüzey ile

yapılmakta ve böylelikle sadece havadan kaynaklanan kirleticiler tespit edilebilmektedir. Endüstrileşmedeki hızlı artış ile birlikte liken florasının hava kirliliği olan bölgelerde fakirleştiği gözlemlenmiştir [16].

Gıdalarda veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğunda bir hedef molekülün oksidatif hasarını geciktiren, engelleyen veya ortadan kaldıran maddeler antioksidanlar olarak tanımlanmaktadır [17,18]. Antioksidan özellikteki maddeler serbest radikallerin oluşturduğu zarara karşı bir savunma kalkanı niteliğindedir. Serbest radikaller en dış yörüngede eşleşmemiş elektrona sahip moleküller olarak tanımlanır ve normal metabolik reaksiyonlar sonucu ya da sigara ve alkol kullanımı, hava kirliliği, bazı ilaçlar ve radyasyona maruz kalma gibi nedenlerle oluşabilirler. Genellikle kararsız ve çok reaktiftirler [19,20]. Radikaller lipitlere, proteinelere veya DNA' ya zarar verebilir ve vücutta hasar meydana getirebilir. Bu zarar veya hasarlar kalp hastalıkları, şeker hastalığı, damar sertliği gibi çeşitli ciddi hastalıklara sebep olur [21,22]. Dokuları bu hasarlardan koruyabilmek için serbest radikallerin etkisiz duruma getirilmesi önemlidir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkileri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile dengelenmektedir [23]. Günümüzde kullanılan sentetik antioksidanların yan etkileri tam bilinmemekle birlikte kanser gibi hastalıklara neden olabileceği şüphesi, araştırmacıları doğal kaynaklara yönelerek bitkisel kökenli antioksidanlar geliştirmeye sevk etmiştir. Çeşitli bitkilerden elde edilmiş karotenoidler, fenoller, askorbik asit ve azotlu bileşikler doğal kaynaklı antioksidanlardır [24]. Bu bilgiler ışığında liken ekstrelerinin ve liken metabolitlerinin antioksidan kapasitelerinin araştırıldığı çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. *P. furfuracea*' nın metanol ve su ekstreleri ile yapılan bir çalışmada farklı seviyelerde antioksidan kapasite görülmüş, fakat en yüksek aktivitenin metanol ekstrelerinin CUPRAC yöntemi ile elde edildiği bildirilmiştir [25].

## **1.1. LİKENLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER**

İlk olarak M.Ö 4.yy da Theophrastus "çiğerotharı" *Hepaticae* familyasına ait bitkiler için liken terimini kullanmıştır. Alman botanikçi Schwendener ise 1867' de ilk defa alg ve mantardan meydana gelen organizmalara liken diyerek bu bitkileri bilim dünyasına tanıtmıştır [26].

Likenler çok eski dönemden beri geniş kullanım alanına sahiptirler ve tıbbi amaçlarla geleneksel ilaç olarak kullanılmıştır [27]. Coyota destanına konu olmuş likenler kimyasal yapıları henüz bilinmiyorken morfolojik görünümüne göre insanlar tarafından tedavi amaçlı kullanılmışlardır. Örnek olarak 15. yüzyılda insan kafatası iskeleti üzerinde büyüyen

bir likenin altın değerinde olduğu ve epilepsi tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Bazı eski kaynaklarda ise likenler, elle çizilmiş şekiller halinde karşımıza çıkar. Bunların yanındaki açıklamalardan, bu likenlerin göğüs, apandisit ve baş ağrıları, karaciğer sorunları ve romatizmayı tedavi etmede kullanıldığı anlaşılmakta fakat; o zamanlar sistematik bir sınıflandırma yaklaşımı olmadığından bu likenlerin isimleri ancak şekillerinden tahmin edilebilmektedir [28].

### 1.1.1. LİKENLERİN GRUPLANDIRILMASI

Likenler; tallus ve morfolojik yapı, üzerinde büyümüş oldukları substrat ve likeni oluşturmuş olan mantar sınıfına göre çeşitli şekillerde gruplandırılmışlardır.

#### 1.1.1.1. Tallus yapılarına göre likenler

Likenler tallus yapısındaki mantar ve alg dağılımına göre iki gruptur. Homojen dağılmış olanlar 'homeomerik' likenler olarak adlandırılır ve bu grupta müsilaj içerisinde mantar miselyumu homojen dağılımdadır. Likenin şeklini algal partner belirler. Mantar ve alg farklı dağılım gösterdiğinde ise liken 'heteromerik' olarak isimlendirilir. Heteromerik likenlerde alger kabuk ve orta bölüm arasında bir tabaka halindedirler ve diğer bölümler gevşek veya sıkı yapıdaki mantar hiflerinden oluşmuş tabakalardan oluşur. Üst kabuk kısmının altında algerin meydana getirdiği 'gonidiyum' tabakası belirgin şekilde görölmektedir [29]. Heteromerik likenlerde liken şeklini, içerisindeki alg zonu bulunduran mantar belirler [30].

#### 1.1.1.2. Morfolojik yapılarına göre likenler

**Kabuksu likenler;** yassı tallus kabuk şeklinde ve tüm alt yüzey ile substrata sıkı bir şekilde tutunarak yaşadıkları substratta hayli kalın ya da yüzeyin içine doğru gömülmüş kabuk oluştururlar. Örnek tür; *Rhizocarpon geographicum* (harita likeni) [31].

**Yapraksı likenler;** köklerinin yapısı sayesinde buldukları substrattan biraz daha yüksekte dururlar. Geliştikleri substrata rizoid yapısında hifler gönderirler. Substrata gevşek şekilde tutunurlar. Çoğu yapraksı tipte olanlar senede 2 ya da 5 mm büyürler [32]. Yapraksı likenlere *Parmelia*, *Lobaria*, *Hypogymnia* cinsleri örnektir.

**Dalsı likenler;** yaşadıkları yüzeye tek bir noktadan tutunurlar, sarkan iplikler halinde veya çalı benzeri bir görüntüye sahiptirler. Örnek olarak silindirik ipliksi tallusu ile *Usnea* cinsi ve çalımsı görünümdeki *Pseudevernia* cinsi likenler verilebilir [33].

### 1.1.1.3. Tallus yapısına katılan mantarın cinsine göre likenler

**Ascolichenes (Aksuslu likenler);** Askuslu mantarlar ile alglerin simbiyoz yaşamı sonucu oluşan gruptur ve likenlerin çoğu bu gruba dahildir. Askolikenlerde mantar ortaklığı *Ascomycota*’ dan *Pyrenomycetales* veya *Discomycetales* ordolarına ait olabilir. *Endocarpon* ve *Verrucaria* genusları *Pyrenomycetales* ordosuna, *Parmelia*, *Usnea*, *Cladonia*, *Cetraria* ve *Collema* genusları ise *Discomycetales* ordosuna örnek verilebilir.

**Basidiolichenes (Bazidiyumlu likenler);** Genellikle tropikal bölgelerde bulunurlar ve sayıca çok azdırlar. Mantar ortaklığı *Basidiomycota*’ dan *Hymenomycetales* ordosuna aittir. *Cora pavonia* ve *Dictyonema sericeum* yaygın türlerine örnek verilebilir.

### 1.1.2. LİKENLERİN ÜREME VE YAYILIŞI

Likenler eşeyli ve eşeysiz olarak çoğalabilirler. Eşeysiz üreme algler tarafından, eşeyli üreme ise mantar tarafından gerçekleştirilir. Eşeysiz üreme “sored” ya da “izid” denilen mantar hifleriyle çevrili birkaç alg hücresinden oluşmuş tallus parçacıklarıyla gerçekleşir. Soredler tallus korteksinin parçalanmasıyla serbest kalarak toz şeklinde çevreye yayılır ve yayıldıkları yere tutunarak yeni bireyleri oluştururlar. Eşeyli üreme ise likenlerin sadece mantar bileşeninin ürettiği sporlar vasıtasıyla gerçekleşir. Alg vejetatif olarak bu yapı içinde çoğalır. Mantarların meydana getirdiği fruktifikasyonlar, serbest halde yaşayan mantarlarınkinden değişik bir yapıdadır. Mantarın türüne göre liken yapısında meydana getirilen fruktifikasyonlar da farklılık gösterir [34, 35].

Ekstrem koşullarda likenin fotosentez gibi fizyolojik olaylarının yavaşlaması sonucu büyümeleri de çok yavaş olmaktadır. Likenler çok yavaş üremelerinden kaynaklanan rekabette zayıf kalma dezavantajlarını, ürettikleri özel maddeler sayesinde telafi ederler. Likenlerin ürettiği bu özel maddeler insanlar tarafından fark edilmelerine neden olmuş ve araştırmalar liken metabolitleri ve onların tedavi edici etkileri üzerine olmuştur. Liken metabolitlerinin birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu çok sayıda araştırmayla ortaya konmuştur. Bu çalışmalardan bir kısmı likenin antitümöral [36,37,38] diğer bir kısmı antiinflamatuvar ve antiülserojenik [39] aktiviteye sahip olduğunu gösterirken diğer eski ve yeni pek çok literatürde likenler “soğuk algınlıkları, barsak kurtlarının düşürülmesi, kuduz, ateşli hastalıklar, humma nöbetleri, alerji, cilt hastalıkları, sarılık, boğmaca, solunum yolu hastalıkları, öksürük ve kemik kırıklarının” tedavisinde kullanıldığı, balgam söktürücü olarak

ve laksatif amaçlı kullanımlarının yanında damar küçültücü olarak da kan akışı engellenmesinde de kullanıldıkları kayıtlıdır.

Dünyamızda yirmi bin civarlarında liken türünün yayılış göstermiş olduğu bilinir. Likenler dağ zirvelerinde, gel-git alanlarında, tropiklerde, kutuplarda, kayaların üstünde, toprakta ve ağaç kabuklarından kemik, cam ve hatta böcek ve kaplumbağa gibi hayvanların sırtlarına kadar çok farklı habitatlarda gelişebilirler. Bu özelliklerinden ötürü dünyanın hemen birçok yerinde dağılım gösterdikleri bilinmektedir. [12].

## 1.2. LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİ

Antibiyotik arayışı ile yapılan çalışmalarda likenler de rol almış ve çok sayıda liken türünün antibakteriyel [40,41] ve antiviral [42] etkilere sahip oldukları anlaşılmıştır. Bu etkilerin likenlerin yapılarında bulunan ve çoğu asit karakterli olduğu için liken asitleri olarak da adlandırılan sekonder metabolitlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir [43]. Yapılan araştırmalar sayesinde günümüzde kimyasal yapısı aydınlatılmış olarak 1050 kadar liken asidi bilinmektedir [44]. Bunlar arasında özellikle usnik asit, protolikesterik asit, fumarprotosetrarik asit, pulvinik asit, fisodik asit ve lobarik asitin en yüksek antimikrobiyal etki gösteren maddeler olduğu saptanmıştır [45,46].

Liken metabolitleri primer (hücre içi) ve sekonder (hücre dışı) olarak iki temel gruba ayrılır. Likenlerde bulunan organik bileşiklerin çoğunluğu, mantar hücresi içinde ya da hif yüzeyinde depolanmış olan sekonder metabolitlerdir. Bu bileşikler genellikle suda çözünmez yalnızca organik çözücüler ile elde edilirler. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de eski zamanlardan beri halk arasında hastalıkların tedavisinde farmasötik özelliği olan, tıbbi olarak önemli bitkilerin yanında likenler de kullanılmıştır. Liken maddeleri metabolitleri dışında sentezlenme yollarına göre dört farklı grup altında incelenebilir:

1. Poliketit yol ya da Asetil – Polimalonat yolu
2. Mevalonik Asit yolu
3. Şikimik Asit yolu
4. Fikobiyontların fotosentetik ürünleri

Liken metabolitlerinin özellikle Gram-pozitif bakterilere ve bazı mantarlara antagonist aktivite gösterdiği bildirilmiştir [47,48]. Bu maddeler, Gram pozitif kokkuslara karşı ve *Mycobacterium tuberculosis* (Verem basili) ve difteriye karşı etkilidir. Liken sekonder

metabolitlerinden en çok çalışılan usnik asittir. Usnik asit [2,6-diasetil 7,9-dihidroksi-8,9b-dimetil-1,3(2H9bH)-dibenzo-furandion] 1844' de ilk izolasyonundan günümüze kadar en fazla çalışılan ve ticari olarak da üretilen liken metaboliti olmuştur [49]. Saf usnik asit; diş macunu, deodorant, krem, güneş koruma ürünlerinde aktif bileşen ya da koruyucu madde olarak ilaç, kozmetik endüstrisi ve parfümeride kullanılmaktadır. Usnik asit, yaraların tedavisinde kullanılan toz ve merhemlerin bileşimine de girer. Usnik asidin sodyum tuzlarının da *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Mycobacterium*' a karşı kuvvetli bir antibiyotik etkisi olduğu tespit edilmiştir [48].

Usnik asit toksisitesinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Usnik asit, liken yağ asitleri ve evernik asidin karışımından kuvvetli antibiyotik etkisi olan evosin meydana getirilir.

### **1.3. LİKENLERDE ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİK**

Likenler sekonder metabolitleri sayesinde antibakteriyel etki göstermektedirler. Bitkilerden kökenli kimyasalların dirençli bakteri üzerinde antibakteriyel etki göstermesi bitkilerin, sentetik antibiyotiklerden farklı bir etki mekanizması ile bakterilerde inhibisyon gerçekleştirdiğini kanıtlar niteliktedir [50]. Antibiyotikler mikroorganizmalar üzerinde hücre duvarı, sitoplazmik membran, protein ve nükleik asit sentezlerini engelleyerek ya da bozarak etki gösterirler [51]. Antibakteriyel etkilerinden dolayı likenler pek çok araştırmacının dikkatini çekmiş ve bu yönde çalışmalar yapılmasını sağlamıştır.

#### **1.3.1. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTEYİ BELİRLEMEDE KULLANILAN BAZI YÖNTEMLER**

Antibakteriyel bir ajanın bakteri türlerine karşı in-vitro etkinliğini saptamak amacıyla 'antibiyogram' da denilen antibakteriyel duyarlılık testleri uygulanır [52]. Antibakteriyel aktivite belirlenirken 'difüzyon' ve 'dilüsyon' olmak üzere iki yöntem grubu vardır [53].

##### **1.3.1.1. Disk difüzyon testi**

A.W. Bauer, W.M. Kirby ve ark. tarafından 1960'lı yılların ikinci yarısında standardize edilmesinden bu yana, disk difüzyon testi mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından en sık kullanılan antibiyotik duyarlılık testi olmuştur [54]. Bu yöntemde besi yerlerine 0,5 McFarland' a ayarlanmış bakteri kolonileri homojen bir şekilde olmasına dikkat edilerek yayılır, daha sonra test edilecek ajanın emdirildiği antibiyotik diskleri ve kontrol amaçlı

(yayılan bakteriye uygun olarak seçilmiş) antibiyotik diski yerleştirilerek besi yeri ters çevirilir ve petripler 18-24 saatlik inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda petriplerdeki inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirme yapılır [53].

#### **1.3.1.2. Dilüsyon yöntemleri**

Makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemleri olarak ikiye ayrılır. Prensip olarak aynı olan bu yöntemlerde makrodilüsyonda test tüpleri, mikrodilüsyonda ise "U" ya da "V" tabanlı "mikroplate"ler kullanılır [53]. Antimikrobiyal ajanın dilüsyonlarını içeren mikroplak kuyucuklarında üremenin gözle görülebilir olması temel alınır. Test edilecek olan antibiyotikler önce özel çözücüleri içinde hazırlanır ve takiben bu sıvı besiyerinde iki kat azalan sulandırılmaları yapılır. Mikroorganizmanın standart bir inokulumu ( $1 \times 10^6$  CFU / ml) hazırlanıp, antimikrobiyal ajanın çeşitli dilüsyonlarını içeren her bir tüpe eşit miktarlarda eklenir. Ayrıca antibiyotik içermeyen, üremenin göstergesi olan kontrol tüpüne de eklenir. Bakteri inoküle edilmemiş, sadece besiyeri konmuş bir tüp veya çukur da besiyeri kontrolü olarak hazırlanır. Besiyerleri, 35°C' de bir gecelik inkübasyondan sonra bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden incelenir. Bakterinin üremesini önleyen, gözle görülebilir olarak üremesinin inhibe olduğu en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonu "Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK)" olarak değerlendirilir [51,53].

#### **1.3.1.3. Kuyu difüzyon yöntemi**

Bu yöntemde belirli oranlarda standart inokulum bakteri besiyerine karıştırılarak bakteri-besiyeri karışımı hazırlanır ve steril petrilere dökülür. Katılaştıran besi yerlerinde steril mantar delici kullanılarak kuyucuklar açılır ve antibakteriyel ajan bu kuyucuklara belirli miktarda aktarıldıktan sonra 24 saatlik inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda kuyucuk etrafında oluşan zon çapı ölçülerek antibakteriyel aktivite belirlenir [55].

#### **1.3.1.4. E-Test**

Agar difüzyon ve MİK değerini kantitatif olarak belirleme esasına dayanır [56]. Test edilecek bakteri 0,5 McFarland yoğunluğa getirilerek agar yüzeyine steril bir eküvyonla yayılır. Takiben agar yüzeyine, belli bir antibiyotik gradienti içeren E-test şeritleri yerleştirilir ve plaklar 18-24 saat süreyle 35°C'de inkübe edilip MİK değeri belirlenir. MİK değeri şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçükle kesiştiği noktadır [53].

### 1.3.1.5. Otomatik ve hızlı direnç saptama yöntemi

Ticari olarak mantar ve bakterilerin hızlı identifikasyonlarının yanında, onlarla birlikte ya da ayrı olarak bu mikroorganizmaların antimikrobiklere olan dirençlerini ölçen otomatik mikro yöntemler ve bunları uygulayan cihazların kullanıldığı yöntemdir. Bu yöntemde amaca göre uygun vitek inokulasyon kartları yani; Gram negatifler, Gram pozitifler, bakteri sayımı ve anaeroblar için ya da antibiyogram için özel kartlar seçilir. Kartlardaki çukurlarda liyofilize ayıraçlı besiyerleri ya da antibiyotikli besiyerleri bulunur. Cihaz tarafından, standart bulanıklıkla bakteri süspansiyonlarından kartlara ekim yapılır; üretilir, sonuçlar okunur, değerlendirilir ve kaydedilir [51].

## 1.4. LİKENLERİN ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR

*Platismatia glauca* ve *Pseudevernia furfuracea* liken türlerinin antimikrobiyal, antioksidan ve antibiyofilm özellikleri üzerine yapılan araştırmada altı Gram pozitif ve beş Gram negatif bakteri suşu ile çalışılmış ve farklı çözücülerde gösterdikleri etkileri karşılaştırılmış. Yapılan çalışma ile *Platismatia glauca* ve *Pseudevernia furfuracea* likenlerinin koruyucu madde ve antioksidan olarak ilaç, gıda ve kozmetik endüstrisinde olası kullanımları gösterilmiştir [57].

Manojlovic ve ark. (2012) *Umbilicaria cylindrica* likeninin metanol ve etil asetat ekstraktlarının *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* suşları üzerindeki antibakteriyel etkilerini belirlemek için yaptıkları çalışmada, bu likenlerden elde edilen ekstraktların, kullanılmış olan test bakterilerine karşı değişik oranlarda aktivite gösterdiği belirlenmiştir [58].

Shibuya ve ark. (1983) liken metabolitlerinden 4-o-metilkriptoklorofaeik asitin prostaglandinin sentezini inhibe edebildiğinden bu molekülün anti-inflamatuar ilaç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur [1].

Karagöz ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, *Peltigera praetextata*, *Lecanora muralis*, *Peltigera polydactyla*, *Cetrelia olivetorum*, *Ramalina farinacea*, *Anaptychia ciliaris*, *Rhizoplaca melanophthalma*, *Xanthoria elegans*, *Xanthoria parietina*, *Umbilicaria vellea*, *Xanthoparmelia tinctoria*, likenlerine ait etanol ve su ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Parmelia perlata*, *Aeromonas* 1 (izolat), *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas* 2 (izolat)

bakterilerindeki antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Likenlerin su ekstralarının *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* bakterilerine karşı aktivite göstermesine rağmen, çalışılan diğer bakterilere karşı aktivite göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca, bu likenlerin etanol ekstralarının *B. subtilis*, *S. epidermidis* ve *S. aureus* dışındaki test bakterilerinde de etki etmediği belirlenmiştir [59].

Türkiye' nin farklı bölgelerinden izole edilen *Letaria vulpina*, *Evernia divaricata* ve *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* liken örneklerinin aseton ve kloroform ekstraları Gram pozitif çomaklar, Gram pozitif koklar, Gram negatif çomaklar ile *Candida albicans* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi üzerine çalışmalar yapılmış ve hazırlanan ekstralarda Gram pozitif kok ve çomaklara karşı inhibitör etki elde edilirken, Gram negatif çomaklar ve *Candida albicans*' a karşı herhangi bir aktivite gözlemlenmemiştir [60].

2008 yıllarının değişik aylarında Erzurum ili Oltu bölgesinin farklı yerlerinden toplanan *Physcia oipolia* (Ehrh. ex Humb.) Furnrohr., *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm., *Peltigera apthosa* (L) Willd., *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf, *Parmelia taractica* Kremp. liken örneklerinin etanol ekstraları hazırlanarak antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile araştırılmış ve *Escherichia coli* ATCC 11230, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Proteus vulgaris* ATCC 6899, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Micrococcus luteus* CCM 169, *Debaryomyces hansenii* DSM 70238, *Candida lyopolitica* ATCC 8660, *Candida albicans* ATCC 10231, *Rhodotorula rubra* DSM 70403 ve *Kluyveromyces fragilis* ATCC 8608 test mikroorganizmalarında çalışılmıştır. Yapılan çalışmaların sonucunda liken ekstralarının tüm test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu sonucuna varılmıştır [61].

*Cetraria islandica* liken türünün antibiyotik etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada etil asetat, aseton, kloroform ve etanol ekstraları disk difüzyon yöntemi ile çalışılmış, Gram pozitiflere karşı etki görülürken Gram negatif bakteriler, funguslar ve actinomycete' lere karşı aktivite saptanmadığı bildirilmiştir. *C. islandica* likeninin terapötik önemi içerdiği izolikenin ve likenin maddelerinden ileri gelmektedir [45].

Abdullah ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *Parmelia perlata*' nın petrol eteri, kloroform ve alkol ekstraları (25, 50, 75 g/l her bir ekstre için) Gram pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus*), Gram negatif bakteri (*Escherichia coli*) ve mantara (*Malassezia furfur*) karşı engelleyici etki göstermiştir. Petrol eteri ve kloroform ekstraları 75 g/l de Gram negatif bakteriye karşı düşük engelleme gösterirken etanol ekstresi 50- 75 g/l de Gram negatif bakteri ve mantara karşı dikkate değer bir engelleme göstermiştir [62].

*Xanthoparmelia pokorny'* nin etanol, petrol eteri, kloroform, aseton ve dietil ekstreleri ile bu türün gyrophoric ve stenosporic asit içerikleri Candan ve ark. (2006) tarafından bazı besin kaynaklı bakteri ve funguslara karşı araştırılmıştır. Ekstreler ve asitler *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Proteus vulgaris*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, ve *Yersinia enterocolitica'* ya karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ekstreler test edilen 10 fungusa (*Alternaria alternata*, *A. citri*, *A. tenuissima*, *Aspergillus fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani* ve *Penicillium notatum*) karşı etkili bulunmamıştır [63].

Cansaran ve ark. (2006) tarafından *Rhizoplaca chrysoleuca*, *R. melanophthalma* ve *R. Peltata'* nin usnik asit bileşeninin farklı dozları *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa'* ya karşı antimikrobiyal etkisi için araştırılmıştır. Usnik asit miktarı arttıkça antimikrobiyal etkininde arttığı görülmüştür [64].

*Usnea hirta*, *U. florida*, *U. barbata*, *U. longissima*, *U. rigida* ve *U. subflorida'* dan elde edilen usnik asit bileşeninin *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* ve *B. megaterium'* a karşı antimikrobiyal etkileri Cansaran ve ark. (2006) tarafından araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarla usnik asit miktarının artmasına paralel olarak antimikrobiyal etkilerinde arttığı da görülmüştür [65].

Saenz ve ark. (2006) tarafından *Aspicilia radiosa*, *Cladonia convoluta*, *C. firma*, *Diplochistes scruposus*, *Dirina repanda*, *Lecanora muralis*, *Pertusaria mammosa*, *Ramalina canariensis*, *R. subfarinacea*, *Roccella fuciformi* ve *Xanthoria calcicola'* nin antimikrobiyal etkileri araştırılmış ve bazı liken maddeleri belirlenmiştir (atranorin, eritrol, likesterinik asit, stistik asit, usnik asit, evernik asit ve ursolik asit). İncelenen mikroorganizmalara karşı (*Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*) usnik asit içeriği açısından zengin 4 türün (*Cladonia firma*, *Lecanora muralis*, *Ramalina canariensis* ve *R. subfarinacea* ) en etkili olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca Gram pozitif bakteriye karşı aktivite, usnik asit içeren likenlerde gözlenmiştir [66].

Türk ve ark. (2006) tarafından *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* ve *Pseudevernia furfuracea* var. *Ceratea'* nin aseton, dietil eter, kloroform ekstreleri ve fisodik asit, kloroatranorin, atranorin ve oliverik asit bileşenlerinin MIC değerleri ve antimikrobiyal etkileri bazı mikroorganizmalara karşı araştırılmıştır. Hemen tüm kimyasallar *Alternaria alternata*, *Ascochyta rabiei*, *Aspergillus niger*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *B.*

*subtilis*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Fusarium culmorum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Penicillium notatum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* ve *Yersinia enterocolitica*' a karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Ekstrelerin *Alternaria citri*, *A. tenuissima*, *Escherichia coli*, *Gaeumannomyces graminis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *Salmonella typhimurium*' a karşı antimikrobiyal etkisinin olmadığı bulunmuştur. Kloroatranorin ve oliverik asit birkaç istisna dışında aynı mikroorganizmalara karşı etkilidir. Fisodik asit yukarıda belirtilen maya ve bakterilere karşı etkiliyken, denenen tüm gelişmiş mantarlara karşı etkili değildir. Aynı zamanda atranorinin gelişmiş mantarlara karşı etkili olmadığı bildirilmiştir [67].

### 1.5. LİKENLERDE ANTİOKSİDAN KAPASİTE

Vücutta besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye çevrilmesi esnasında oluşan metabolik yan ürünler serbest radikaller olarak adlandırılır ve atomik ya da moleküler orbitallerde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektrona sahip atom ya da moleküllerdir. Kararsız yapıda olan serbest radikaller (reaktif oksijen türleri) kararlı hale gelmek için hücrelere saldırarak hasar oluştururlar. Boyutlarının küçük olması hücre membranlarından kolaylıkla geçmelerine olanak sağlar [68]. Antioksidan maddeler serbest radikalleri etkisiz hale getirip hücreleri bu zarardan korurlar. Eğer serbest radikaller ile antioksidanlar arasında orantısızlık olursa antioksidanlar serbest radikalleri etkisizleştiremez, artan serbest radikal seviyesi hücrelerde oksidatif hasara sebep olur ve bu duruma oksidatif stres denir. Serbest oksijen radikalleri DNA, protein, lipit ve karbonhidratlar gibi makromoleküllere saldırarak, sonuçta hücre yaşlanması, kardiyovasküler hastalıklar, mutajenik değişiklikler ve kanserli tümörlerin büyümesi gibi zararlı etkilere yol açabilirler. Antioksidanlar, reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller ile reaksiyona girmeleri nedeniyle bu tür istenmeyen değişiklikler ve sağlık riskleri ile savaşmanın en etkili yoludur. Çeşitli sebeplerle vücutta oksidatif strese neden olduğu bilinen radikal ve radikal olmayan karakterdeki reaktif türler Tablo 1' de gösterilmiştir:

**Tablo 1:** Oksidatif strese neden olan reaktif türler [69]

<b>Radikaller</b>	<b>Radikal olmayanlar</b>
<i>Reaktif oksijen türleri (ROS)</i>	Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Süperoksit (O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> )	Hipobromöz asit (HOBr)
Hidroksil (OH <sup>·</sup> )	Ozon (O <sub>3</sub> )
Hidroperoksil (HO <sub>2</sub> <sup>·</sup> )	Singlet oksijen (O <sub>2</sub> <sup>1</sup> )
Lipid peroksil (LO <sub>2</sub> <sup>·</sup> )	Lipid peroksitler (LOOH)
Lipid alkoksil (LO <sup>·</sup> )	Maillard reaksiyonu ürünleri
<i>Reaktif klorür türleri (RCS)</i>	Hipokloröz asit (HOCl)
Atomik klor (Cl <sup>·</sup> )	Nitril klorür (NO <sub>2</sub> Cl)
	Kloraminler
<i>Reaktif azot türleri (RNS)</i>	Nitröz asit (HNO <sub>2</sub> )
Nitrik oksit (NO <sup>·</sup> )	Nitrozil katyonu (NO <sup>+</sup> )
Azot dioksit (NO <sub>2</sub> <sup>·</sup> )	Nitroksil anyonu (NO <sup>-</sup> )
	Diazot tetraoksit (N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )
	Diazot trioksit (N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
	Peroksinitrit (ONOO <sup>-</sup> )
	Peroksinitröz asit (ONOOH)
	Nitril katyonu (NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> )
	Alkil peroksinitritler (ROONO)
	Nitril klorür (NO <sub>2</sub> Cl)

Antioksidanlar etki mekanizmalarını serbest radikalleri tutarak veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek, serbest radikalle etkileşip aktivitelerini azaltarak, serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak ya da onarım yaparak gösterirler [70]. Antioksidanlar vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir.

Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere iki grup altında toplanabilir (Tablo 2). Endojen ve eksojen antioksidanlar, oksidan/antioksidan dengesini sağlamak için serbest radikallerden vücudu korur ve serbest radikalleri etkisizleştirmek için kullanılırlar [71, 72].

**Tablo 2:** Antioksidanların sınıflandırılması

ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR	NONENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Ürik asit	$\alpha$ -lipoik asit
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
	Albümin	Seruloplazmin
EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR		
VİTAMİN EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR	İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR	
$\alpha$ -Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)	
$\beta$ -karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar)	
Askorbik asit (Vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz	
Folik asit (Vitamin B9)	Trolox-C (vitamin E analogu)	
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)	
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)	
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)	
	Nötrofil adezyon inhibitörleri	
	Sitokinler (TNF ve IL-1)	
	Barbitüratlar	
	Demir şelatörleri	

### 1.5.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki alt grupta sınıflandırılabilir. Enzimatik antioksidanlar; Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Glutasyon redüktaz (GR) enzimatik savunma hattını oluşturan enzimsel antioksidanlardır [35,73,74].

Non-enzimatik (enzimatik olmayan) antioksidanlar; Enzimsel olmayan antioksidanlar arasında glutasyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, koenzim Q10, selenyum,  $\alpha$ -lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin sayılabilir [4,35,73,74,75,76].

### 1.5.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen kaynaklı antioksidanları, vitamin eksojen antioksidanlar ve ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırabiliriz. Vitamin Eksojen Antioksidanlar;  $\alpha$ -Tokoferol (Vitamin E),  $\beta$ -karoten (Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C) ve folik asit (Vitamin B9) dışarıdan alınan vitamin kaynaklı antioksidanlardır [72, 77, 78].

## 1.6. LİKENLERİN ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Kinoshita ve ark. (2010) tarafından gerçekleştirilen ve *Lethariella sinensis*, *Lethariella sernanderi* ve *Lethariella cashmeriana* likenlerinden izole edilmiş sarı ve kırmızı pigmentlerin antioksidan aktivitelerinin araştırılmasını hedefleyen çalışmada bu liken pigmentlerinin antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [79].

Odabaşoğlu ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmayla *Bryoria fuscescens*, *Dermatocarpon intestiniformis*, *Peltigera rufescens* ve *Pseudevernia furfuracea*'nın su ve metanol ekstrelerinin antioksidan etkisi, toplam fenolik içerikleri ve bu etkide azalma in vitro koşullarda belirlenmiştir. *P. rufescens*'in su ve metanol ekstreleri en yüksek antioksidan etkiyi göstermiştir. Ekstrelerin antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik içerikleri arasında bir bağlantı bulunamamıştır. *Pseudevernia furfuracea*'nın metanol ekstresi en yüksek fenolik içeriğe sahip olmasına rağmen düşük antioksidan etki oluşturmuştur [80].

Aslan ve ark. (2006) tarafından *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Evernia prunastri*, *E. divaricata* ve *Neofuscella pulla*'nın metanol ekstresinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri in vitro koşullarda araştırılmıştır. *C. foliacea*, *E. divaricata*, *E. prunastri* ve *N. pulla* ekstreleri kullanılan yöntemlerde antioksidan etki göstermezken *D.miniatum* ekstresi 396,1 mg/ml konsantrasyonda başlangıçta % 50 ve daha sonra % 49 engelleme göstermiştir. Aynı zamanda ekstrelerin denenen bazı bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiş ancak mayalara karşı bir etki gözlenmemiştir [81].

*Platismatia glauca*, *Parmelia saxatilis*, *Umbilicaria nylanderiana*, *Ramalina pollinaria* ve *R. Polymorpha*'nın metanol ekstresinin in vitro koşullarda antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Güllüce ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmalar sonucu *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria* ve *R. polymorpha* aktivite göstermezken, *Umbilicaria nylanderiana* 400,2  $\mu$ g/ ml de % 50 engelleme sağlamış,

2 g/l de ise % 53 engelleme vermiştir. Ekstrelerin aynı zamanda denenen bazı bakteri, maya ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bulunmuştur [82].

### **1.7. PSEUDEVERNIA CİNSİNE AİT BİLGİLER**

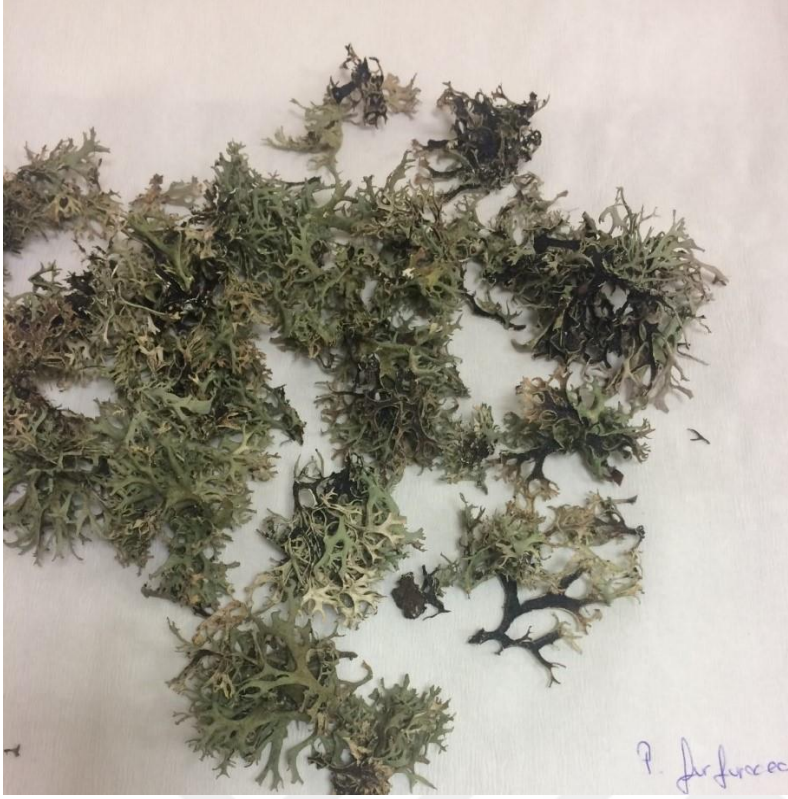
*Pseudevernia* cinsinin içinde yer aldığı *Parmeliaceae* familyası, *Alectoriaceae*, *Anziaceae*, *Hypogymniaceae* ve *Usneaceae* familyaları ile birlikte, yaklaşık 90 cinse ait 2000' e yakın tür içermekte olup *Lecanorales* ordosunun en büyük familyasıdır. Familya, ordonun merkezinde yer alır ve *Cladoniaceae* ve *Lecanoraceae* gibi büyük familyalarla yakın akrabalık ilişkileri vardır. Bu familya, askokarplarının gelişimi ve kupulat eksipulum olarak adlandırılan apotesyumlarına dayanılarak oluşturulmuştur. Bazı araştırmacılar, bu familyayı *Alectoriaceae* ve *Hypogymniaceae* olmak üzere familya seviyesinde bölmekle birlikte, moleküler kanıtlar bu ayrımı desteklememektedir [69].

*Pseudevernia* cinsinde tallus çok büyük, geyik boynuzu biçiminde dallanan, yapraksı-dalsı, dorsiventral yapıda ve yaklaşık olarak 12 cm boyundadır. Üst yüzey koyu grimsi beyaz renkte, alt yüzey tabana doğru koyu renkli, dış bükey, çok sayıda izidli ve nadiren soredli [83].

#### **1.7.1. PSEUDEVERNIA FURFURACEA (L.) ZOPF**

Tallus 10 cm'ye kadar şerit halinde, 1-4 cm arası lop genişliğine sahiptir. Üst yüzeyleri gri-beyaz tonlarında olmasına rağmen merkeze doğru siyah renkte bulunurlar. Alt yüzeyleri ise kanallı yapıda ve uçlar kahverengi-beyaz veya pembemsi renklidirler [84].

*Pseudevernia furfuracea* tarih boyunca işlenmiştir. Bir koruyucu olarak; sabun, kozmetik kokuları, ekmek yapımında besleyici olarak kullanılmıştır [85].



**Şekil 1:** *Pseudevernia furfuracea* likeninin görünümü

Türün sistematik yeri şu şekildedir:

Kingdom: *Fungi*

Divisio: *Ascomycota*

Class: *Lecanoromycetes*

Order: *Lecanorales*

Family: *Parmeliaceae*

Genus: *Pseudevernia*

Species: *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf

## 1.8. KULLANILAN BAKTERİ SUŞLARI İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

Tek hücreli mikroorganizma grubu olan bakteriler, birkaç mikrometre uzunluğunda ve küresel, çubuksu, spiral ve virgül gibi farklı şekillerde olabilir. Hücre şekillerinde bulunan farklılıklar bakterinin hücre iskeleti ve hücre duvarınca belirlenir. Hücre şekli sıvı içinde yüzmesine, gıda alımına, doğal avcılarından kaçmasına ve yüzeylere bağlanmasına etki eder [86,87]. Eskiden bitkilerin *Schizomycetes* sınıfına ait sayılan bakteriler artık prokaryot olarak sınıflandırılırlar ve ökaryotlardan farklı olarak bakteri hücreleri hücre çekirdeği içermezken membran kaplı organeller de nadir olarak görülür [88]. Bakterilerde mitokondri, hücre çekirdeği, kloroplast ve ökaryotlarda mevcut olan, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı gibi diğer organellerden yoktur. Bakteri hücresi ‘hücre zarı’ olarak adlandırılan lipid yapıda bir zarla çevrilidir [89]. Bakterilerde hücre zarının dışında peptidoglikandan oluşan ve hücre duvarı olarak adlandırılan bir yapı bulunur [90]. Bakterilerde Gram pozitif ve Gram negatif olarak adlandırılan iki tip hücre duvarı bulunur. Hücre duvarının bu adları, bakterilerin çok eskiden beri sınıflandırılmasında kullanılan bir test olan ve hücrelerin Gram boyası ile tepkimesindeki farklılıktan kaynaklanır [91]. Bakterileri hücre duvarlarının yapısal özelliklerine göre tanımlamakta gram boyama kullanılır. Gram-pozitif bakteriler, çoğu peptidoglikan ve teikoik asit tabakasından oluşmuş kalın bir hücre duvarına sahipken, Gram negatif bakterilerde birkaç peptidoglikan tabakası bulunur ve bunun etrafını lipopolisakkaritler ve lipoproteinlerden oluşan ikinci bir hücre zarı sarar [92]. Vankomisin Gram pozitif bakterileri öldürmesine karşın, *Haemophilus influenzae* veya *Pseudomonas aeruginosa* gibi Gram negatif patojenlere karşı etkisiz olmasındaki farklı sonuçlar, bakterilerdeki yapısal farklılık sonucu antibiyotiklere olan duyarlılıklarını etkileyebilir [93].

Çalışmamızda Gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), Gram negatif bakterilerden ise *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 4122) ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) suşları kullanılmıştır.

***Staphylococcus aureus***; sporsuz ve hareketsiz kok formunda olan ve fakültatif anaerob gelişim gösteren bu bakteri suşları optimum 30-37 °C’ de gelişirler. *Staphylococcus aureus* doğal olarak en fazla boğaz ve burun boşluğunu örten mukozada yer alır ve buradan pek çok yere yayılır. Deride en çok yüzde, ellerde ve kollarda bulunur. İnsan ve

hayvanların dışkısında, apseli yaralarda, çıban ve sivilcelerde yoğun olarak bulunmaktadır [94].

***Enterococcus faecalis***; Gram pozitif, aerobik veya fakültatif anaerob, birkaç istisna dışında hareketsiz, oval kok formunda, genellikle diplokok veya kısa zincir görünümündedirler. Sepsis, menenjit, endokardit gibi ciddi enfeksiyonlara yol açabilen yaygın ve önemli patojenlerdir [95]. Bu bakteriler aminoglikozid, sefalosporin, klindamisin ve trimetoprim-sülfametoksazol gibi yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı doğal direnç göstermekte, bunların neden oldukları enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri sınırlı kalmaktadır [96].

***Pseudomonas aeruginosa***; Gram negatif, aerobik ve flagellası ile hareket edebilen çubuk şekilli, insan patojeni olan bakterilerdir. Bağışıklık yetersizliği olan hastalarda solunum ve idrar yollarının, yanıkların ve açık yaraların fırsatçı patojenidir aynı zamanda kanda da enfeksiyonlar yapabilir. Penisilin ve diğer Beta Laktam antibiyotiklerine karşı doğal olarak dayanıklı iken piperacillin, imipenem, tobramycin, ciprofloxacin, polimiksin E (kolistin) gibi antibiyotiklerle tedavi edilebilir [97,98].

***Escherichia coli***; Gram negatif, fakültatif anaerobik, peritriş kirpiklerinden dolayı hareketli ve 60 °C ısıda 30 dk, oda ısısında uygun ortam koşullarında uzun süre canlı kalabilen oldukça dirençli bir bakteridir. Soğuğa dirençli, dezenfektanla karşılaşsa dirençsizdir [99]. Sıcakkanlı organizmaların bağırsaklarında bulunan ve insan için önemi olan fırsatçı patojendir [100]. Enteropatojenik suşlarla meydana gelen ishaller, üropatojenik suşlarla oluşan idrar yolu enfeksiyonları (İYE), neonatal menenjit, sepsis, karın içi enfeksiyonları, yara yeri ve akciğer enfeksiyonları *E. coli*' lerin meydana getirdiği başlıca hastalıklardır [101,102].

## **BÖLÜM 2**

### **2. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **2.1. MATERYAL**

##### **2.1.1. CİHAZLAR VE SARF MALZEME**

1. Ependorf, falkon ve cam deney tüpleri
2. Porselen havan
3. Dijital hassas terazi
4. Rotary evaporatör ekstraktörü
5. Plastik petri kabı
6. Platin öze
7. Steril diskler
8. Antibiyotik diskler
9. Pens
10. Distile su
11. Bek alevi
12. Çeker ocak
13. Steril kabin
14. Otomatik pipetler (1000 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 10 $\mu$ l)
15. Pipet ucu (10 $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l)
16. Vorteks
17. Otoklav
18. Otoklav şişesi (500 ml)
19. İnkübatör
20. Mikrodalga fırın
21. Buzdolabı ve derin dondurucu
22. Cam petri kabı, beher, Erlenmayer
23. Spektrofotometre küveti (1400  $\mu$ l)
24. UV-VIS Spektrofotometre
25. Cam baget
26. Cetvel

### 2.1.2. KİMYASALLAR

1. LB Agar Besi Yeri
2. LB Broth Besi Yeri
3. Aseton
4. Sulphamethoxazole antibiyotik diskleri
5. Ciprofloxacın antibiyotik diskleri

### 2.1.3. BAKTERİ SUŞLARI

1. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)
2. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
3. *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 4122)
4. *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Bakteri suşları Yeditepe Üniversitesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan Doç. Dr. Nüzhet Cenk SESAL ve ekibi ile Yrd. Doç. Dr. İskender KARALTI tarafından seçilerek temin edilmiştir.

### 2.1.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN LİKEN MATERYALİ

Deneyde kullanılan *Pseudevernia furfuracea* türüne ait liken örnekleri rakımı 930 m olan Bursa İli Alaçam bölgesinden toplanmış ve Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU tarafından Marmara Üniversitesi Herbariumu'nda örnekler tayin edilmiştir.

## 2.2. YÖNTEM

### 2.2.1. Deneysel ön hazırlıklar

Tanımlaması yapılan liken örnekleri yıkanıp kurumaya bırakıldı. Kuruyan likenler porselen havanda parçalandı. Toz haline gelen örnekler hassas terazi ile ölçüm alınarak steril falkonlara dolduruldu ve üzerlerine 35 mililitre aseton ilave edildi. Hazırlanan falkon tüpler 24 saat boyunca ışık görmeyen ortamda beklemeye bırakıldı. Bekleme süresi bittikten sonra Whatman No.1 filtre kağıdından geçirilerek Rotary evaporatör

ekstraktörü yardımıyla asetonun büyük bir kısmı uçuruldu ve kalan asetonun da uçması için steril cam petrilere alınarak 24 saat çeker ocakta bekletildi. Asetonun uçmasıyla cam petrilere kalan liken özütleri kazınarak steril ependorflara konuldu ve deneyde kullanılmak için uygun şartlarda muhafaza edildi. Kullanılacak bakteri suşları ise; Luria Bertoni (LB) besiyerinde prosedürlere uygun olarak çoğaltıldı ve *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 4122), *Escherichia coli* (ATCC 25922) suşlarının stokları deneyde kullanılmak üzere uygun şartlarda muhafaza edildi.

## 2.2.2. DENEYİN YAPILIŞI

### 2.2.2.1 ANTİBAKTERİYEL ETKİ

*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 4122), *Escherichia coli* (ATCC 25922) suşlarına ait stoklardan Luria Bertoni (LB) besiyerine pasaj geçildi ve aktive olmaları için 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası aktive olan bakteriler UV-VIS Spektrofotometre kullanılarak konsantrasyonları 0,5 McFarland olacak şekilde ayarlandı ve steril öze ile LB broth besiyerine tüm yüzeye dağılmasına dikkat edilerek eklendi. *Pseudevernia furfuracea* türüne ait liken örneklerinden elde edilen ekstraktlerden hassas terazide 13,8 miligram ölçülerek 1462,5 mikrolitre (1,4625 ml) asetonla çözdürüldü. 9 mg/ml konsantrasyona sahip olan ekstraktler 6 mm çapındaki steril diskler üzerine bir yüzeye 10 mikrolitre eklenildi ve asetonun uçması beklenildikten sonra steril diskin diğer yüzüne de 10 mikrolitre ekstrakt eklenildi. İşlem 20 µl, 40 µl ve 80 µl dozlarını elde edene kadar yapıldı. Hazırlanan diskler 0,5 McFarland konsantrasyonundaki bakterilerden 35 mikrolitre alınarak steril cam baget ile LB Agar besiyerlerine yayılarak hazırlanmış petrilere uygun mesafelerde üç doz olacak şekilde yerleştirilmiş ve karşılaştırma amaçlı olarak antibiyotik diskler yerleştirilmiştir. Kontrol amacı ile aseton emdirilmiş diskler de hazırlanmış ve tüm örnekler 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilere bulunan disklerde inhibisyon zonu oluşup oluşmadığı kontrol edildikten sonra inhibisyon zonuna sahip disklerin ölçümleri cetvel ile yapılarak kaydedilmiştir. Deney üç tekrarlı olarak çalışılmış ve sonuçlar ortalama değerler hesaplanarak bulunmuştur.

### 2.2.2.2. ANTIOKSİDAN KAPASİTE

2004' te Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilen CUPRAC yöntemi kullanılarak *P. furfuracea*' nin antioksidan kapasitesi belirlenmiştir [103].

CUPRAC yöntemi için;  $1.0 \times 10^{-2}$ M olması için  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ' den 0.4262 g tartı ile ölçülerek üzeri distile su ile 250 ml' ye, amonyum asetat 1.0 M olacak şekilde 19.27 g tartılarak üzeri distile su ile 250 ml' ye ve neocuproine çözeltisi  $7.5 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde 0.156 g tartılarak etanolle 100 ml' ye tamamlanır. Antibakteriyel aktivite deneyi ile aynı konsantrasyonda (9 miligram/mililitre) olacak şekilde toz liken özütleri asetonda çözüldü. Hazırlanan üç solüsyondan 50 şer µl alınarak cam tüpe konulduktan sonra üzerine 55 µl liken özütü konuldu. Kontrol grubu olarak üç solüsyona liken özütü yerine 55 µl aseton konuldu. İyice çalkanan tüpler ağzı kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. 30 dakikalık bekleme süresinin ardından örnekler UV spektrofotometrede 450 nm absorbansta ölçüldü. Troloks referans antioksidan olarak kullanıldı ve elde edilen verilerin standart sapmaları ve ortalamaları belirlendi. Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

## BÖLÜM 3

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. BULGULAR

##### 3.1.1. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE

*Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* suşlarının yayıldığı besi yerlerine Sulphamethoxazole 25 µg, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* suşlarının olduğu besi yerlerine ise Ciprofloxacin 5 µg antibiyotik diski karşılaştırma amaçlı yerleştirilmiştir. Gram pozitif bakterilerde CIP, Gram negatif bakterilerde ise SXT denenmemiştir. Oluşan zonlar incelendiğinde *Pseudevernia furfuracea* ekstrelerinin denenebilecek en yüksek doz olan 80 µl için *Enterococcus faecalis*' de 17 mm, *Staphylococcus aureus*' ta 18 mm inhibisyon zonu oluşturduğu ölçülmüştür. En yüksek etki 18 mm inhibisyon çapıyla *S. aureus*' ta görülürken en düşük inhibisyon çapı 15 mm ile *Enterococcus faecalis*' de ölçülmüştür. Denenmiş olan hiçbir ekstre antibiyotiklerden yüksek etki gösterememiştir.

**Tablo 3:** *Pseudevernia furfuracea* aseton ekstrelerinin inhibisyon zonları(mm)

BAKTERİ SUŞU	İNİHİBİSYON ZONLARI (mm)				
	20 µl	40 µl	80 µl	CIP 5 µg	SXT 25 µg
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	15±1	16±1	17±0.7	D	26±0.6
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	16±0.7	17±0.7	18±0.7	D	26±1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CECT 4122)	-	-	-	32±0.6	D
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	-	-	-	25±0.6	D

(\*) : Disklerin çapı 6 mm'dir. Deneyler üç tekrarlı çalışılmış, tabloda ortalama değerler verilmiştir.

- : İnhibisyon zonu görülmedi

D: Denenmedi

CIP 5: Ciprofloxacin 5 µg

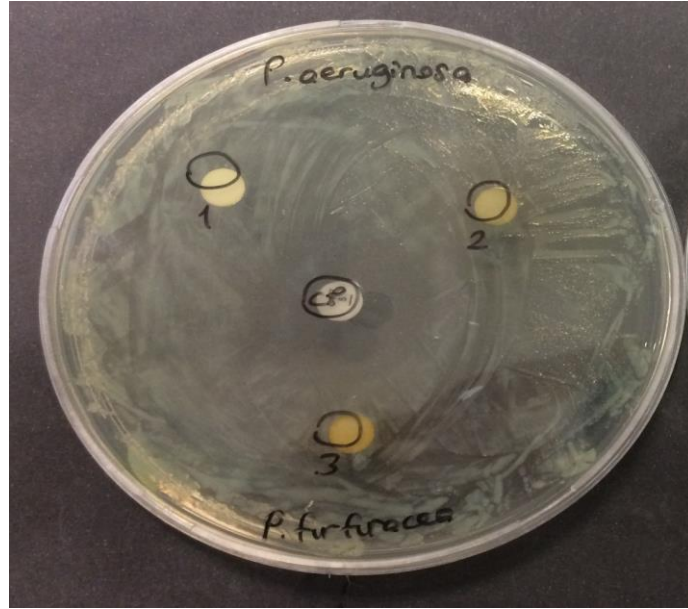
SXT 25: Sulphamethoxazole 25 µg



**Şekil 2:** 1: 20  $\mu$ l, 2: 40  $\mu$ l, 3: 80  $\mu$ l *P. furfuracea* aseton ekstrelerinden hazırlanan konsantrasyonlar ve SXT 25: Sulphamethoxazole 25  $\mu$ g antibiyotik diskinin *Enterococcus faecalis*(ATCC 29212)' te oluşturduğu inhibisyon zonları.



**Şekil 3:** 1: 20  $\mu$ l, 2: 40  $\mu$ l, 3: 80  $\mu$ l *P. furfuracea* aseton ekstrelerinden hazırlanan konsantrasyonlar ve SXT 25: Sulphamethoxazole 25  $\mu$ g antibiyotik diskinin *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)' ta oluşturduğu inhibisyon zonları.



**Şekil 4:** 1: 20  $\mu$ l, 2: 40  $\mu$ l, 3: 80  $\mu$ l *P. furfuracea* aseton ekstraktlarından hazırlanan konsantrasyonlar ve CIP 5: Ciprofloksasin 5  $\mu$ g antibiyotik diskinin *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 4122)'de oluşturduğu inhibisyon zonları.



**Şekil 5:** 1: 20  $\mu$ l, 2: 40  $\mu$ l, 3: 80  $\mu$ l *P. furfuracea* aseton ekstraktlarından hazırlanan konsantrasyonlar ve CIP 5: Ciprofloksasin 5  $\mu$ g antibiyotik diskinin *Escherichia coli* (ATCC 25922)'de oluşturduğu inhibisyon zonları.

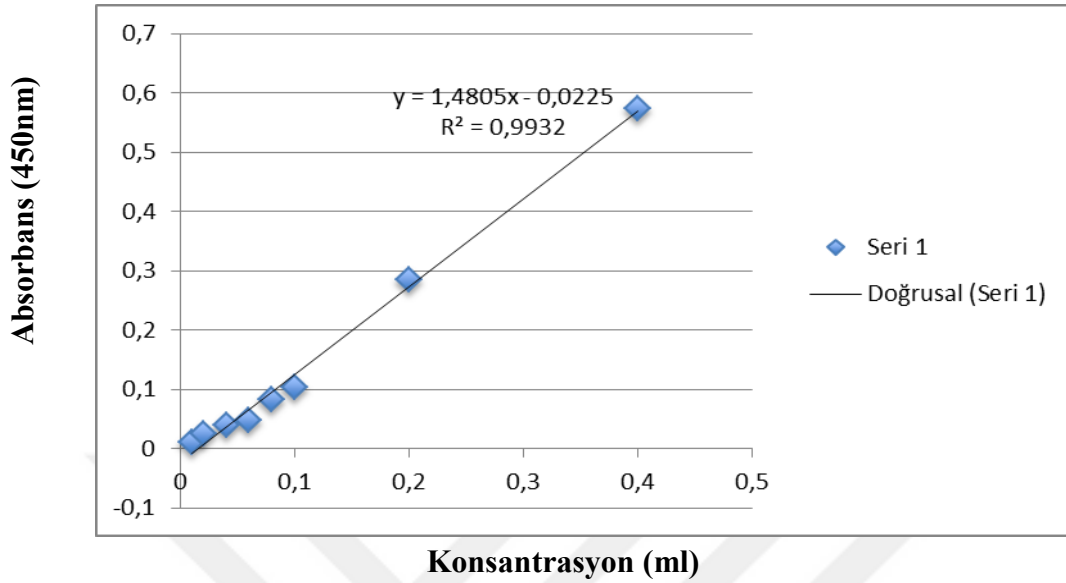
### 3.1.2. ANTIOKSİDAN KAPASİTE

Herhangi bir seyreltme yapılmayan *P. furfuracea* liken özütünün antioksidan kapasitesi CUPRAC yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde antioksidan kapasite, 2,9dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm' de maksimum absorban veren bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak hesaplanmaktadır. Spektrofotometrede ölçülen sarı rengin şiddeti antioksidan miktarını göstermektedir. Şekilde *P. furfuracea* özütü(1) ve kontrol grubu olarak aseton(2) ilave edilerek ölçüm yapılmış CUPRAC karışımları verilmiştir. *P. furfuracea*' ya ait grupta antioksidan aktivite kaynaklı sarı renk oluşumu gözlemlenmektedir.



**Şekil 6:** *Pseudevernia furfuracea* aseton özütü(1) ve aseton(2) ile hazırlanan CUPRAC karışımları.

Troloks çözeltisinden alınan hacime bağlı ml bazındaki absorban değerleri ölçülerek troloks kalibrasyon grafiği çıkarılmış ve grafikteki troloks etkinliği ile *P. furfuracea* aseton ekstraktlarının etkinlikleri oranlanmıştır.



**Şekil 7:** CUPRAC yöntemiyle belirlenmiş troloks kalibrasyon grafiği.

\*Y : Lineer kalibrasyon değeri

\*R<sup>2</sup>: Korelasyon katsayısı

Aseton ile hazırlanan *P. furfuracea* özütlerinin CUPRAC yöntemi ile ölçülen antioksidan değeri;  $9.653 \pm 0.102 \mu\text{g TE/gr}$  dır.

### 3.2.TARTIŞMA

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki likenler, türlerine ve kullanılan çözücü farklılıklarına göre değişik antimikrobiyal etki göstermektedirler. Gram negatif bakteriler üzerinde fazla etki göstermezken, Gram pozitif bakterilerde etki gösterdiği bizim çalışmamızda da görülmüştür. Gram negatif bakterilerde etki görülememesi ise, bu bakterilerin sahip olduğu hidrofobik veya amfipatik moleküllere çok az geçirgen olan dış zar yapısından kaynaklandığı önceki çalışmalarda bildirilmiştir [10,104,105].

Literatürde farklı liken türlerinin antibakteriyel etkinliklerinin test edildiği birçok yayın bulunmaktadır ancak; likenlerin biyolojik aktivite seviyeleri türe göre değiştiğinden, burada özellikle çalışmamızdaki ile aynı liken türünü (*P. furfuracea*) içeren çalışmaların sonuçları karşılaştırılmıştır. Yine de liken türleri veya kullanılan yöntemler bakımından

farklılık göstermeleri nedeniyle bazı çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılmaları güç olmaktadır.

Osmanağaoğlu ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada Türkiye' nin farklı bölgelerinden toplanan *Letaria vulpina*, *Pseudoevernia furfuraceae* var. *furfuraceae* ve *Evernia divericata* liken örneklerinden aseton ve kloroform çözeltileri ile hazırlanan ekstreler Gram pozitif çomak ve koklar, Gram negatif çomaklar ve *Candida albicans* üzerinde denenmiş ve bizim çalışmamıza paralel olarak Gram pozitif bakterilerde inhibisyon zonları görülürken Gram negatif bakterilerde herhangi bir etki görülememiştir. Gram pozitif bakterilerle yapılan deneylerde; aseton ile hazırlanan liken ekstrelerin zon çapları, kloroform ile hazırlanan ekstrelerin oluşturduğu zon çaplarına oranla daha büyük bulunmuştur. Böylece ekstre elde ediliminde aseton kullanımının kloroform kullanımına göre daha büyük çaplarda inhibisyon zonu oluşumu sağladığını göstermişlerdir [60].

Mitrovic ve ark. (2014) tarafından *Platismatia glauca* ve *Pseudevernia furfuracea* liken türlerinin antimikrobiyal, antioksidan ve antibiyofilm özellikleri üzerine yapılan araştırmada altı Gram pozitif; *Bacillus pumilus* NCTC 8241, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Enterococcus faecalis* ve beş Gram negatif; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium* bakteri suşları ile 9 farklı türde mantar ile çalışılmış ve farklı çözücüde gösterdikleri etkileri karşılaştırılmıştır. Her iki türünde benzer etki gösterdiği fakat *Pseudevernia furfuracea*' nın daha yüksek antimikrobiyal etki ve antioksidan kapasitesi olduğu gözlemlenmiştir. Antibakteriyel aktivite mikrodilüsyon yöntemi ile, antioksidan kapasite ise DPPH yöntemi ile çalışılmış ve *P. furfuracea*' nın metanol ekstraktları en yüksek IC50 değeri olan (95.33 µg / mL) en güçlü antioksidan aktivitelerini sergilemiştir. *Pseudevernia furfuracea*' nın metanol ekstraktı, diğer çözücülere kıyasla, *Staphylococcus aureus* üzerinde 1.25 mg / mL' de ve *Proteus mirabilis*' de 0.63 mg / mL'de BIC değeriyle daha kuvvetli olduğunu göstermişlerdir. Buna göre *P. furfuracea* likeni için metanolün asetondan daha iyi bir çözücü olduğu düşünülebilir. İki çalışma arasında, aynı liken türü için dahi (*P. furfuracea*), toplandığı bölgeler, antimikrobiyal aktivitede kullanılan yöntem (mikrodilüsyon) ve kullanılan çözücüler bakımından farklılıklar bulunduğu görülmektedir [57].

Acar ve ark. (2010) tarafından yapılmış bir çalışmada farklı bölgelerden toplanan *Physcia oipolia* (Ehrh. ex Humb.) Furnrohr., *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm., *Peltigera aphosa* (L) Willd., *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf., *Parmelia taractica* Kremp. liken örneklerinin etanol ekstreleri hazırlanmış ve hazırlanan ekstreler *Escherichia coli* ATCC 11230, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Proteus vulgaris* ATCC 6899, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Micrococcus luteus* CCM 169, *Debaryomyces hansenii* DSM 70238, *Candida lypolitica* ATCC 8660, *Candida albicans* ATCC 10231, *Rhodotorula rubra* DSM 70403 ve *Kluyveromyces fragilis* ATCC 8608 test mikroorganizmalarında disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktiviteleri çalışılmıştır. Hazırlanan ekstreler steril disklere 50 µL emdirilerek besi yerlerine yerleştirilmiş ve inkübasyon süreleri sonunda zon ölçümleri yapılmıştır. *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. liken ekstreleri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P suşunda 14.0 mm' lik inhibisyon çapı oluşturması ile çalışmamızla benzer sonucu verirken, *Escherichia coli* ATCC 11230 suşunda 14.0 mm zon oluşturması ile çalışmamızdan farklı sonuç vermiştir. Bu farklılık likenin farklı bölgelerden toplanmasından kaynaklanabilecek farklı sekonder içeriği, ekstrelerin asetondan farklı olarak etanol ile hazırlanmasından kaynaklanabilir [61].

Gücin ve ark. (1997) tarafından *P. furfuracea* ile yapılan diğer bir çalışma ise *P. furfuracea*' nın aseton, kloroform, etil asetat ve etanol ekstreleri hazırlanarak antibakteriyel aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda; Gram negatif bakterilere karşı hiçbir etki olmazken Gram pozitif bakterilerden *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *B. subtilis*'e karşı tüm ekstrelerde antibakteriyel etki saptanmıştır. Ancak etanol, etil asetat ve kloroform ekstrelerinin kullanılması nedeniyle çözücü bakımından çalışmamız ile farklıdır [41].

Güvenç ve ark. (2012) tarafından *P. furfuracea* üzerinde disk difüzyon ile yapılan diğer bir çalışma ise çalışmamızı destekler nitelikte sonuçlara sahiptir. Buna göre *E. coli* üzerinde etki göstermeyen ekstrelerin Gram pozitif mikroorganizmalara karşı belirgin aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Ancak metanol, etil asetat ve diklorometan ekstrelerinin kullanılması nedeniyle çözücü bakımından çalışmamız ile farklıdır [106].

*P. furfuracea* likeninin antioksidan kapasitesiyle ilgili pek az çalışma bulunmaktadır. Örneğin *P. glauca* ve *P. furfuracea* türlerinin güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğu kaydedilen Mitrović ve ark. (2014)'in çalışmasında yöntem bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Çalışmada su ve metanol ekstraları radikal süpürücü kapasite yöntemi olan (-Difenil-1-pikrihidrazil) DPPH ile değerlendirilmiştir [57]. Yine Güvenç ve ark. (2012) tarafından *P. furfuracea* üzerinde DPPH yöntemiyle fakat farklı çözücülerle yapılan antioksidan kapasite çalışmasında metanol ekstralarına göre daha düşük bulunmuştur [106].

Sarıkürkçü ve ark. (2016) tarafından *P. furfuracea* metanol ve su ekstralarının in vitro antioksidan kapasiteleri ve enzim önleme faaliyetlerinin değerlendirildiği bir çalışmada yine metanol ekstralarının hem fenolik hem de flavonoid bileşikler bakımından zengin olduğu kaydedilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız aseton ekstralarından farklı olarak, bu çalışmalarda metanol ile hazırlanmış olan *P. furfuracea* ekstralarının belirgin olarak daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir [25].

Biyolojik aktivite üzerine yapılan çeşitli *in vitro* çalışmalar, likenlerin bazı doğal ve deneysel faktörlere bağlı olarak değişen oranlarda antibakteriyel etkileri ve antioksidan kapasiteleri olduğunu ortaya koymaktadır. Ülkemizde doğal yayılışı çok olan *P. furfuracea* likeninin antibakteriyel ve antioksidan etkilerinin araştırıldığı bu çalışma ise, likenin toplandığı yer ve aseton çözücü kullanılması nedeniyle diğerlerinden farklılık göstermektedir. Aynı liken üzerine yapılan diğer çalışmaların sonuçları, uygulanan yöntemlerdeki farklılıklara bağlı olarak değişmektedir. Bununla birlikte bu liken türünün genel anlamda hem antibakteriyel hem antioksidan potansiyele sahip olduğunu söylemek mümkündür. Tüm bu farklı sonuçlara rağmen likenlerin alternatif bir antibiyotik ve/veya antioksidan olarak kullanılabilmesi söylenebilir.

## BÖLÜM 4

### 4. SONUÇLAR

Likenlerin yaşamlarını sürdürebilmelerinde liken maddelerinin rolü büyüktür. Yetiştikleri habitatlarda kendilerini mikroorganizmalara, böceklere, radyasyona, vb. etkilere karşı koruyabilmeleri için sekonder metabolitleri ürettikleri birçok yayında belirtilmiştir [2,8,10,107]. Likenlerin kendilerine özgü ürettikleri bu sekonder metabolitler sayesinde çeşitli biyolojik aktiviteler gösterdikleri bilinmektedir. Bu çalışmada *Pseudevernia furfuracea* likeninden atrarik asit [57,106], atranorin [57,108], fisodik asit, oksifisodik asit, fisodalik asit, virensik asit [108], kloratranorin, metil hematomat, metil klorohematomat [106], absisik asit, poliaminler (putresin and spermidin) [109] ve furfurik asit [110] gibi metabolitler elde edilmiştir. *P. furfuracea* (var. *ceratea*) likeninin aseton ekstresinden izole edilen olivetorik asitin güçlü anti-anjiyogenik aktivite sergilediği ve bununla birlikte diklorometan, aseton ve metanol ekstreleri arasında en yüksek antioksidan kapasitesinin aseton ekstresinde olduğu rapor edilmiştir [111].

Çalışmamızda ülkemizdeki ormanlarda geniş yayılış gösteren dalsı ağaç likeni *Pseudevernia furfuracea* likeni aseton ekstrelerinin ikisi Gram pozitif ve ikisi Gram negatif olan 4 bakteriye karşı disk difüzyon yöntemiyle antibakteriyel aktivitesi ve bunun yanında CUPRAC yöntemi ile antioksidan kapasitesi incelenmiştir. Çözücü olarak asetonun tercih edilmesinin nedeni asetonun liken içindeki sekonder metabolitler için iyi bir çözücü olduğunun literatürde sıklıkla kaydedilmesidir [109,110,111]. Bakterilere karşı inhibisyon aktiviteleriyle ilgili çalışmalarda test edilecek olan liken ekstrelerinin hazırlanmasında kullanılan farklı çözücülerin farklı metabolitleri aktif hale getirdikleri görülmüştür. Nitekim, liken sekonder metabolitleri ve likenlerin biyolojik aktiviteleriyle ilgili çok sayıda çalışmadan oluşan güncel bir derlemede; likenlerin türlerine, sekonder metabolit içeriklerine ve yetiştikleri ortama bağlı olarak değişen oranlarda antimikrobiyal etkiler gösterdikleri ve bununla birlikte kullanılan çözücü ya da yöntemsel farklılıkların da etkinlik düzeylerini etkilediği bilgisi verilmiştir [107].

Çalışmamızda test edilen *P. furfuracea* aseton ekstreleri, Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* ve *E. faecalis* üzerinde orta seviyede antibakteriyel etki gösterirken, Gram

negatif bakterilerden olan *E.coli* ve *P.aureginosa* üzerinde herhangi bir inhibe edici etkisi olmadığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar yapılan literatür tarama çalışmalarını destekler niteliktedir. *P. furfuracea* ekstralarının CUPRAC ile test edilen antioksidan kapasitesi Cu(II)-neokuproin (Nc) reaktifini Cu (I)-Nc kelatına indirgeme özelliği ve alınan sonuçlar neticesinde oldukça yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Günümüzde mikroorganizmaların mevcut antibiyotiklere gösterdikleri direncin artışı, bitkisel kaynaklı antibiyotik ve antioksidan arayışına yönelimin ve bu konuda yapılan çalışmaların artmasını sağlamıştır. Bu çalışma, seçilen türün geleneksel tıbbi kullanıma sahip olması ve aseton ekstralarının test edilmesi yönüyle diğer çalışmalardan ayrılmaktadır. Çalışmamızın doğal bitkisel kaynaklarımız olan likenlerden gelecek yıllarda özellikle sağlık alanında ve ilaç sektöründeki çalışmalarda alternatif antibiyotik ve antioksidan olarak yararlanılabilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKÇA

1. Nash III TH. (1996). *Lichen Biology*, Cambridge: Cambridge University Press, Great Britain.
2. Dayan, F. E., & Romagni, J. G. (2001). Lichens as a potential source of pesticides. *Pesticide Outlook*, 12(6), 229-232.
3. Huneck, S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 86(12), 559-570.
4. Çobanoğlu, G., Sesal, C., Açıkgöz, B., & Karaltı, İ. (2016). Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Physcia aipolia*, *Xanthoria parietina*, *Usnea florida*, *Usnea subfloridana* and *Melanohalea exasperata*. *Modern Phytomorphology*, 10, 19-24.
5. Miao, V., Coëffet-LeGal, M. F., Brown, D., Sinnemann, S., Donaldson, G., & Davies, J. (2001). Genetic approaches to harvesting lichen products. *TRENDS in Biotechnology*, 19(9), 349-355.
6. Oran S., (2006). Liken Maddeleri (I). Liken maddelerinin liken yaşamındaki önemi. *TLT Bülteni*, 3: 8-11.
7. Harmala, P., Hiltunen, R., Oksman-Caldentey, K. M., Laakso, T., & Kauppinen, V. (1992). Isolation and in vitro cultivation of lichen algae and their antimicrobial properties. *Fitoterapia*, 63, 217-225.
8. Lawrey, J. D. (1986). Biological role of lichen substances. *Bryologist*, 111-122.
9. Burkholder, P. R., Evans, A. W., McVeigh, I., & Thornton, H. K. (1944). Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 30(9), 250-255.
10. Lawrey, J. D. (1989). Lichen secondary compounds: evidence for a correspondence between antiherbivore and antimicrobial function. *Bryologist*, 326-328.
11. Tamer, A.Ü., Özdemir, A., Türe, C., (1991). Likenlerin Antimikrobiale Aktiviteleri Üzerinde Bir Araştırma, Anadolu Üniversitesi, *Fen-Edebiyat Dergisi*, 3 (2), 49-54.
12. Zeybek, U., Volker, (1992). J. Likenler (Lichenes) Kimyasal Bileşikleri ve Tıbbi Kullanımları, *Pharmacia-JTPA*, 32 (1), 37-48.
13. Zeybek, U., Lumbsch, H.T., Feige, G.B., Elix, J. A. & John, V., (1993). Chemosyndromic Variation in *Hypogymnia* Species, mainly from Turkey (lichenized Ascomycotina), *Crypt. Bot.* 3, 260-263.

14. Öztürk, Ş., Güvenç, Ş., (1995). Farklı Bölgelerden Toplanan Liken Örneği *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea*'nın Antimikrobiyal Etkilerinin Karşılaştırılması. *Tr. J. of Botany* 19, 145-148.
15. Öztürk, Ş., Güvenç, Ş., (1994). *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea* Eksteresi ile Çeşitli Antibiyotiklerin Antimikrobiyal Etkilerinin Karşılaştırılması, XII. Ulusal Biyoloji Kongresi Cilt III, S. 71-74, Edirne.
16. Galun, M. (1989). *CRC handbook of lichenology* (Vol. 3). CRC Press, London, 55-72.
17. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford.
18. Shahidi, F., (1996). *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.
19. Machlin, L. J., & Bendich, A., (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1(6), 441-445.
20. Fang, Y. Z., S. Yang, and G. Wu., (2002). "Free radicals, antioxidants, and nutrition Nutrition, 18." 872-879.
21. Fu, W., Chen, J., Cai, Y., Lei, Y., Chen, L., Pei, L., ... & Ruan, J. (2010). Antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective potential of the extract from *Parathelypteris nipponica* (Franch. et Sav.) Ching. *Journal of ethnopharmacology*, 130(3), 521-528.
22. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
23. Kopáni, M., Celec, P., Danišovič, L., Michalka, P., & Biró, C. (2006). Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica chimica acta*, 364(1-2), 61-66.
24. Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4113-4117.
25. Sarikurkcu, C., Kocak, M. S., Calapoglu, M., Ocal, C., & Tepe, B. (2016). Biological and phytochemical evaluation: *Pseudevernia furfuracea* as an alternative multifunctional agent. *Journal of Functional Foods*, 24, 11-17.
26. Karamanoğlu, K. (1971): *Ank Üniv Ecz Fak Mec.*, 1(1), 53-75.

27. Shibata, S., Ukita, T., Tamura, T., & Miura, Y. (1948). Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and its derivatives. *The Japanese Medical Journal*, 1(2), 152-155.
28. <http://biyolojiegitim.yyu.edu.tr/mk/bs7/li.htm> Erişim tarihi: 11.04.2016.
29. Zeybek, N., Güner, H., & Aysel, V. (1986, September). The marine algae of Turkey. In *Proceedings of the 5th Optima Meeting Istanbul* (pp. 8-15).
30. Güner, H. (1986). Likenlerin biyolojisi ve Ege bölgesinde bulunan bazı türleri. Ege Üniversitesi Yayınları, ss. 2-18, İzmir.
31. Ahmadjian, V. (1993). The Lichen Symbiosis. *New York: Wiley*;1-264.
32. Armstrong, R. A. (2004). Lichens, lichenometry and global warming. *Microbiologist*, 5(3), 32-35.
33. <http://www.biyologlar.com/liken-biyocesitliligi-acisindan-uludagin-onemi> Erişim tarihi: 24.07.2016.
34. Henderson, D. and H. Prentice (1969). "Contributions to the bryophyte flora of Turkey. VIII." *Edinb Roy Bot Gard Notes*.
35. Solak, S. (2016). Fatih ormanlarının (Şişli, İstanbul) likenleri Selçuk Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans tezi, 83 s, Konya.
36. Schindler, H. (1988). Zur Geschichte der Anwendung von Flechten (lichenes) in der Medizin. *Carolinea*, 46, 31-42.
37. Kumar KC, S., & Müller, K. (1999). Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *Journal of natural products*, 62(6), 821-823.
38. Demleitner, S., Kraus, J., & Franz, G. (1992). Synthesis and antitumour activity of derivatives of curdian and lichenan branched at C-6. *Carbohydrate research*, 226(2), 239-246.
39. Süleyman, H., Yildirim, D., Aslan, A., Göçer, F., Gepdiremen, A., & Güvenalp, Z. (2002). An Investigation of the Antiinflammatory Effects of an Extract from *Cladonia rangiformis* HOFFM. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(1), 10-13.
40. Fournet, A., Ferreira, M. E., de Arias, A. R., de Ortiz, S. T., Inchausti, A., Yalaff, G., ... & Hidalgo, M. E. (1997). Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 116(1), 51-54.

41. Gücin, F., Dülger, B., & Aslan, A. (1997). *Pseudoevernia furfuracea* (L.) Zopf likeninin antimikrobiyal aktivitesi. *Ekoloji-Çevre Dergisi*, 7(25), 22-24.
42. Neamati, N., Hong, H., Mazumder, A., Wang, S., Sunder, S., Nicklaus, M. C., ... & Pommier, Y. (1997). Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *Journal of medicinal chemistry*, 40(6), 942-946.
43. Vartia, KO. (1950). Antibiotics in Lichens. I. *Ann-Med*, ex: tl. *Biol. Fenn.* 27: 46-54. II. *Ebenda.* 28: 7-19.
44. Stocker-Wörgötter, E. (2008). Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports*, 25(1), 188-200.
45. Dülger, B., Gücin, F., & Aslan, A. (1998). *Cetraria islandica* (L.) Ach. likeninin antimikrobiyal aktivitesi. *Turkish Journal of Biology*, 22, 11-118.
46. Dülger, B., Gücin, F., Kara, A., & Aslan, A. (1997). *Usnea florida* (L.) Wigg. likeninin antimikrobiyal aktivitesi. *Turkish J Biology*, 21, 103-108.
47. Culberson WL. (1970). Chemosystematics and ecology of lichens-forming fungi. *Ann Rev Ecol Sys.* 1:153-70.
48. Manojlovic, N. T., Solujic, S., & Sukdolak, S. (2002). Antimicrobial activity of an extract and anthraquinones from *Caloplaca schaeereri*. *The Lichenologist*, 34(1), 83-85.
49. Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., ... & Marković, S. (2011). Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8), 5428-5448.
50. Çöleri, A., & Çökmüş, C., Enterokok Türlerinde Glikopeptid Grubu Antibiyotiklere Direncin Moleküler Mekanizmaları Ve Gen Aktarım Yolları. *Cilt/Vol 65 Sayı/Number 2 Yıl/Year 2008*, 87.
51. [http://www.megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller\\_pdf/Antibiyotik%20Duyarlilik%20Testi.pdf](http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Antibiyotik%20Duyarlilik%20Testi.pdf) Erişim tarihi: 23.8.2015
52. Özyiğitoğlu, G. (2017). New Proposals for The Turkish Lichen Terminology. *Avrasya Terim DERGİSİ*, 5(2), 14-18.
53. <http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf> Erişim tarihi: 6.08.2016

54. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4), 493-496.
55. Özer, E., (2012). Nane (*Mentha piperita* L.)'nin Farklı Kısımlarına Uygulanan Farklı Kurutma Tekniklerinin Uçucu Yağın Bileşimine Ve Antimikrobiyel Aktivitesi Üzerine Etkisi, Ankara Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
56. Tuncer, E. İ., (2011). Antibiyotik Duyarlılık Testlerinde Etest Prensibi, Önemi ve Saklama Koşulları, S.Ü. Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Ders Notları, Konya.
57. Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Radulovic, N., Mladenovic, M., Stankovic, M., ... & Comic, L. (2014). *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. *EXCLI journal*, 13, 938-953.
58. Manojlovic, N. T., Vasiljevic, P. J., Maskovic, P. Z., Juskovic, M., & Bogdanovic-Dusanovic, G. (2012). Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (*Umbilicariaceae*). *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2012.
59. Karagouml, A., Doğruoöz, N., Zeybek, Z., & Aslan, A. (2009). Antibacterial activity of some lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(12), 1034-1039.
60. Osmanağaoğlu, Ö., Yıldız, A., & Saçılık, S. (2000). Türkiye'deki farklı bölgelerden izole edilen likenlerin antimikrobiyal aktiviteleri. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg*, 30, 17-19.
61. Acar, G. S., (2010). Bazı Liken Türlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Araştırmalar. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale.
62. Abdullah, S. T., Hamid, H., Ansari, S. H., & Alam, M. S. (2006). Antimicrobial activity of *Parmelia perlata*. *Hamdard Medicus (Pakistan)*.
63. Candan, M., Yılmaz, M., Tay, T., Kıvança, M., & Türk, H. (2006). Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Xanthoparmelia pokornyi* and its gyrophoric and stenosporic acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(5-6), 319-323.

64. Cansaran, D., Çetin, D., Halıcı, M. G., & Atakol, O. (2006). Determination of usnic acid in some *Rhizoplaca* species from Middle Anatolia and their antimicrobial activities. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(1-2), 47-51.
65. Cansaran, D., Kahya, D., Yurdakulol, E., & Atakol, O. (2006). Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of Anatolia and antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(11-12), 773-776.
66. Saenz, M. T., Garcia, M. D., & Rowe, J. G. (2006). Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain. *Fitoterapia*, 77(3), 156-159.
67. Türk, H., M. Yılmaz, T. Tay, A. Ö. Türk and M. Kıvanç (2006). "Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin, and olivetoric acid constituents." *Zeitschrift für Naturforschung C* 61(7-8): 499-507.
68. Rhee, M. H., Park, H. J., & Cho, J. Y. (2009). *Salicornia herbacea*: Botanical, chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(8), 548-555.
69. Hawksworth, D. L., Blanco, O., Divakar, P. K., Teuvo, A. H. T. I., & Crespo, A. (2008). A first checklist of parmelioid and similar lichens in Europe and some adjacent territories, adopting revised generic circumscriptions and with indications of species distributions. *The Lichenologist*, 40(1), 1-21.
70. Burton, G. W., Foster, D. O., Perly, B., Slater, T. F., Smith, I. C. P., & Ingold, K. U. (1985). Biological antioxidants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 311(1152), 565-578.
71. Sen, S., & Chakraborty, R. (2011). The role of antioxidants in human health. In *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy* (pp. 1-37). American Chemical Society.
72. Aydemir, B., & Sarı, E. K. (2014). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2), 56-60.
73. Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., & De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3(1), 91-100.

74. Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89-96.
75. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
76. Willcox, J. K., Ash, S. L., & Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(4), 275-295.
77. Şener G, Yeğen Berrak Ç. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*. 2009; 22: 5-13
78. Aslan, R., & Dündar, Y. (1999). Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller, Antioksidanlar. *İnsizyon Cer. Tıp Bil. Der*, 2(2), 134-142.
79. Kinoshita, K., Togawa, T., Hiraishi, A., Nakajima, Y., Koyama, K., Narui, T., ... & Takahashi, K. (2010). Antioxidant activity of red pigments from the lichens *Lethariella sernanderi*, *L. cashmeriana*, and *L. sinensis*. *Journal of natural medicines*, 64(1), 85-88.
80. Odabaşoğlu, F., Aslan, A., Cakir, A., Süleyman, H., Karagöz, Y., Halıcı, M. and Bayır, Y. 2005. Antioxidant activity, reducing power and totalphenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, 76 (2005) 216–219.
81. 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.
82. Gulluce, M., Aslan, A., Sokmen, M., Sahin, F., Adiguzel, A., Agar, G., & Sokmen, A. (2006). Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine*, 13(7), 515-521.
83. Öz, D., (2013). Anamur ( Mersin ) İlçesinin Liken Çeşitliliği, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 150 s, Mersin.
84. Nevin Hocaoglu, 2011. Uludağ'da (Bursa) Yayılış Gösteren Titrek Kavak (*Populus Tremula* L.) Üzerindeki Epifitik Liken Çeşitliliğinin Belirlenmesi Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 114 s, Bursa.
85. Joulain, D., & Tabacchi, R. (2009). Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 2: treemoss. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(3), 105-116.

86. Cabeen, M. T., & Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 601.
87. Young, K. D. (2006). The selective value of bacterial shape. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(3), 660-703.
88. Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
89. Stryer L., Berg J. M., Tymoczko J. L. (2002). Biochemistry (5th ed.). San Francisco: W.H. Freeman. ISBN 0-7167-4955-6.
90. Heijenoort, J. V. (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*, 11(3), 25R-36R.
91. Gram, C. (1884). Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medicin*, 2, 185-189.
92. Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, 3(2), reviews0003-1.
93. Walsh, F. M., & Amyes, S. G. (2004). Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Current opinion in microbiology*, 7(5), 439-444.
94. Halkman, A. K., (2013). Gıda Mikrobiyolojisi II ders notları. Ank. Üniv. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü.
95. Celebi, S., Hacimustafaoglu, M., Ozdemir, O., & Ozakin, C. (2007). Nosocomial Gram-positive bacterial infections in children: Results of a 7 year study. *Pediatrics International*, 49(6), 875-882.
96. Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn, W. C. (1997). The Gram positive cocci Part II: Streptococci, Enterococci, and the "Streptococci-Like" Bacteria. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Lippincott, 577-649.
97. Iglewski BH (1996). "Pseudomonas". In Baron, S; et al. Baron's Medical Microbiology (4th ed.). University of Texas Medical Branch. ISBN0-9631172-1-1.
98. Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2004). Enteroviruses. *Sherri's Medical Microbiology (4th ed.)*. McGraw Hill, 535-537. ISBN 0-8385-8529-9.

99. Topçu A. W., Söyletir G., Doğanay M., (2017). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 3.baskı. s.2136- 47.
100. Forbes B. A., Sahm D. F., Weissfeld A. S., Enterobacteriaceae. In Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. Elevent Edition, 2000: 365-377, Michigan, ISBN 0815125356, 9780815125358.
101. McNally, A., Alhashash, F., Collins, M., Alqasim, A., Paszckiewicz, K., Weston, V., & Diggle, M. (2013). Genomic analysis of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* urosepsis. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(8) 328-334.
102. Laupland, K. B. (2013). Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clinical microbiology and infection*, 19(6), 492-500.
103. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
104. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., & Ginsberg, H. S. (1980). *Actinomycetes: the fungus-like bacteria. Microbiology. 3rd ed. Philadelphia: Harper & Row*, 743-747.
105. Barber, M. (1961). Methicillin-resistant *staphylococci*. *Journal of clinical pathology*, 14(4), 385.
106. Güvenç, A., Akkol, E. K., Süntar, İ., Keleş, H., Yıldız, S., & Çalış, İ. (2012). Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds. *Journal of ethnopharmacology*, 144(3), 726-734.
107. Özyiğitoğlu, G. Ç., Açıkgöz, B., & Sesal, C. (2016). Lichen secondary metabolites: Synthesis pathways and biological activities. *Acta Biologica Turcica*, 29(4), 150-163.
108. Proksa, B., Adamcova, J., Sturdikova, M., & Fuska, J. (1994). Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. and their inhibition potential of proteolytic enzymes. *Die Pharmazie*, 49(4), 282-283.
109. Unal, D., Senkardesler, A., & Sukatar, A. (2008). Abscisic acid and polyamine contents in the lichens *Pseudevernia furfuracea* and *Ramalina farinacea*. *Russian journal of plant physiology*, 55(1), 115-118.
110. Gunzinger, J., & Tabacchi, R. (1985). Isolement et identification de l'acide furfurique, nouvelle depsidone du lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Ach. *Helvetica chimica acta*, 68(7), 1936-1939.

111. Koparal, A. T., Ulus, G., Zeytinoglu, M., Tay, T., & Türk, A. Ö. (2010). Angiogenesis inhibition by a lichen compound olivetoric acid. *Phytotherapy research*, 24(5), 754-758.



## **ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Sinem GÜLTEKİN

Doğum Yeri : İstanbul

Doğum Tarihi : 16.07.1990

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : İzzet Ünver Lisesi 2003-2006

Lisans : Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü 2008-2013

Yüksek Lisans : Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı  
2013-2018

### Çalıştığı Kurumlar

Özel Zafer Eğitim Kurumları Biyoloji Öğretmenliği (2009-2011)

Bakırköy Acıbadem Hastanesi Merkez Laboratuvarı Biyolog (2013-2017)

Liv Hospital Transfüzyon Merkezi Sorumlu Tekniker (2017- devam)