



**T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Ramalina farinacea* (L.) Ach. ve *Usnea intermedia* (A.Massal.) Jatta
LİKENLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ARAŞTIRMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NESLİHAN ŞİRİN

HAZİRAN 2015

DÜZCE

KABUL VE ONAY BELGESİ

Neslihan ŞİRİN tarafından hazırlanan “*Ramalina farinacea* (L.) Ach. ve *Usnea intermedia* (A.Massal.) Jatta Likenlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Araştırmalar” isimli lisansüstü tez çalışması, Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun 15/06/2015 tarih ve 2015/555 Sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye

(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Başaran DÜLGER

Düzce Üniversitesi

Üye

Yrd. Doç. Dr. Emel ÇALIŞKAN

Düzce Üniversitesi

Üye

Yrd. Doç. Dr. Ersin KARABACAK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Tezin Savunulduğu Tarih: 26/06/2015

ONAY

Bu tez ile Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Neslihan ŞİRİN’in Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans derecesini almasını onamıştır.

Prof. Dr. Haldun MÜDERRİSOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

26 Haziran 2015

Neslihan ŞİRİN

Sevgili Aileme...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ve bu tezin hazırlanması süresince gösterdiği yardımlarından dolayı danışmanım Prof. Dr. Başaran DÜLGER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam için gerekli liken materyalin temin ve teşhis edilmesini sağlayan Arş. Gör. Dr. Seyhan ORAN'a teşekkür ederim.

Öğrenim hayatımda hep yanımda olan dostlarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca yanımda olan ve olacak olan, bugünlere gelmem için gereken gücü veren, maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, başarılarımla gurur duyan babam Hasan ŞİRİN'e, annem İpek ŞİRİN'e, abim Bayram ŞİRİN'e ve ablam Nagihan YILMAZ'a en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

26 Haziran 2015

Neslihan ŞİRİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	IV
ÇİZELGE LİSTESİ	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
ÖZET	1
ABSTRACT	2
EXTENDED ABSTRACT	3
1. GİRİŞ	6
2. GENEL BİLGİLER VE ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	8
2.1. LİKENLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ	8
2.1.1. Likenlerin Sekonder Metabolitleri	8
2.1.2. Likenlerin Kullanım Alanları	8
2.1.2.1. Likenlerin Tıbbi Alanda Kullanımı	8
2.1.2.2. Likenlerin Diğer Kullanım Alanları	10
2.2. ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN GENEL ÖZELLİKLERİ	10
2.2.1. Antibakteriyel Maddeler	11
2.2.2. Antifungal Maddeler	12
2.3. ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIĞIN BELİRLENMESİ	13
2.3.1. Disk Difüzyon Testi	14
2.3.2. Kuyu Difüzyon Testi	14
2.3.3. Broth Dilüsyon Testi	14
2.3.4. Agar Dilüsyon Testi	14

2.3.5. E Testi	15
2.4. BAZI LİKENLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. MATERYAL	23
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Liken Türleri	23
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Test Mikroorganizmaları	23
3.1.3. Kullanılan Çözücü	23
3.2. YÖNTEM	24
3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı	24
3.2.2. Mikroorganizmaların ve Disklerin Hazırlanışı	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. ARAŞTIRMA BULGULARI	25
4.1.1. <i>Ramalina farinacea</i> (L.) Ach. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi	25
4.1.2. <i>Usnea intermedia</i> (A.Massal) Jatta Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi	29
4.2. TARTIŞMA	32
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	49
6. KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	56

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Ramalina farinacea</i> etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL	44
Şekil 2. <i>Ramalina farinacea</i> etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL	44
Şekil 3. <i>Ramalina farinacea</i> etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Candida tropicalis</i> ATCC 4563 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL	45
Şekil 4. <i>Ramalina farinacea</i> etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Debaryomyces hansenii</i> DSM 70238 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL	45
Şekil 5. <i>Ramalina farinacea</i> etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL	46
Şekil 6. <i>Usnea intermedia</i> etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 32045 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL	46
Şekil 7. <i>Usnea intermedia</i> etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL	47
Şekil 8. <i>Usnea intermedia</i> etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL	47
Şekil 9. <i>Usnea intermedia</i> etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL	48
Şekil 10. <i>Usnea intermedia</i> etanol ekstraktı konsantrasyonlarının <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL	48

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1. <i>Ramalina farinacea</i> likeninin antifungal aktivitesi	38
Çizelge 2. <i>Ramalina farinacea</i> likeninin antibakteriyel aktivitesi	39
Çizelge 3. <i>Usnea intermedia</i> likeninin antifungal aktivitesi	41
Çizelge 4. <i>Usnea intermedia</i> likeninin antibakteriyel aktivitesi	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

AK	Amikacin 30
AMB	Amphotericin 100
ATCC	American Type Culture Collection
CCM	Czechoslovak Collection of Microorganisms, Brno, Czechovakla
CLT	Clotrimazole 10
DSM	Deutsche Sammlung von Microorganismen, Grisebachstrasse 80-3400 Göttingen, Germany
E	Erythromycin 15
FF	Fosfomycin 50
FLU	Fluconazole 25
GRS	Griseofulvin 10
IPM	Imipenem 10
ITR	Itraconazole 10
K	Kanamycin 30
KTC	Ketoconazole 10
MCZ	Miconazole 10
MHA	Müller Hinton Agar
MHB	Müller Hinton Broth
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
N	Neomycin 30
NR	Nitrofurazone 100
NY	Nystatin 100
P	Penicillin G 10U
S	Streptomycin 10
TE	Tetracycline 30
TOB	Tobramycin 10
VA	Vancomycin 30
5FC	Flucytosine 1
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mm	Milimetre

ÖZET

***Ramalina farinacea* (L.) Ach. VE *Usnea intermedia* (A.Massal.) Jatta LİKENLERİNİN ANTIMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Neslihan ŞİRİN
Düzce Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Başaran DÜLGER
Haziran 2015, 66 sayfa

Bu çalışmada Bursa-Uludağ Milli Park civarından toplanan *Ramalina farinacea* ve *Usnea intermedia* likenlerinin Soxhlet cihazında etanol ekstraksiyonları yapıldı. Bu ekstraktlerden 25µL, 50µL ve 75µL alınarak disk difüzyon yöntemi ile *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 3699, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Yersinia pestis* ATCC 19428 bakteri türleri ve *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida lipolytica* ATCC 8660, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 4563, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045, *Debaryomyces hansenii* DSM 70238, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9796 maya kültürlerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldı. Sonuçlar standart antifungal ve antibakteriyel antibiyotiklerle karşılaştırıldı ve kontrol olarak sadece çözücünün emdirildiği diskler kullanıldı. Bulgulara göre; *Ramalina farinacea* likeninin en yüksek antimikrobiyal aktivitesi *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ve *Candida albicans* ATCC 90028 türlerine karşı bulundu. *Usnea intermedia* likeninin en yüksek antimikrobiyal aktivitesi *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 ve *Candida albicans* ATCC 90028 türlerinde ölçüldü. Liken türlerinin diğer tüm mikroorganizmalara karşı farklı seviyelerde antimikrobiyal aktivite gösterdikleri saptandı.

Anahtar sözcükler: Antimikrobiyal aktivite, *Ramalina farinacea*, *Usnea intermedia*

ABSTRACT

THE STUDIES ON ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF THE LICHENS

Ramalina farinacea (L.) Ach. AND *Usnea intermedia* (A.Massal.) Jatta

Neslihan SIRIN

Duzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Basaran DULGER

June 2015, 66 pages

In this study *Ramalina farinacea* and *Usnea intermedia* lichens which were collected from The National Park around Bursa-Uludag ethanol extractions were performed in the Soxhlet. By taking 25 μ L, 50 μ L and 75 μ L of the lichen extracts were investigated antimicrobial activity against the bacterial cultures; *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 3699, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Yersinia pestis* ATCC 19428 and the yeast cultures; *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida lipolytica* ATCC 8660, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 4563, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045, *Debaryomyces hansenii* DSM 70238, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9796 with the disc diffusion method. The results were compared with standart antifungal and antibacterial antibiotics and as control was used the only solvent impregnated discs. According to the findings; the highest antimicrobial activity of *Ramalina farinacea* was found against *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 and *Candida albicans* ATCC 90028. The highest antimicrobial activity of *Usnea intermedia* was evaluated against *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 and *Candida albicans* ATCC 90028. Lichen species were determined to show at different levels of antimicrobial activity against all other microorganisms.

Keywords: Antimicrobial activity, *Ramalina farinacea*, *Usnea intermedia*

EXTENDED ABSTRACT

THE STUDIES ON ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF THE LICHENS

Ramalina farinacea (L.) Ach. AND *Usnea intermedia* (A.Massal.) Jatta

Neslihan SIRIN

Duzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Basaran DULGER

June 2015, 66 pages

1. INTRODUCTION:

Microorganisms are found and grown in all kinds natural environment are directly related to human health and daily life. While most of microorganisms are helpful, some of them are harmful and they cause various diseases in humans, animals and plants. In recent years in the fight against these diseases, interest in the use of bioactive natural products has been increasing. Antimicrobial agent is a natural or synthetic chemical that kills or inhibits the growth of microorganisms. Unlike bioactive natural products, when synthetic drugs usage for long periods create resistant organisms as well as side effects. Lichens are symbiotic organisms composed of a fungal partner (mycobiont) in association with one or more photosynthetic partners (photobiont). About 20.000 lichen species are distributed throughout the world and resistant to extreme conditions. Because of marked antimicrobial activity of secondary metabolites, lichens attract great attention of investigators as new significant sources of bioactive substances.

In this study there is an investigation of the antimicrobial spectrum of ethanol extracts of *Ramalina farinacea* and *Usnea intermedia* that grow naturally in Turkey. Thus it is aimed to shed light on pharmacological studies.

2. MATERIAL AND METHOD:

Sample of the lichens *Ramalina farinacea* and *Usnea intermedia* were collected by Dr. Seyhan ORAN (Uludag University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Bursa) on *Abies nordmanniana* subsp. *equi-trojani* from Uludag Natural Park

after 4 km, respectively at 1608 m [40°06'37.2"N, 29°05'43.4"E (06/05/2012)], at 1659 m [40°06'41.4"N, 29°06'12.3"E (11/07/2012)], Bursa, Turkey.

The microorganisms of test (*Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 3699, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Yersinia pestis* ATCC 19428, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida lipolytica* ATCC 8660, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 4563, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045, *Debaryomyces hansenii* DSM 70238, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9796) were provided from Duzce University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Bacteriology and Mycology Research Laboratory.

Lichens were extracted with ethanol (%96) in soxhlet. Stock cultures were inoculated and activated in liquid medium (Muller Hinton Broth). The 1 mL from activated microorganisms were plated on solid agar medium (Muller Hinton Agar). 25 µL-50 µL-75 µL concentrations of extract were impregnated to the blank discs of the 6 mm in diameter and placed in petri dishes. The plates were incubated at 35-37 °C for 24-48 h for bacteria, at 25-27 °C for 48-72 h for yeast. For control ethanol impregnated discs were used. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the zone of inhibition against the test organisms. Each assay in this experiment was repeated three times.

3. RESULTS AND DISCUSSION:

The antimicrobial activity values of *Ramalina farinacea* were measured on the bacteria; at 25 µL concentration from 10,0 mm to 18,6 mm, at 50 µL concentration from 10,3 mm to 23,0 mm, at 75 µL concentration from 10,0 mm to 29,6 mm, on the yeast; at 25 µL concentration from 19,6 mm to 24,0 mm, at 50 µL concentration from 22,0 mm to 27,0 mm, at 75 µL concentration from 19,3 mm to 28,3 mm. The antimicrobial activity values of *Usnea intermedia* were measured on the bacteria; at 25 µL concentration from 8,6 mm to 26,3 mm, at 50 µL concentration from 10,0 mm to 24,3 mm, at 75 µL

concentration from 9,6 mm to 30,3 mm, on the yeast; at 25 μ L concentration from 10,0 mm to 16,3 mm, at 50 μ L concentration from 8,6 mm to 24, 0 mm, at 75 μ L concentration from 10,0 mm to 29,3 mm.

Generally, extracts showed greater antimicrobial effect on yeast rather than bacteria. Compared with standart antibiotics, extracts of *Ramalina farinacea* were more effective than antibiotics on the *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 4563 and *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045. *Usnea intermedia* extracts in general were effective on *Candida albicans* ATCC 90028. Similarities and differences in the experimental results can arise from microorganisms, both solvent and different concentration of the solvent, different methods, the test material growing in different habitats.

4. CONCLUSION AND OUTLOOK:

Whereas the highest antibacterial and antifungal effect of extracts of *Ramalina farinacea* was against *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9796, extracts of *Usnea intermedia* was against *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 and *Candida albicans* ATCC 90028.

The furter investigation and research of natural grown pharmaceutical raw materials more will enable to reduce the drug problem burden of the next generation in the fight against the disease. Making a more detailed study for the usage in this field of lichens that we studied will do an impotant contribution to transition to the use of new drugs.

1.GİRİŞ

Mikroorganizmalar doğada toprak, su, hava, bitki, insan, hayvan, gıda, yem vb. her türlü ortamda bulunmakta ve gelişmektedirler. İnsan sağlığı ve günlük hayatımızla doğrudan ilgili canlılar olan mikroorganizmaların çoğu faydalı az bir kısmı zararlıdır. Ekmek, yoğurt, turşu, sirke vb. gıdalar ile antibiyotikler, aşular, organik çözücüler, alkollerin yapımında ve üretiminde mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Ayrıca, atık suların arıtılmasında ve çöplerin bertaraf edilmesinde de bu canlılardan yararlanılmaktadır. Bir kısım mikroorganizma ise besin ve yemleri bozmakta, su borularını, ahşap yapıları, kumaş vb. organik eşyaları çürütmekte, insan, hayvan ve bitkilerde çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır (Özçelik 2009).

Son yıllarda çeşitli insan, hayvan ve bitki hastalıklarının tedavisinde ve kontrolünde kullanılmak üzere doğal kaynaklı yeni preparatlara olan ilgi artmaktadır. Sentetik ilaçların uzun süre kullanımının yan etkilere sahip olduğu ve en önemlisi bu ilaçların dirençlilik oluşturduğu bilinmektedir. Bu olumsuz etkiler, sentetik ilaçlara alternatif olarak şifalı bitkilerin çeşitli hastalıkların tedavilerinde kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Kıran ve diğ. 2013).

Eskiden beri, hastalıkların tedavisinde dekoksasyon ya da infüzyon olarak kullanımı bilinen likenlerin, günümüzde mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıklara karşı antibiyotik etki yapan sekonder metabolitlerinin üzerine araştırmalar yoğunlaşmaktadır. Likenlerin sahip olduğu bu antimikrobiyal etkilerin de, yapılarında buldukları asit karakterdeki metabolitlerden kaynaklandığı tespit edilmektedir (Odabaşoğlu 2001).

Likenlerdeki sekonder metabolitlerin, enfeksiyona yol açan böcek, salyangoz, bakteri ve funguslara karşı genel biyosidler olarak veya zararlı seviyedeki güneş ışınlarına karşı koruyucu olarak rol aldığı düşünülmektedir. Bir kısmı antibiyotik ve kansorejen drog olarak test edilmiştir ve hala çalışmalara devam edilmektedir (Çobanoğlu 2012).

Son 50-60 yıl içinde kullanıma giren antibiyotikler insan yaşamında en önemli katkıyı sağlayarak, ölümcül infeksiyon hastalıklarının çoğunun başarıyla tedavisini olanaklı kılmıştır. En önemli buluşlardan olan antibiyotikler, başta uygunsuz ve gereksiz kullanımları sonucu gelişen direnç nedeniyle etkilerini önemli oranda kaybetmiştir.

Mikroorganizmalar kendilerini yok etmek için kullanılan antimikrobik maddelere er ya da geç karşı koyma gücü yani direnç kazanmaktadır (Öztürk 2002).

Küresel bir sorun haline gelen antibiyotik direnci yüzünden yeni antibiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Kemotörapatiklerin başarısızlıkla sonuçlanması ve antibiyotik dirençli patojenik mikroorganizmaların enfeksiyonları, antimikrobiyal aktiviteleri bakımından, pek çok bitki ve liken sekonder metabolitinin araştırılmasına neden olmaktadır. Farklı kaynaklardan temin edilen antimikrobiyal maddelerin antibiyotik etkisi, değişik mikroorganizmalar üzerinde test edilerek belirlenmektedir (Aydın ve Kınalıoğlu 2010).

Çeşitli kullanım alanları bulunan ve geçmişten beri tıbbi önemleri bilinen likenlerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine ülkemizde yapılan çalışmalar oldukça yetersizdir. Bu çalışmada, ülkemizde doğal olarak gelişen *Ramalina farinacea* (L.) Ach. ve *Usnea intermedia* (A.Massal.) Jatta liken türlerinden hazırlanan etanol ekstraktlarının antimikrobiyal spektrumu çeşitli fungus ve bakterilere karşı saptanmaya çalışılmıştır. Küresel bir sorun haline gelen antibiyotiklere karşı direnç ve yan etkilerin fazlalığı gibi sorunlar düşünüldüğünde liken metabolitlerinin önemi oldukça artacaktır. Bu çalışma ile ilgili iki likenden elde edilen ekstraktın antagonistik etkisinin varlığının ortaya çıkarılması ile ileride yapılacak daha detaylı farmakolojik çalışmalara bir ışık tutulması hedeflenmiştir.

2. GENEL ÖZELLİKLER VE ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. LİKENLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Likenler, mantarların alglerle bir araya gelerek meydana getirdikleri morfolojik ve fizyolojik birlikler olarak tanımlanmaktadır. Likenler, mikobiyont (mantar) ile fotobiyontun (fotosentetik yeşil alg ve/veya siyanobakteri) oluşturduğu kararlı ve sürekli ototrofik mutualistik birliklerdir. Liken birliklerinde mantar alg hayatta kalmak, büyümek ve üremek için gerekli olan karbon kaynağı olarak kullanmaktadır. Alg, fotosentez için gereken mineral ve suyu mantardan almakta ayrıca yüksek sıcaklık, zararlı ışınlar, yüksek nem gibi olumsuz koşullara karşı mantar tarafından korunmaktadır. Mantarlar bu birliktelikten daha fazla fayda sağlamaktadır. Alg ise serbest yaşayan formlarına göre daha zayıf gelişmektedir (Özenoğlu ve diğ. 2013).

Likenler, taksanomik düzende sporla üremeleri bakımından mantarlarla yakınlık gösteren ve mantarların sonunda yer alan bir gruptur. Yeryüzünde yaklaşık 20 bin türü bulunmakta, kutuplardan çöllere kadar her yerde, özellikle havası temiz habitatlarda yaşamaktadır. Ekstrem şartlara dayanıklı ve uzun ömürlü olmalarına karşın çok yavaş büyümektedirler (Çobanoğlu 2012).

2.1.1. Likenlerin Sekonder Metabolitleri

Likenler, liken maddeleri adı verilen ve pek çoğu likenlere özgü olan çeşitli metabolitler sentezlemektedirler. Yapılan araştırmalar sonucunda yapısı bilinen liken maddelerinin sayısı 1.000'e ulaşmıştır. Liken maddeleri aminoasit türevleri, şeker alkolleri, alifatik asitler, γ , δ - ve makrosiklik laktonlar, monosiklik aromatik bileşikler, kinonlar, kromonlar, ksantonlar, dibenzofuranlar, depsidler, depsidonlar, depsonlar, terpenoidler, steroidler ve karotenoidler vb. bileşikler içinde yer almaktadır (Özenoğlu ve diğ. 2013).

2.1.2. Likenlerin Kullanım Alanları

2.1.2.1. Likenlerin Tıbbi Alanda Kullanımı

Geleneksel ilaçlar, daha çok Çin'de tıbbi amaçlarla kullanılan ilaçlar olmakla birlikte önemli bir kısmını *Usnea* (Motyka) cinsi oluşturmaktadır. Bu ilaçların kullanıldığı

alanlar ise; ağız, mide, bağırsak, anüs, vajina, burun, kulak ve deri mantarları, ayrıca sistemik mantar enfeksiyonlarıdır. Bunların dışında, saçları güçlendirmede, idrar yolları sorunlarında, kemik kırıklarının tedavisinde kullanılmışlardır. Ayrıca eski zamanlarda likenlerden antibiyotik yapımı da başlamıştır. *Bryoria* Brodo-D.Hawksw. cinsi eskiden yeni doğmuş bebeklerin göbeğine enfeksiyon önleyici olarak sürülürken günümüzde, sarkma ve pörsümeye karşı kullanılmaktadır. Sindirim sistemi bozukluklarına iyi geldiği gerekçesiyle şişkinliklerin üzerine uygulanmaktadır. Kanayan yaraları durdurmak için de kullanılabilir. *Letharia* (Motyka) Krog cinsi türlerinden *Letharia vulpina* (L.) Hue türü kaynatılarak egzama ve derideki kırmızı döküntüler üzerine sürülmektedir. Ayrıca ağrılı doku zedelenmesinde, iltihap kurutmada ve iltihaplanmayı önlemede kullanılmaktadır. Ülser gibi mide rahatsızlıklarının tedavisinde, çeşitli iç hastalıklarının önlemede kullanılmaktadır. *Lobaria* (Schreb.) Hoffm. cinsi türlerinden *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. egzama tedavisinde ve tüy dökücü olarak kullanılmaktadır. Akciğer hastalıklarının tedavisinde rol almaktadır. *Lobaria quercizans* Michx. tüberküloz tedavisinde, saçları güçlendirmede, astım gibi akciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Mide ağrılarında iyi gelmektedir. *Parmelia* Ach. cinsine ait türler sıcak, yumuşak, nemli bir hamur halinde böbrek bölgesine ve omurga civarına sürülerek idrar yollarını rahatlatmaktadır. Hindistan'da bezir yağı vb. bir yağ ile karıştırılarak ensedeki halkalı kurt benzeri deri hastalıklarında, ayrıca eldeki siğilleri gidermede kullanılmaktadır. *Parmelia saxicola* (L.) Ach. karın ağrısı tedavisinde kullanılmaktadır. Hindistan pazarlarında *Parmelia* cinsi satılmakta ve afrodisyak olarak kan ve kalp hastalıkları, mide düzensizlikleri (hazımsızlık), bronşit, boğaz kuruluğu, diş ağrısı ve genel olarak bütün ağrılarda kullanılmaktadır. *Peltigera* Willd. cinsi yanıklara uygulanmakta, acıyı azaltmaktadır. Bacaktaki çürüklere ve eziklere sürülmektedir. Kanamayı durdurmakta, antiseptik olarak kullanılmaktadır. *Peltigera aphtosa* (L.) Willd. süt içinde kaynatılarak ağız yaralarının tedavisinde kullanılmaktadır. *Peltigera canina* (L.) Willd. hidrofobiye iyi geldiği sanılmaktadır. Ayrıca karaciğer bozuklukları ve sarılık tedavisinde rol oynamaktadır. Özellikle kuduz gibi hastalıkları önlemek için yapılan ilaçların hammaddesidir. *Usnea* cinsi yara tedavisinde, yanık tedavisinde, burun kanamalarında, saçları kuvvetlendirmede, saç problemlerini gidermede, deri bozukluklarında, spor sakatlanmalarında kullanılmaktadır. Terlemeyi, baş dönmesini, soğuk algınlığını, ağrıyı ve balgam oluşumunu önlemede kullanılmaktadır. Yüksek oranda antibakteriyel olduğu tespit edilmiştir. Günümüzde boğaz ağrıları için pastil ve hap üretiminde kullanılmaktadır.

Mide ağrısında taze olarak çiğnenmekte ve suyu emilmektedir. Özellikle ülserin tedavisinde kullanılmaktadır. Bazı kadın hastalıklarının, ayrıca ishal vb. bağırsak bozukluklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Öksürük şurubu (ekspektorant) olarak, akciğer sorunları ve astım hastalığında tedavi edici olarak kullanılmaktadır. *Cetraria islandica* (L.) Ach. tonik olarak, laksatif olarak, astım tedavisinde, diabet, nefrit, akciğer hastalıkları, boşaltım sistemi hastalıkları tedavisinde, öksürük ve soğuk algınlığında, İzlanda iskorbiti hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. *Hypogymnia* (Nyl.) Nyl. cinsi kabızlığı önlemede kullanılmaktadır. *Xanthoria* (Fr.) Th.Fr. cinsi böbreklerle ilgili bozukluklarda, diş ağrılarında, ayrıca öksürük şurubu olarak kullanılmaktadır. *Cladina* (Nyl.) Nyl. cinsi iç göğüs ağrılarında, bağırsak parazitlerinin temizlenmesinde, öksürük tedavisinde ve ateş düşürücü olarak kullanılmaktadır. *Parmotrema* A.Massal. cinsi acı dindirici, ateş düşürücü, kan akışını düzenleyici ilaç olarak, dizanteride, baş ağrısını önlemede, kas gevşetmede, üriner sistem bozukluklarında, idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır. *Xanthoparmelia* (Vain.) Hale cinsi derinin dökülmesiyle seyreden deri hastalıklarında, cinsel hastalıklarda (özellikle frengi), yılan ısırıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. *Roccella* DC. cinsi çocukların ateşini düşürmek için kullanılmaktadır. Ayrıca ağrılı ve yanıklı bölgelere de uygulanabilmektedir (Dilsizoğlu ve diğ. 2004).

2.1.2.2. Likenlerin Diğer Kullanım Alanları

Beslenmede, hava kirliliği indikatörlüğünde, izolasyonu sağlamada, konyak yapımında, parfümeri, kozmetik ve boya sanayiinde (*Ramalina* sp.), mumyalama prosedüründe kokuyu engellemede, turnusol kağıdı yapımında, avcılar tarafından barınak ve tuzakların kolayca bulunmasında, okun ucuna sürülerek avlanmada ya da savunmada, deri tabaklamada, çelenk süslemelerinde, bazı tahıllı içkilerin fermentasyonunda, şilte, çorap, bandaj yapımında, sigara yapımında yanıcı madde olarak farklı özellikleri ön plana çıkan çeşitli likenler kullanılmaktadır (Dilsizoğlu ve diğ. 2004).

2.2. ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizmaları öldüren ya da çoğalmalarını durduran doğal ya da sentetik kimyasallardır (Madigan ve diğ. 2012).

Antibiyotikler, bazı bakteri ve mantar cinsinden mikroorganizmalar tarafından çoğalma ortamında oluşturulmaktadır ve diğer mikroorganizmalar için mikrobiyostatik veya

mikrobiyosidal etki göstermektedir. Her antibiyotiğin tedavi edici dozlarda etkili olabildiği mikroorganizma cinslerinin hepsine birden antibiyotiğin etki spektrumu denilmektedir. Bazıları dar bazıları geniş spektrumlu etki göstermektedir (Güven ve diğ. 2009).

2.2.1. Antibakteriyel Maddeler

Prokaryotik ve ökaryotik hücreler kimyasal olarak benzer yapıdaki nükleik asit, protein, lipid ve karbonhidratları içermektedirler. Ancak besin maddelerini metabolize etmek için farklı reaksiyonlar kullanmakta, protein sentezlemekte ve enerji depo etmektedirler. Bakteri üreme ortamında çok yoğun konsantrasyonlarda bulunan antibakteriyel maddeler; bakterisit etki, az yoğun konsantrasyonlardakiler; bakteriyostatik etki göstermektedir. Antibakteriyel maddelerin etki mekanizmaları şu şekilde incelenebilir;

1- Hücre duvarı sentezine engel olanlar: Çoğalmakta olan bakterilerle aynı ortamda bulunan antibiyotikler, bakterilerin hücre duvarlarının yani peptidoglikan tabakalarının sentezlenmesine engel olmaktadır. Penisilin ve sefalosporinler peptidoglikanın sentezinde görev yapan transpeptidaz enziminin işlevini inhibe etmektedir. Peptidoglikan oluşmadığı veya bozulduğu durumlarda, protoplast, sferoplast ortaya çıkmakta, bu yapıda dayanıksız olduğundan kolayca parçalanmakta hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Hücre duvarı sentezi genç ve çoğalmakta olan bakterilerde olduğundan bu tip antibiyotiklerin etkisi de aktif çoğalma dönemi boyunca olmaktadır. Memelilerin hücrelerinde bakterilerinkine benzer hücre duvarı bulunmadığından bunlara antibiyotikler bu şekilde etkili olamamaktadırlar (Güven ve diğ. 2009).

2- Sitoplazmik membranı etkileyenler: Antibiyotikler, sitoplazmik membran üzerine zarı eritici ya da seçici geçirgenliği bozucu etki yapmaktadırlar. Gıda maddelerinin, anyon ve katyonların, aktif ve pasif transportunda önemli görev yapan membran, etkinliğinin önlenmesiyle bakterinin ölümüne yol açmaktadırlar. Bu tarz antibiyotikler arasında; polimiksin, nistatin, amfoterisin-B, tiroitsin ve tirasidin bulunmaktadır (Güven ve diğ. 2009).

3- Protein sentezine engel olanlar: Hücre içersindeki protein sentezini; aktinomisin, mitomisin, rifamisin gibi antibiyotikler transkripsiyon basamağında, tetrasiklin, streptomisin, kanamisin, neomisin, puromisin, gentamisin, spektinomisin gibi antibiyotikler 30S'lik ribozomal alt ünite, kloramfenikol, linkomisin, eritromisin,

oleondamisin, karbomisin, spiramisin gibi antibiyotikler 50S'lik ribozomal alt üniteye inhibe etmektedir (Güven ve diğ. 2009).

4- Nükleik asit fonksiyonunu ve sentezini bozanlar: DNA'nın çift sarmal yapısının bozulması, DNA replikasyonunda rol alan DNA polimeraz veya transkripsiyonunda rol alan RNA polimeraz enzimlerinin görevlerinde bozuklukların oluşması, nükleosid antibiyotiklerin nükleik asit sentezine engel olmaları veya nükleik asit yerine girmesi sonucu DNA yapısında ve fonksiyonlarında bozuklukların oluşması hücreye zarar vermektedir (Güven ve diğ. 2009).

5- Çeşitli hücre işlevlerine birden etki: Bazı antibiyotikler örneğin streptomisinler bakterilerin logaritmik çoğalma döneminden sonraki dönemde daha çok protein, RNA inhibisyonu ve hücre zarı üzerine zarar verici etki göstermektedirler ve bakterisittirler (Güven ve diğ. 2009).

2.2.2. Antifungal Maddeler

Funguslar ökaryotik organizma olduklarından, hücresel mekanizmalarının çoğu hayvan ve insanlardaki ile aynıdır. Bu nedenle, funguslardaki metabolik yolları etkileyen kemoteropötik ajanlar konukçu hücrelerdeki ilgili yol izlerini etkilemekte ve ilaç toksisitesiyle sonuçlanmaktadır. Pek çok antifungal ilaç sadece yüzey uygulamaları için kullanılabilir. Birkaç ilaç tek fungal yapı ya da metabolizmayı hedeflediklerinden funguslar için seçici olarak toksiktir. Fungal tedavi için kullanılan ilaçlar immün sistemi baskılanmış kişilerde fungal enfeksiyonların çok yaygın hale gelmesi nedeniyle önemli olmaktadır. Antifungal maddeler şu şekilde sıralanabilmektedir;

1- Ergosterol inhibitörleri: Fungal hücre membranındaki ergosterol daha yüksek ökaryotik sitoplazmik membrandaki kolestrolün yerine bulunmaktadır. Antifungal bileşiklerin iki grubu ergosterol ile etkileşim yaparak ya da ergosterolün sentezini inhibe ederek çalışmaktadır. Birinci grup; *Streptomyces* cinsinin üyeleri tarafından üretilen polyenleri içermektedir. Polyenler ergosterole bağlanmakta, membran fonksiyonlarını bozmakta, membranın geçirgen olmasına sebep olmakta ve böylece hücre ölmektedir. Antifungal bileşiklerin ikinci temel grubu; azol ve alilaminleri içermektedir. Bunlar seçici olarak ergosterolün biyosentezini inhibe eden sentetik ajanlardır ve bundan dolayı geniş bir antifungal etkiye sahiptirler. Azollerle tedavi normal membran üretimi için

fungusun yetersizliği, membran hasarlarının oluşması ve önemli membran transport aktivitelerinin değişmesiyle sonuçlanmaktadır. Alilaminler de ergosterol biyosentezini inhibe etmektedir fakat hayvansal hücre ve dokular tarafından alınamaması nedeniyle yüzey kullanımını kısıtlı olmaktadır (Güven ve diğ. 2009).

2- Echinocandinler: Echinocandinler, fungal hücre duvarında glukon polimerlerini oluşturan bir enzim olan 1,3-β-D-glukan sentezini inhibe etmektedirler. Bu ajanlar *Candida* cinsi gibi funguslarla infeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır ve diğer ajanlara karşı dirençli olan bazı funguslara karşı aktiftirler (Güven ve diğ. 2009).

3- Diğer antifungal ajanlar: Polyoxin kitin biyosentezini etkileyerek hücre duvar sentezini etkilemektedir. Polyoxin tarımsal fungusitler olarak yaygın olarak kullanılmaktadır, klinik olarak kullanılmamaktadır. Diğer ilaçlar, replikasyon sırasında DNA topolojisini etkileyerek folat biyosentezini inhibe etmekte ya da griseofulvin gibi mitoz esnasında mikrotübül agregasyonunu dağıtmaktadır. Nükleik asit analog 5-fluorocytosine ise funguslarda etkili nükleik asit sentez inhibitörüdür (Güven ve diğ. 2009).

Antifungal ilaçların kullanımı dirençli fungus popülasyonunun ve yeni fungal patojenlerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. *Candida* cinsi normalde patojen değildir ancak günümüzde antifungal ilaçlarla tedavi gören, immün sistemi baskılanmış kişilerde hastalık oluşturmaktadır. Birkaç patojenik *Candida* cinsi son zamanlarda kullanılan antifungal ajanların tümüne dirençli duruma gelmiştir (Güven ve diğ. 2009).

2.3. ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIĞIN BELİRLENMESİ

Antibiyogram, genellikle katı besiyerlerinde; difüzyon ve tüp içinde, sıvı besiyerinde; dilüsyon yöntemleriyle yapılmaktadır. Bu testlerin ilk ve en önemli aşaması spesifik ve duyarlı test mikroorganizmasının seçimi ve kullanımı olmaktadır. Bu testlerle antimikrobiyal maddenin belli bir test mikroorganizması üzerine etkisi minimal inhibitör konsantrasyonu veya minimal letal konsantrasyonu şeklinde belirlenebilmekte, mikroorganizma suşunun belli bir antimikrobiyal maddeye karşı duyarlılığı saptanabilmektedir (Anonim 2011).

2.3.1. Disk Difüzyon Testi

Hızlı üreyen aerob ve fakültatif anaerob bakteriler için önerilen kolay, pratik, rutin laboratuvar çalışmaları için en çok tercih edilen disk difüzyon testidir. Antibiyotiğin inhibisyon etkisi kalitatif ölçülmektedir. Disk etrafında inhibisyon görülmemesi, bakterinin o antibakteriyele karşı dirençli olduğunu göstermektedir. Antibyogram için en yaygın kullanılan difüzyon yöntemi, Kirby-Bauer disk yöntemidir (Anonim 2011).

2.3.2. Kuyu Difüzyon Testi

Delik agar difüzyon yöntemi olarak da bilinmektedir. Bakteri yayılmadan önce agarda steril şartlarda 3-5 mm'lik çukurlar açılmaktadır. Dip kısımları erimiş steril agar ile kapatılmaktadır. Bakteri yayıldıktan sonra her bir çukura, belli µg ölçülerde olacak şekilde sulandırılmış antibiyotikler konulmaktadır. En az 24 saat etüvde inkübe edilerek antibiyotik difüze olan agarda bakterinin üreyebilmesi test edilmektedir (Anonim 2011).

2.3.3. Broth Dilüsyon Testi

Tüp dilüsyon testi (makrodilüsyon testi); tüpte sulandırma ilkesine dayanmakta, pratik olmadığından araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin minimal inhibitör konsantrasyonu ve/veya minimal letal konsantrasyonu değerleri belirlenmektedir. MIC değeri; denenen test mikroorganizma süspansiyonunda test koşullarında üremeyi inhibe eden en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonunu ifade etmektedir. Mikrodilüsyon testi; kolay uygulanabilir ve pratik yöntemdir. Mikroplak çukurlarında uygun bir besiyeri kullanılarak antimikrobiyal maddenin seri sulandırılması ilkesine dayanmaktadır. Üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonları MIC olarak saptanmaktadır (Anonim 2011).

2.3.4. Agar Dilüsyon Testi

Agar dilüsyon testi method olarak broth dilüsyon testi ile aynıdır. Tek fark, agar dilüsyon yönteminde antibiyotik sulandırmaları agar içine konmakta ve petri plaklarına dökülmektedir. Bu şekilde her plakta antibiyotiğin farklı konsantrasyonları bulunmaktadır. MIC değeri üremenin engellendiği en düşük antibiyotik konsantrasyonudur (Anonim 2015).

2.3.5. E Testi

E-test, disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemlerinin bir arada uygulanması esasına dayanmaktadır. Pratik ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle rutin çalışmalara uygundur fakat pahalı bir testtir. Kantitatif ölçüm yapmaktadır. Gittikçe artan konsantrasyonlarda antibiyotik içeren inert plastik şeritler (stripler) kullanılmaktadır. Plastik şeritlerin bir yüzünde antibiyotik içerikleri, diğer yüzeyinde rakamlar bulunmaktadır. Disk difüzyon testindeki gibi besiyerine bakteri inokülasyonu yapıldıktan sonra E-test şeritleri radyal olarak besiyerine yerleştirilmektedir. Anaerob ortamda 35 °C de 18-20 (37 °C'de 48 saat) saat inkübasyona bırakılmaktadır. Bu süre sonunda şerit etrafında inhibisyon zonu oluşmaktadır. Elips şeklindeki inhibisyon zonu ile şeritin kesiştiği nokta MIC değerini vermektedir (Anonim 2011).

2.4. BAZI LİKENLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Kuzeydoğu Brazilya'dan toplanan, *Cladonia verticillaris* (Hoffm.) Schaer. likeninin bakterisidal etkisi Gram pozitif bakteri olan *Bacillus subtilis* türünde, bakteriyostatik etkisi Gram negatif bakteri olan *Escherichia coli* türünde, anti-fungal etkisi dermatofit fungus olan *Trichophyton rubrum* türünde bildirilmiştir (Brito Marques Ramos ve diğ. 2014).

Kuzey Amerika-Kaliforniya bölgesinden toplanan, *Ramalina menziesii* Tayl. ve *Usnea lapponica* Vain. liken türlerinden elde edilen ekstraktların *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) türlerine karşı inhibe edici etkisi belirlenmiştir (Shrestha ve St. Clair 2013).

Hindistan-Kodaikanal ormanından toplanan *Parmotrema* genusuna ait liken türlerinin, metanol ekstraktının en yüksek antibakteriyel aktivitesi *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerinde gözlenirken, en güçlü antifungal etki *Ganoderma* ve *Fusarium* cinsi üzerinde bulunmuştur (Ritika ve Jayanthi 2013).

Hindistan-Maharaşta bölgesinden toplanan, *Usnea ghattensis* Awasthi liken türünün etanol ekstraktı *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri türlerinde etkiliyken, metanol ve aseton ekstraktı *Staphylococcus aureus* bakterisinde etkili olduğu

saptanmıştır. Sadece metanol ekstraktı *Streptococcus faecalis* bakterisinde aktivite göstermiştir (Srivastava ve diğ. 2013).

Sırbistan-Niş bölgesinden toplanan, *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale ve *Parmelia sulcata* Taylor likenlerinin antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan çalışmada tek çözücü olarak kullanılan metanolün tüm ekstraktlarının antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (Stojanovic ve diğ. 2013).

Hindistan-Uttarakhand-Nainital bölgesinden toplanan, *Parmotrema nilgherrense* (Nyl.) Hale likeninin aseton, metanol, etil asetat, benzen ekstraktlarının ilaç dirençli patojenlere karşı yapılan deneylerinin sonucunda en yüksek antimikrobiyal etki etil asetat ekstratında gözlenmiştir (Javeria ve diğ. 2013).

Türkiye-Mersin ilinden toplanan, *Squamarina lentigera* (Weber) Poelt. liken türlerinde bulunan usnik asit konsantrasyonunun antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması üzerine yapılan çalışmada, usnik asit ekstraktının *Bacillus megaterium* ve *Bacillus subtilis* bakteri türlerini inhibe edici etkisi belirlenmiştir (Cansaran-Duman ve Halıcı 2012).

Nepal'in üç farklı bölgesinden toplanan, yirmi bir liken türünün hepsinin metanol ekstraktlarının *Bacillus cereus* türüne karşı, yedi liken türünün metanol ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu bulunmuştur (Paudel ve diğ. 2012).

Sırbistan'dan toplanan, *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise ex Duby liken türünün metanol ve kloroform ekstraktların analizi sonucunda baskın fenolik bileşik olarak depsidon ve salazinik asit bulunmuştur ve sekiz straine karşı önemli antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir (Manojlovic ve diğ. 2012).

Hindistan'dan toplanan *Parmelia* sp. ve *Dermatocarpon* sp. Eschw. likenlerinin *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* patojenik klinik izolatlarına karşı antibakteriyel aktivitesi ölçülmüş ve metanolik ekstraktının *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarına karşı inhibe edici etkisi olduğu saptanmıştır (Sharma ve diğ. 2012).

Güneydoğu Sırbistan bölgesinden toplanan, *Parmelia sulcata*, *Flavoparmelia caperata*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* ve *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd. liken türlerinin antioksidan, antimikrobiyal, antiproliferatif aktiviteleri araştırılmış ve en

yüksek antimikrobiyal etki Gram pozitif bakterilerde gözlenmiş, en iyi sonuçlar *Hypogymnia physodes* ve *Cladonia foliacea* likenlerinde elde edilmiştir (Mitrovic ve diğ. 2011).

Güney Afrika-Hogsback ormanından toplanan, *Usnea undulata* Stirton likenindeki bileşiklerin izole edilmesi ile yapılan çalışmada usnik asitin en fazla *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı aktif olduğu gözlenmiştir (Sultana ve Afolayan 2011).

Nijerya Nsukka bölgesinden toplanan, *Ramalina farinacea* likeninin metanol ekstraktı ve tetrasiklin antibiyotiğinin kombinasyonu ile antimikrobiyal etkileşim çalışmaları, *Staphylococcus aureus* türünün klinik izolatlarına karşı değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal etkileşim çalışmaları *Staphylococcus aureus* bakterisinin üç suşuna karşı dama tahtası metodu kullanılarak uygulanmıştır. Öncelikli olarak ekstraktın antimikrobiyal özelliği ölçülmüştür. *Staphylococcus aureus* suşlarından ikisine karşı etkili olduğu açığa çıkarılmıştır (Agboke ve diğ. 2011).

Nijerya-Nsukka bölgesinden toplanan, *Ramalina farinacea* likeninin metanol ekstraktının ampisilin antibiyotiği ile arasındaki birlikteliğin antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Beta-laktamaz dirençli suşlar üreten *Staphylococcus aureus* türlerinde bu antibiyotik bazı durumlarda baskılanmaktadır. Ampisilin ile metanol ekstraktı arasındaki antimikrobiyal etkileşim taraması sonucu, kombinasyon oranının çoğunlukla sinerji gösterdiği açığa çıkarılmıştır (Agboke ve Esimone 2011).

Sırbistan-Kopaonik Dağı'ndan toplanan, *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad., *Lecanora atra* (Huds.) Ach. ve *Lecanora muralis* (Schreb.) Rabenh. liken türlerinin antimikrobiyal aktivitesi minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) değerleri tespit edilerek belirlenmiştir. *Cladonia furcata* likeninin aseton ekstraktının en aktif antimikrobiyal ajan olduğu belirlenmiştir (Rankovic ve diğ. 2011).

Hindistan-Mannar Körfezi-Kurusadai adası mangrovlarından toplanan, *Rocella belangeriana* Awasthi türünün aseton, metanol, dietileter, etanol, etil asetat, petrol eter ve kloroform ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Maksimum inhibe edici antibakteriyel etki metanol ekstraktta *Vibrio cholerae* türüne karşı kaydedilmiştir. Minimum inhibisyon etki etil asetat ekstraktta *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* sp., *Salmonella* sp. ve *Shewanella* sp. türlerine karşı kaydedilmiştir. Maksimum

antifungal etki *Aspergillus niger* türüne karşı, minimum etki *Rhizophus* sp. türüne karşı kaydedilmiştir (Karthikai Devi ve diğ. 2011).

Kuzeydoğu Brezilya-Bonita bölgesinden toplanan, *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. likeninin antimikrobiyal aktivitesi belirlenerek, kimyasal kompozisyonu ortaya çıkarılmıştır. Liken ekstraktları ve saflaştırılan maddeler dört metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) strainine karşı test edilmiştir (Martins ve diğ. 2010).

Sırbistan-Kopaonik Dağı'ndan toplanan, *Anaptychia ciliaris* (L.) Körb., *Nephroma parile* (Ach.) Ach., *Ochrolechia tartarea* (L.) A.Massal ve *Parmelia centrifuga* (L.) Ach. likenlerinin antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin araştırıldığı çalışmada, her liken türünden elde edilen metanol ekstraktlarının altı bakteri ve on bir fungusu karşı MIC değeri 0,23-7,5 mg/mL olarak ölçülmüştür. *Parmelia centrifuga* ve *Ochrolechia tartarea* türlerinin metanol ekstraktları hem antibakteriyel hem de antifungal etkili en güçlü aktivite göstermiştir (Rankovic ve diğ. 2010).

Türkiye-Giresun ilinden toplanan, *Parmelina tiliaceae* (Hoffm.) Hale ve *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* (L.) Zopf likenlerinin değişik çözücülerle hazırlanmış ekstraktlarının Gram pozitif bakterilere etki ettiği fakat Gram negatif bakterilere etki etmediği gözlenmiştir (Aydın ve Kınalıoğlu 2010).

Hindistan-Pichavaram mangrovlarından toplanan, *Roccella belangeriana* likeninin aseton, metanol, dietil eter, etanol, etil asetat, petrol eter ve kloroform ekstraktlarının oniki bakteri strainine karşı etkisi araştırılmıştır. Kloform ekstraktlarının *Enterococcus* sp. türüne karşı maksimum antibakteriyel aktivite belirlenmiştir. Etil asetat ekstraktının *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* sp., *Salmonella* sp. ve *Shewanella* sp. türlerine karşı minimum aktivite gösterdiği kaydedilmiştir (Karthikaidevi ve diğ. 2009).

Türkiye-Bursa ilinden toplanan, *Cladonia rangiformis* Hoffm., *Peltigera neckerii* Hepp ex Müll.Arg. ve *Peltigera rufescens* (Weiss) Humb. likenlerin toprak bakterilerine karşı etkisi araştırılmıştır. *Peltigera rufescens* türünün sekonder metabolite sahip olmadığı, toprak bakterilerine inhibe edici etki göstermediği saptanmıştır. *Peltigera neckerii* türünün sekonder metabolite sahip olduğu ve toprak bakterilerinin büyümesine negatif etkisi olduğu gözlenmiştir. *Cladonia rangiformis* birkaç çeşit sekonder metabolite ve çalışılan türler arasında en yüksek inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir (Akpınar ve diğ. 2009).

Sırbistan-Kopaonik Dağı'ndan toplanan, *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata* (L.) Ach., *Parmelia pertusa* (Schrank) Schaerer, *Hypogymnia physodes* ve *Umbilicaria polyphylla* (L.) Baumg. liken türlerinin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış olan çalışmada MIC ve disk difüzyon metodları uygulanmıştır. Aseton ve metanol ekstraktları Gram olumlu bakterilerde Gram olumsuz ve funguslardan daha belirgin bir şekilde aktif olduğu görülmüştür. En düşük MIC değeri *Cladonia furcata* türünün aseton ekstraktında *Bacillus subtilis* türüne karşı ölçülmüştür (Rankoic ve diğ. 2009).

Sırbistan-Kopaonik Dağı'ndan toplanan, *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna* (Hoffm.) Arnold., *Parmelia caperata* ve *Parmelia conspersa* (Ehrh.) Ach. likenlerinden elde edilen fumarprotosetrarik asit, lekonarik asit, protosetrarik asit ve stiktik asit antimikrobiyal aktivitesi on altı mikroorganizmaya karşı çalışılmıştır. Araştırılan liken bileşiklerinin test edilen mikroorganizmaların tümüne karşı inhibe edici olduğu saptanmıştır. Bakterilerin liken bileşiklerine karşı funguslardan daha duyarlı olduğu bulunmuştur. En düşük MIC değeri *Klebsiella pneumoniae* bakterisine karşı fumarprotosetrarik asitte ölçülmüştür. En zayıf antimikrobiyal aktivite ise stiktik asitte bulunmuştur (Rankovic ve Mistic 2008).

Sırbistan-Kopaonik Dağı'ndan toplanan, *Physcia aipolia* (Ehrh. Ex Humb.) Furnr., *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* ve *Hypogymnia physodes* liken türlerinden fisodik asit, usnik asit, atranorin ve giroforik asit izole edilerek antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Altı bakteri ve sekiz fungusu sıvı tüp dilüsyonla MIC belirlenerek antibiyotik değerlendirmesi yapılmıştır. Test edilen liken maddelerinin kullanılan mikroorganizmalara karşı etkili olduğu saptanmıştır. En yüksek antimikrobiyal aktivite *Parmelia caperata* türünün usnik asitinde tespit edilmiştir (Rankovic ve diğ. 2008).

Hindistan-Batı Gat-Bolampatti sıra dağlarından toplanan, *Parmotrema praesorediosum* (Nyl.) Hale liken türünün hekzan, etil asetat, aseton, metanol, diklorometan ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan çalışmada, etil asetat ve diklorometan ekstraktlarının *Bacillus cereus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Shigella flexnerii*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı aktivitesi saptanmıştır (Balaji ve Hariharan 2007).

Türkiye-Karabük ilinden *Evernia divaricata* (L.) Ach., Çankırı ilinden *Pseudevernia furfuracea*, Trabzon ilinden *Letharia vulpina* ve *Flavoparmelia caperata* likenleri

toplanmış ve liken türleri arasında en fazla antimikrobiyal etki, en yüksek usnik asit miktarı tespit edilen *Letharia vulpina* türünde saptanmıştır (Cansaran-Duman 2007).

Türkiye-Artvin ilinden toplanan, *Parmelia saxatilis* (L.) Ach., *Platismatia glauca* (L.) Culb.-C.Culb., *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach., *Ramalina polymorpha* (Lilj.) Ach. ve *Umbilicaria nylanderiana* (Zahlbr.) H.Magn. liken türlerinin metanol ekstraktının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi araştırılan çalışmada, *Bacillus subtilis* türüne karşı antibakteriyel ve *Trichophyton rubrum* türüne karşı antifungal etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Güllüce ve diğ. 2006).

Güney İspanya'dan toplanan, *Aspicilia radiosa* (Nyl.) Coppins, *Cladonia convoluta* (Lam.) Cout., *Cladonia firma* (Nyl.) Nyl., *Diplochistes scruposus* (Schreb.) Norman, *Dirina repanda* Fr., *Lecanora muralis* (Schreb.) Rabenn., *Pertusaria mammosa* Harm., *Ramalina canariensis* J.Steiner, *Ramalina subfarinacea* (Nyl. Ex Crombie) Nyl., *Roccella fuciformis* (L.) DC. ve *Xanthoria calciola* Oxner liken türlerinin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Usnik asit içeriği zengin liken türleri bazı Gram pozitif bakterilere karşı bakteriosidal etki göstermiştir (Saenz ve diğ. 2006).

Hindistan-Mahabaleshwar bölgesindeki gümüş meşe ağaçlarından toplanan, *Usnea ghattensis* likeninin *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı inhibe edici etkisi saptanmıştır (Behera ve diğ. 2005).

Türkiye-Eskişehir ilinden toplanan *Ramalina farinacea* liken türü ile yapılan çalışmada aseton ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış, (+) - usnik asit bileşeni *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans* ve *Candida glabrata* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Çalışmada norstiktik asitin *Aeromonas hydrophila* bakterisine karşı aktivitesi belirlenmiştir. Protosetarik asit ise sadece *Candida albicans* ve *Candida glabrata* mayalarına karşı aktivite göstermiştir. Filamentöz funguslara karşı antifungal aktivite gözlenmemiştir (Tay ve diğ. 2004).

Türkiye-Eskişehir ilinden toplanan, *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. liken türünün aseton, dietil eter ve etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş, on iki bakteri ve sekiz fungusu karşı test edilmiştir. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus*,

Bacillus subtilis, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Listeria monocytogenes* bakterilerine karşı aktivitesi bulunmuştur (Özdemir Türk ve diğ. 2003).

Brezilya-Mato Grosso do Sul bölgesinden toplanan, *Parmotrema tinctorum* (Delise ex Nyl.) Hale türü likeninden elde edilen orsellinatların antimikrobiyal aktivitesi çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı mikrodilüsyon metodu ile araştırılmıştır. Buna göre *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas campestris* var. *vesicatoria* ve *Ralstonia solanacearum* bakteri türleri en duyarlı test mikroorganizmaları olarak belirlenmiştir. *Escherichia coli* türüne karşı etki göstermediği görülmüştür (Gomes ve diğ. 2003).

Türkiye-Ankara-Kızılcahamam-Çubuk bölgelerinden toplanan, *Letharia vulpina*, *Pseudevernia furfuraceae* var. *furfuraceae* ve *Evernia divaricata* liken örneklerinden elde edilen aseton ve kloroform ekstraktlarının Gram pozitif kok ve çomaklara karşı inhibitör etkisi gözlenirken, Gram negatif çomaklar ve *Candida albicans* türüne karşı etkisi gözlenmemiştir (Osmanağaoğlu ve diğ. 2000).

Nijerya-Nsukka bölgesindeki palmye ağacı gövdelerinden toplanan, *Ramalina farinacea* liken türü ile yapılan çalışmada, farklı çözücülerden elde edilen liken ekstraktlarının antibakteriyel, antifungal ve sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Antibakteriyel etki kullanılan tüm bakterilerde gözlenirken, antifungal etki en çok *Trichophyton mentagrophytes* türünde belirlenmiştir (Esimone ve Adikwu 1999).

Türkiye-Hatay ilinden toplanan, *Parmelia furfuracea* (L.) Ach. liken türünün ekstresi, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* bakteri türleri üzerine engelleyici etkisi diğer türlere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *Klebsiella pneumonia* üzerine ise en az etkili olduğu tespit edilmiştir (İlçim ve diğ. 1998).

Türkiye-Erzurum ilinden temin edilen, *Cetraria islandica* likeninden hazırlanan ekstraktların Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu, Gram negatif bakterilere, funguslara ve aktinomiset türlerine karşı etkili olmadığı saptanmıştır (Dülger ve diğ. 1998).

İzlanda-Hveravellir-Grindavik bölgelerinden toplanan, *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot., *Stereocaulon alpinum* Lauree ex Funck., *Parmelia saxatilis* ve *Cetraria islandica* liken metabolitlerinin antimikobakteriyel aktivitesini ölçmek için yapılan çalışmada,

Cladonia arbuscula türünden usnik asit, *Stereocaulon alpinum* türünden atranorin ve lobarik asit, *Parmelia saxatilis* türünden salazanik asit, *Cetraria islandica* türünden protolikesterik asit elde edilmiştir. *Mycobacterium aurum* bakteri türünün en yüksek *in vitro* duyarlılığı usnik asit metabolitinde görülmüştür (Ingolfsdottir ve diğ. 1998).

Türkiye-Erzurum ilinden temin edilen, *Pseudevernia furfuracea* likeni ile yapılan çalışmada elde edilen ekstrelerin Gram pozitif bakterilere ve mayalara karşı antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (Gücin ve diğ. 1997a).

Türkiye-Bursa ilinden toplanan, *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey. liken örneğinin kullanıldığı çalışmada elde edilen liken ekstresinin *Mycobacterium smegmatis* ve *Staphylococcus epidermidis* bakteri türlerinde etkin olduğu, kullanılan fungus türlerinde etkin olmadığı saptanmıştır (Gücin ve diğ. 1997b).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Liken Türleri

Ramalina farinacea ve *Usnea intermedia* likenleri Bursa-Uludağ Milli Park sonrası 4. km'de, sırasıyla; 1608 m [40°06'37.2"K, 29°05'43.4"D (06/05/2012)], 1659 m'de [40°06'41.4"K, 29°06'12.3"D (11/07/2012)] *Abies nordmanniana* subsp. *equi-trojani* üzerinden Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi Dr. Seyhan ORAN tarafından toplanılmış, teşhis edilmiş ve çalışılmak üzere tarafımıza sağlanmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Test Mikroorganizmaları

Bacillus cereus ATCC 7064, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 3699, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Yersinia pestis* ATCC 19428 bakteri türleri, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida lipolytica* ATCC 8660, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 4563, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045, *Debaryomyces hansenii* DSM 70238, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9796 fungus türleri Düzce Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bakterioloji ve Mikoloji Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilerek, kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Çözücü

Etanol, hem etilenin hidrasyonu sonucu petrokimyasal olarak, hem de şekerin maya ile fermente edilmesi suretiyle üretilmektedir. $C_2H_4 + H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH$ kimyasal denklemi ile ifade edilmektedir. İçki üretiminde, kimya sanayiinde, suni ipek selüloz patlayıcı yapımında, boya üretiminde, antrifriz yakıt ve içecek olarak, antiseptik ve

dezenfekte edici olarak, çözücü ve çöktürme maddesi olarak eczacılıkta, parfümeride, sirke üretiminde kullanılmaktadır (Soyuduru 2007).

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı

Likenler, herbaryum teknikleriyle uygun şartlarda kurutulup teşhisi yapıldıktan sonra aseptik şartlarda blender (mekanik parçalayıcı) ile toz haline getirildi. Rutin yöntemler uygulanarak her bir likenden 15 g tartıldı ve 180 mL etanol (%96'lık) ile birlikte soxhlet cihazına 12 saatlik ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Elde edilen ekstraktlar deneyde kullanılmak üzere uygun steril şartlarda bekletildi (Khan ve diğ. 1988).

3.2.2. Mikroorganizmaların ve Disklerin Hazırlanışı

Kullanılan stok bakteri ve maya kültürlerini aktif hale getirebilmek için Muller Hinton Broth (MHB) (OXOID) kullanıldı. 10 mL'lik MHB dolu tüplere stok kültürlerden steril şartlarda bir öze dolusu mikroorganizma ekildi. Bakteriler 35-37 °C'de 24-48 saat, mayalar 25-27 °C'de 48-72 saat inkübe edildi.

Ekim yapılacak olan 20 mL Muller Hinton Agar (MHA) (OXOID) dökülen petrilere, inkübe edilen mikroorganizmalardan mikropipet yardımıyla steril şartlarda 1'er mL ekim yapıldı. L baget ile homojen bir şekilde petri üzerinde yayılması sağlandı. 15-20 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Aktivitesi araştırılacak olan liken ekstraktlarından, 6 mm çapındaki steril disklerle (BIOANALYSE) 25 µL, 50 µL ve 75 µL konsantrasyonlarda mikropipet aracılığı ile steril şartlarda emdirme işlemi yapıldı. Ekim yapılan MHA'lı petrilerdeki üç bölgeye uygun mesafelerde steril şartlarda yerleştirildi. Bakteriler 35-37 °C'de 24-48 saat, mayalar 25-27 °C'de 48-72 saat inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları cetvel yardımıyla ölçüldü. Kontrol için çözücü emdirilmiş diskler, mukayese için standart antibiyotik diskler kullanıldı. Deneylerin hepsi üç tekrarlı olarak çalışıldı (Collins ve diğ. 1989, CLSI 2012).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada, *Ramalina farinacea* ve *Usnea intermedia* liken türlerinin etanol ekstraktlarının bakteriler ve mayalar üzerine olan etkilerini saptamak amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmış, ekstraktların kullanılan test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zonları belirlenmiştir (Şekil 1-10). İnhibisyon zonları, disk ile beraber inhibisyon zonunun tüm sınırı ölçülerek milimetrik olarak kaydedilmiştir. Kontrol olarak kullanılan çözücünün zon çapı 0-1 mm arasında ölçülmüştür.

4.1.1. *Ramalina farinacea* (L.) Ach. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi

Ramalina farinacea likeninin antifungal aktivite bulguları Çizelge 1’de, antibakteriyel aktivite bulguları Çizelge 2’de verilmiştir.

Ramalina farinacea likeninin 25 µL’lik ekstraktının (R25) en yüksek antifungal aktivitesi *Candida albicans* ATCC 90028 (24,0 mm) türü üzerinde saptanırken, en düşük aktivitesi ise *Candida lipolytica* ATCC 8660 (19,6 mm) ve *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9796 (19,6 mm) türleri üzerinde saptanmıştır.

Ramalina farinacea likeninin 50 µL’lik ekstraktının (R50) en yüksek antifungal aktivitesi *Candida albicans* ATCC 90028 (27,0 mm) türünde, en düşük aktivitesi *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045 (22,0 mm) türünde ölçülmüştür.

Ramalina farinacea likeninin 75 µL’lik ekstraktının (R75) en yüksek antifungal aktivitesi *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9796 (28,3 mm) türünde ölçülürken, en düşük aktivite *Debaryomyces hansenii* DSM 70238 (19,3 mm) türünde ölçülmüştür.

Ramalina farinacea likeninin 25 µL’lik ekstraktının en yüksek antibakteriyel aktivitesi *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (18,0 mm) ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 (18,6 mm) türlerinde ölçülmüştür. En düşük aktivite ise *Salmonella typhimurium* CCM 5445 (10,0 mm) ve *Yersinia pestis* ATCC 19428 (10,3 mm) türlerinde saptanmıştır.

Ramalina farinacea likeninin 50 µL'lik ekstraktının en yüksek antibakteriyel aktivitesi *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 (23,0 mm) türünde saptanırken, en düşük aktivite *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (10,3 mm) türünde saptanmıştır.

Ramalina farinacea likeninin 75 µL'lik ekstraktının en yüksek antibakteriyel aktivitesi *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 (29,6 mm) üzerinde ölçülmüştür. En düşük aktivite *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (10,6 mm), *Escherichia coli* ATCC 25992 (10,0 mm) ve *Salmonella typhimurium* CCM 5445 (10,0 mm) türleri üzerinde ölçülmüştür.

Candida albicans ATCC 90028 türü üzerine R25'in 24,0 mm, R50'nin 27,0 mm ve R75'in 26,6 mm'lik inhibisyon değerleri ile *Ramalina farinacea* ekstraktları tüm mukayese antibiyotiklerine göre daha aktiftir.

Candida glabrata ATCC 90030 türünde R25 (20,3 mm), R50 (23,0 mm) ve R75 (27,3 mm) konsantrasyonlarında oluşan inhibisyon zonları, FLU25 (17,0 mm) antibiyotiğinden çok daha etkilidir.

Ramalina farinacea ekstraktlarının (R25 (19,6 mm), R50 (22,3 mm) ve R75 (21,0 mm)) *Candida lipolytica* ATCC 8660 üzerine etkisi FLU25'den (24,0 mm) daha düşük iken diğer tüm antibiyotiklerden yüksektir.

R25 (21,0 mm), R50 (23,0 mm) ve R75 (23,3 mm) konsantrasyonları *Candida parapsilosis* ATCC 22019 türü üzerinde mukayese antibiyotiklerinden daha fazla etki göstermiştir.

R25, R50 ve R75 konsantrasyonlarının *Candida tropicalis* ATCC 4563 üzerindeki 20,6 mm, 23,6 mm ve 19,6 mm inhibisyon zonları ile kıyaslanan antibiyotiklerden daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir.

Cryptococcus neoformans ATCC 32045 maya türü üzerinde R25 (23,3 mm), R50 (22,0 mm) ve R75 (23,0 mm) konsantrasyonları, mukayese antibiyotiklerinden daha etkilidir.

R50 konsantrasyonu, *Debaryomyces hansenii* DSM 70238 üzerine 22,3 mm'lik inhibe edici zonu ile, KTC10 (22,0 mm) ve FLU25 (22,0 mm) antibiyotiklerinin aktivitesi gibi benzer etkideyken, diğer antibiyotiklerden daha fazla etkilidir.

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9796 türü üzerinde, R50 (23,6 mm) ve R75 (28,3 mm) mukayese antibiyotiklerinden çok daha etkiliyken, R25 (19,6 mm) NY100'den (20,0 mm) daha düşük diğer antibiyotiklerden daha fazla etkili olmuştur.

Bacillus cereus ATCC 7064 türü üzerinde en yüksek aktiviteyi sergileyen R75 (15,0 mm) konsatrasyonu NR100 (15,0 mm) ile benzer, VA30 (14,0 mm), P10U'dan (10,0 mm) daha yüksek, diğer tüm antibiyotiklerden daha düşük etkidedir.

Bacillus licheniformis ATCC 14580 türünde R25 (16,3 mm) ve R50 (16,0 mm), NR100 (16,0 mm) ile paralel gösterirken, R75 (18,0 mm) VA30 (18,0 mm) ve S10 (18,0 mm) ile paralellik göstermiştir.

R25 (18,0 mm), R50 (21,3 mm) ve R75 (21,0 mm), *Citrobacter freundii* ATCC 8090 üzerinde IPM10 (39,0 mm), TE30 (30,0 mm), S10 (25,0 mm), AK30 (25,0 mm), FF50'den (22,0 mm) daha düşük aktivite göstermiştir.

Enterococcus faecalis ATCC 29121 türü üzerinde, R25 (12,6 mm), R50 (10,3 mm) ve R75'in (10,6 mm) antibiyotiklerden daha düşük inhibe edici etkisi olduğu görülmüştür.

Escherichia coli ATCC 25992 türü üzerinde, R25 (17,3 mm) VA30 (14,0 mm), S10 (14,0 mm) ve P10U'ya (7,0 mm) kıyasla daha aktifken diğer mukayese antibiyotiklerine göre aktif değildir.

Klebsiella oxytoca ATCC 8724 türünde, R25 (13,3 mm), R50 (13,6 mm) ve R75'in (16,0 mm) P10U (14,0 mm) hariç tüm antibiyotiklerden daha düşük etkisi vardır.

R25'in (14,3 mm) *Listeria innocua* ATCC 33090 üzerindeki en düşük aktivitesi FF50 (14,0 mm) ve NR100 (14,0 mm) ile benzerdir fakat VA30'dan (12,0 mm) yüksektir. Diğer mukayese antibiyotikler ise bu tür üzerinde tüm *Ramalina farinacea* konsantrasyonlarından daha aktiftir.

Proteus vulgaris ATCC 8427 üzerinde en etkili olan R50'nin (21,6 mm) inhibisyon zonu IPM10 (32,0 mm), E15 (30,0 mm), S10 (30,0 mm) ve FF50'den (26,0 mm) daha düşüktür. Aynı tür üzerinde R25 (16,0 mm) en düşük antimikrobiyal etkidedir ancak TE30 (12,0 mm), TOB10 (14,0 mm), P10U (12,0 mm) ile kıyaslandığında daha aktiftir.

R25 (13,6 mm), R50 (15,0 mm) ve R75'in (12,6 mm) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde, TE30'dan (8,0 mm) daha fazla diğer mukayese antibiyotiklerinden daha az antimikrobiyal etkisi vardır.

R75 konsantrasyonu 29,6 mm'lik zon çapıyla *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 üzerinde en yüksek aktiviteye sahiptir ve kıyaslanan tüm mukayese antibiyotiklerinden daha aktiftir.

Salmonella typhimurium CCM 5445 üzerinde etki yapan tüm *Ramalina farinacea* konsantrasyonları (10,0 mm, 13,0 mm ve 10,0 mm) P10U (7,0 mm) hariç hiçbir mukayese antibiyotikleri kadar etkili olamamıştır.

Shigella flexneri ATCC 12022 üzerine E15 (36,0 mm), K30 (24,0 mm), IPM10 (26,0 mm), FF50 (18,0 mm), VA30 (18,0 mm), S10 (30,0 mm), N30 (22,0 mm), AK30 (25,0 mm), TOB10 (26,0 mm) ve NR100 (20,0 mm) kadar etki yapamayan R25 (15,0 mm), R50 (17,3 mm) ve R75 (15,6 mm) konsantrasyonları, TE30 (13,0 mm) ve P10U'dan (7,0 mm) daha etkilidir.

Staphylococcus aureus ATCC 6538P üzerine en yüksek aktivite sergileyen R75 (22,6 mm) konsantrasyonu N30 (22,0 mm) ile benzer etkidedir fakat K30 (21,0 mm), VA30 (15,0 mm), TE30 (12,0 mm), AK30 (20,0 mm), P10U (12,0 mm), NR100'den (12,0 mm) daha yüksek E15 (25,0 mm), IPM10 (25,0 mm), FF50 (30,0 mm), S10 (24,0 mm), TOB10'dan (26,0 mm) daha düşük inhibe edici etkidedir.

Staphylococcus epidermidis ATCC 3699 üzerindeki 19,3 mm'lik en büyük zon çapıyla R75 konsantrasyonu, E15 (29,0 mm), IPM30 (32,0 mm), FF50 (20,0 mm), S10 (27,0 mm), AK30 (24,0 mm), TOB10'dan (20,0 mm) daha düşük aktivite göstermiştir.

Streptococcus pyogenes ATCC 19615 üzerinde en etkili olan R50 (17,6 mm) konsantrasyonu VA30 (15,0 mm), NR100 (14,0 mm) ve P10U'dan (9,0 mm) daha yüksek diğer mukayese antibiyotiklerinden daha düşük aktiviteye sahiptir.

Yersinia pestis ATCC 19428 türünün R50'deki 14,0 mm zonu ile NY100 (14,0 mm) kıyaslamasına bakıldığında benzerlik görülmesine rağmen, R25, R50 ve R75 konsantrasyonları diğer antibiyotiklerden daha düşük aktivite göstermiştir.

4.1.2. *Usnea intermedia* (A.Massal.) Jatta Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi

Usnea intermedia likeninin antifungal aktivite bulguları Çizelge 3'te ve antibakteriyel aktivite bulguları Çizelge 4'te verilmiştir.

Usnea intermedia likeninin 25 µL'lik ekstraktının (U25) en yüksek antifungal aktivitesi *Candida albicans* ATCC 90028 (16,3 mm) ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (16,3 mm) türlerinde saptanırken, en düşük aktivite *Debaryomyces hansenii* DSM 70238 (10,0 mm) türünde saptanmıştır.

Usnea intermedia likeninin 50 µL'lik ekstraktının (U50) en yüksek antifungal aktivitesi *Candida albicans* ATCC 90028 (24,0 mm) ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (24,0 mm) türlerinde saptanırken, en düşük aktivite *Debaryomyces hansenii* DSM 70238 (8,6 mm) türünde saptanmıştır.

Usnea intermedia likeninin 75 µL'lik ekstraktının (U75) en yüksek antifungal aktivitesi *Candida albicans* ATCC 90028 (29,3 mm) üzerinde ölçülmüştür. En düşük aktivite *Debaryomyces hansenii* DSM 70238 (10,0 mm) üzerinde ölçülmüştür.

Usnea intermedia likeninin 25 µL'lik ekstraktının en yüksek antibakteriyel aktivitesi *Proteus vulgaris* ATCC 8427 (26,3 mm) türünde, en düşük aktivite *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (8,6 mm) türünde saptanmıştır.

Usnea intermedia likeninin 50 µL'lik ekstraktının en yüksek antibakteriyel aktivitesi *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (24,3 mm) üzerinde ölçülmüştür. En düşük aktivite *Escherichia coli* ATCC 25992 (10,3 mm), *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 (10,0 mm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (10,0 mm) ve *Yersinia pestis* ATCC 19428 (10,6 mm) türlerinde ölçülmüştür.

Usnea intermedia likeninin 75 µL'lik ekstraktının en yüksek antibakteriyel aktivitesi *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (30,3 mm) türünde, en düşük aktivite *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (9,6 mm) türünde saptanmıştır.

Usnea intermedia liken ekstraktları mayalar üzerinde en yüksek aktiviteyi *Candida albicans* ATCC 90028 türüne karşı göstermiştir. U75'deki 29,3 mm'lik inhibisyon zonu mukayese antibiyotiklerin oluşturdukları zonlardan daha büyüktür.

Candida glabrata ATCC 90030 üzerine U25, U50 ve U75'in etkileri sırasıyla 14,0 mm, 14,6 mm ve 22,6 mm'dir. Bu değerler ITR10 (7,0 mm), CLT10 (10,0 mm), 5FC1 (12,0 mm), MCZ10 (10,0 mm), AMB100 (13,0 mm) ve NY100 (11,0 mm) antibiyotik değerlerinden daha yüksektir.

Candida lipolytica ATCC 8660 üzerinde en yüksek zonu oluşturan U50 19,3 mm'lik inhibisyon zonu ile FLU25'den (24,0 mm) düşük diğer antibiyotiklerden daha yüksek değerdedir.

Candida parapsilosis ATCC 22019 türünde en yüksek zonu veren U50 (24,0 mm), *Candida tropicalis* ATCC 4563 türünde en yüksek zonu veren U75 (23,3 mm) ve *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045 türünde en yüksek zonu veren U75 (21,3 mm) konsantrasyonları mukayese antibiyotiklerinden daha fazla aktivite sergilemiştir.

Debaryomyces hansenii DSM 70238 üzerindeki U25 ve U75'deki 10,0 mm'lik inhibisyon zonları ITR10 (10,0 mm), CLT10 (10,0 mm) ve NY100 (10,0 mm) ile aynı değerdedir, diğer antibiyotiklerden ise daha düşük değerdedir.

U75'deki 21,6 mm'lik inhibisyon zonu değeri ile *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 979 türü üzerine en fazla aktivite gösteren liken özütü, tüm mukayese antibiyotiklerinden daha aktiftir.

Bacillus cereus ATCC 7064 türündeki 22,0 mm inhibisyon zonu ile U75 konsantrasyonu K30 (22,0 mm) ile aynı değerde, E15 (28,0 mm), S10 (30,0 mm), N30 (24,0 mm) ve TOB10'dan (25,0 mm) daha düşük, IPM10 (17,0 mm), FF50 (19,0 mm), VA30 (14,0 mm), TE30 (16,0 mm), AK30 (20,0 mm), P10U (10,0 mm) ve NR100'den (15,0 mm) daha yüksek değerdedir.

U25'deki 13,0 mm, U50'deki 14,3 mm ve U75'deki 20,6 mm değerleri ile liken ekstraktlarının *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 üzerine olan etkisi, P10U'dan (11,0 mm) daha fazladır.

Citrobacter freundii ATCC 8090 türü üzerindeki 23,0 mm zon değeri oluşturan U75 konsantrasyonu IPM10 (39,0 mm), TE30 (30,0 mm), S10 (25,0 mm) ve AK30'dan (25,0 mm) daha az etkili olmuştur.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 türünde 17,0 mm inhibisyon zonu oluşturan U50 konsantrasyonu VA30 (15,0 mm) ve S10 (16,0 mm) değerlerinden yüksek, diğer mukayese antibiyotik değerlerinden daha düşük aktivitededir.

Escherichia coli ATCC 25992 türündeki U25 (16,3 mm), U50 (10,3 mm) ve U75 (10,0 mm) konsantrasyonlarındaki inhibisyon değerleri, P10U (7,0 mm) değerinden daha fazladır.

Klebsiella oxytoca ATCC 8724 üzerine olan U25, U50 ve U75 konsantrasyonlarının 9,6 mm, 10,0 mm ve 11,6 mm'lik antimikrobiyal aktivite değerleri tüm mukayese antibiyotik değerlerinden daha düşüktür.

Listeria innocua ATCC 33090 üzerindeki en yüksek değer olan 15,6 mm'lik inhibisyon zonu ile U25, FF50 (14,0 mm), VA30 (12,0 mm) ve NR100'den (14,0 mm) daha aktiftir.

Proteus vulgaris ATCC 8427 türüne karşı oluşturduğu 26,3 mm'lik zon değeri ile U25 konsantrasyonu E15 (30,0 mm), IPM10 (32,0 mm) ve S10 (30,0 mm) zon değerlerinden daha düşüktür.

U25 (9,6 mm), U50 (10,0 mm) ve U75 (11,6 mm) konsantrasyonları *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde sadece TE30 (8,0 mm) inhibisyon değerinden daha yüksek antimikrobiyal etkidedir.

Salmonella enteritidis ATCC 13076 üzerinde en yüksek inhibisyon değerini oluşturan U75 (27,3 mm) konsantrasyonu mukayese edilen tüm antibiyotik değerlerinden daha yüksek etki göstermiştir.

Salmonella typhimurium CCM 5445 türü üzerine U50 (15,0 mm) ve U75 (15,0 mm) konsantrasyonları, VA30 (15,0 mm) ile aynı etkide, P10U'dan (7,0 mm) daha yüksek diğer antibiyotiklerden daha düşük etkidedir.

Shigella flexneri ATCC 12022 türündeki 26,3 mm'lik inhibisyon değeri ile U75 konsantrasyonu FF50 (18,0 mm), VA30 (18,0 mm), TE30 (13,0 mm), P10U (7,0 mm) ve NR100'den (20,0 mm) daha aktiftir.

U75 konsantrasyonu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P üzerindeki 29,6 mm'lik inhibisyon zon değeri ile FF50 (30,0 mm) hariç tüm mukayese antibiyotik değerlerinden daha fazla etkili olmuştur.

Staphylococcus epidermidis ATCC 3699 türü üzerinde oluşturduğu 20,3 mm'lik değer ile U75 konsantrasyonu FF50 (20,0 mm) ve TOB10 (20,0 mm) ile benzer etkide, E15 (29,0 mm), IPM 10 (32,0 mm), S10 (27,0 mm) ve AK30 (24,0 mm) değerlerinden düşük etkide, K30 (18,0 mm), VA30 (17,0 mm), N30 (18,0 mm), TE30 (17,0 mm), P10U (10,0 mm) ve NR100'den (10,0 mm) daha yüksek etkidedir.

Streptococcus pyogenes ATCC 19615 üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon değerleri ile U25 (24,3 mm), U50 (24,3 mm) ve U75 (30,3 mm) konsantrasyonları FF50 (18,0 mm), VA30 (15,0 mm), TE30 (18,0 mm), P10U (9,0 mm) ve NR100'den (14,0 mm) daha fazla antibakteriyel aktiviteye sahiptir.

Tüm mukayese antibiyotikleri *Yersinia pestis* ATCC 19428 üzerinde U25 (11,3 mm), U50 (10,6 mm) ve U75'in (13,6 mm) oluşturduğu inhibisyon zon değerlerinden daha fazla etki göstermiştir.

4.2. TARTIŞMA

Çalışmada, *Ramalina farinacea* ve *Usnea intermedia* liken ekstrelerinin (25 µL-50 µL-75 µL) 16 bakteri ve 8 maya türü üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldı. Ekstrelerinin genel olarak bakterilerden ziyade mayalar üzerinde daha etkili olduğu saptandı.

Ramalina farinacea ile ilgili yapılan literatür taramalarında, Esimone ve Adikwu (1999) yapmış oldukları *Ramalina farinacea* likeninin antimikrobiyal aktivite çalışmasında etanol, kloroform ve *n*-hekzan çözücüleri kullanılmıştır. Araştırmacılar 4 mg/disk etanol ekstraktı kullandıkları deneylerinde belli değerlerde inhibisyon zonları elde etmişlerdir. *Ramalina farinacea* 25 µL'lik ekstreminde *Escherichia coli* ATCC 25992 türüne karşı inhibisyon zonunu 17,3 mm çapında bulmamız araştırmacıların da *Escherichia coli* ATCC 9637 türünde elde ettiği 17 mm'lik inhibisyon zonu değeri ile paralellik göstermektedir. Araştırmacılar 31 mm'lik inhibisyon zonuyla en yüksek antibakteriyel aktiviteyi *Staphylococcus aureus* ATCC 13709 türünde saptamışlardır. Çalışmamızdaki *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P türünde ise en büyük zon 22,6 mm olarak

kaydedilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 türündeki inhibisyon değerlerimiz 13,6 mm (R25), 15,0 mm (R50), 12,6 mm (R75) iken araştırmacılar *Pseudomonas aeruginosa* türünde bu değeri 21 mm olarak kaydetmişlerdir. Araştırmacıların kullandığı *Candida albicans* maya türünde inhibisyon değeri 24 mm olarak ölçülürken bu değer kullandığımız *Candida albicans* ATCC 90028 türünde 25 µL'lik konsantrasyondaki *Ramalina farinacea* liken özütündeki değer ile aynıdır. R50 (27,0 mm) ve R75 (26,6 mm) konsantrasyonlarında ölçtüğümüz değerler ise daha fazla etkilidir. *Ramalina farinacea* ekstraktları her iki çalışmada da, benzer ve farklılıklarının olmasına rağmen, kayda değer verilerin elde edilmesini sağlamıştır.

Tay ve diğ. (2004)'te *Ramalina farinacea* ile yapmış oldukları çalışmalarında aseton ile çözdürdükleri ekstraktların MIC metodu ile antimikrobiyal aktivitelerini saptamaya çalışmışlardır. Kullanılan yöntem farklıdır ve çalışmamızdaki benzer organizmalardan olan; *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* türlerinde aktivite olmadığını ölçmüşlerdir. *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* türlerinde MIC değerini 3,3 µg/µL ölçmüşlerdir. Disk difüzyon yöntemini kullandığımız çalışmada *Bacillus cereus* ATCC 7064 türünde 15,0 mm, *Escherichia coli* ATCC 25992 türünde 17,3 mm, *Proteus vulgaris* ATCC 8427 üzerinde 21,6 mm, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 türünde 15,0 mm, *Salmonella typhimurium* ATCC 13,0 mm, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P türünde 22,6 mm, *Candida albicans* ATCC türünde 27,0 mm ve *Candida glabrata* ATCC 90030 türünde 27,3 mm'lik inhibisyon zonları ölçülmüştür. Araştırmacıların bazı türler üzerinde aktivite saptamaları, liken türünün antimikrobiyal aktivitesi bakımından çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

Ramalina farinacea liken özütünün ve tetrasiklin antibiyotikinin çeşitli oranlarda birleştirilerek hazırlanması sonucu oluşturdukları kombinasyonun etkisini ölçmeyi hedefleyen Agboke ve diğ. (2011)'de klinik izolat olan *Staphylococcus aureus* türünün üç suşu ile çalışmışlardır. Metanol çözücüsü kullanarak, dama tahtası metodu uyguladıkları deneyde, metoda uygun farklı konsantrasyonlar kullanmışlar ve inhibisyon zonları elde etmişlerdir. 1000 µg/mL'lik en yüksek konsantrasyonda, *Staphylococcus aureus* I izolatında elde ettikleri inhibisyon zonu 19 mm'dir. Etanol ekstraktlarımızda *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P türe karşı elde ettiğimiz en büyük inhibisyon zon değeri ise 22,6 mm'dir. Aynı uygulamayı yapan Agboke ve

Esimone (2011) başka bir çalışmada *Ramalina farinacea* metanol ekstraktı ile ampicilin antibiyotigini kombinleyerek çalışmışlardır ve *Staphylococcus aureus* izolatlarına karşı en yüksek inhibisyon zonunu 19,5 mm olarak kaydetmişlerdir. Farklı sonuçların saptanması uygulanan yöntem ve strain farklılığından kaynaklanabilir.

Gulluce ve diğ. (2006)'da yapmış oldukları çalışmada kullandığımız tür olmasada aynı genusa ait olan *Ramalina pollinaria* ve *Ramalina polymorpha* türlerinin metanol ekstraktı ile çalışmışlardır. *Proteus vulgaris* A 161, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27859, *Pseudomonas aeruginosa* F 5, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* A 215, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* A 233, *Streptococcus pyogenes* KUKEM 676 türlerinde aktivite gözlemlememişlerdir. *Ramalina pollinaria* 300 µg/disk ekstraktında *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 türünde 7 mm, *Escherichia coli* A 1 türünde 10 mm, *Proteus vulgaris* KUKEM 1329 türünde 8 mm inhibisyon zonu ölçülürken, *Ramalina polymorpha* ekstraktında *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 türünde 8 mm, *Escherichia coli* A 1 türünde 10 mm, *Proteus vulgaris* KUKEM 1329 türünde 7 mm, *Streptococcus pyogenes* ATCC 176 türünde 8 mm değerinde inhibisyon zonları ölçmüşlerdir. Etanol ekstraktlarımızda *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 türü üzerinde 12,6 mm, 10,3 mm ve 10,6 mm inhibisyon zon değerleri saptanmıştır. *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 türünde ise 18,6 mm, 23,0 mm ve 29,6 mm çapında inhibisyon değerleri elde edilmiştir.

Saenz ve diğ. (2006)'da *Ramalina canariensis* ve *Ramalina subfarinacea* liken türleri ile çalışmışlardır. Aseton çözücüsünü kullanan araştırmacılar farklı konsantrasyonlar (25 µL, 10 µL, 5 µL, 2 µL, 1 µL ve 0,5 µL) kullanmışlardır. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* türlerine karşı *Ramalina subfarinacea* aseton ekstraktında aktivite saptamamışlardır. *Ramalina subfarinacea* 25 µL'lik ekstresinde *Bacillus cereus* türüne karşı 12 mm inhibisyon zonu kaydetmişlerdir. *Ramalina canariensis* 25 µL'lik ekstresinde ise *Bacillus cereus* türü üzerinde 21 mm, *Staphylococcus aureus* türü üzerinde 22 mm inhibisyon zonu ölçmüşlerdir. Etanol ekstraktlarımızda elde ettiğimiz sonuçlarda *Bacillus cereus* ATCC 7064 türünün R25'deki inhibisyon zonu 13,0 mm'dir. Bu değer *Ramalina canariensis* ekstresinden düşük *Ramalina subfarinacea* ekstresinden yüksek değerdedir. Aynı genusa ait farklı türlerde yakın aktivite değerleri görülmektedir.

Shrestha ve Clair (2013)'te *Ramalina menziesii* ve *Usnea lapponica* likenlerinin metanol ve aseton ekstraktlarını MIC yöntemi kullanarak *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve MRSA türleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini çalışmışlardır. *Escherichia coli* hariç diğer türlerde aktivite gözlemlenmişler ve aseton ekstraktın metanol ekstraktan daha aktif olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda *Escherichia coli* ATCC 25992 türü üzerinde R25'de 17,3 mm ve U25'de 16,3 mm, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 türü üzerinde R50'de 15,0 mm ve U75'de 11,6 mm, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P türü üzerinde R75'de 22,6 mm ve U75'de 29,6 mm çaplarında inhibisyon zonları ölçülmüştür. *Usnea* genusu ile yapılan farklı çalışmalar bulunmasına rağmen *Usnea intermedia* liken türüne ait literatür bilgisine rastlanılmamıştır. Bu yüzden genusun birkaç türü ile karşılaştırma yapılarak, türlerin sahip oldukları antimikrobiyal etkinin benzerliği ve farklılığı saptanmaya çalışılmıştır.

Ramalinaceae familyasına ait türlerle araştırma yapılan bir diğer çalışmada Paudel ve diğ. (2012) 500 µg/disk metanol ekstrakt emdirdikleri 8 mm çapındaki steril disklerden *Staphylococcus aureus* türüne karşı 11 mm'lik inhibisyon zon değeri elde etmişlerdir. MIC değerini 8.5±0.1 µg/mL olarak bulmuşlardır. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P türüne karşı etanol ekstrakta bulduğumuz sonuç ise R25'de 13,6 mm, R50'de 14,6 mm ve R75'de 22,6 mm'dir. Sonuçların farklılığı çözücü ve strain farklılığından kaynaklanabilir. Yine bu araştırmacılar aynı çalışmada *Usnea* genusuna ait bir likenin metanol ekstraktı ile de çalışmışlar ve *Staphylococcus aureus* türü üzerinde 18 mm'lik inhibisyon zonu ölçmüşlerdir. *Usnea intermedia* etanol ekstraktı kullandığımız çalışmamızda ise *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P türü üzerinde bulduğumuz değerler U25'de 20,0 mm, U50'de 22,0 mm ve U75'de 29,6 mm'dir. *Usnea* genusunun farklı türleri olsa da genusun antimikrobiyal aktivitesi sayesinde kayda değer veriler elde edilmektedir.

Srivastava ve diğ. (2013)'te *Usnea ghattensis* likeninin aseton, metanol ve etanol ekstraktları ile çalışmışlardır. Etanol ekstrakt sonuçlarını baz aldığımızda *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 türü üzerinde 0,1 mg/mL'de 8,8±0,8 mm, 0,2 mg/mL'de 19,1±0,8 mm, *Bacillus cereus* ATCC 14579 türünün üzerinde 0,1 mg/mL'de 20,4±0,5 mm, 0,2 mg/mL'de 29,8±0,6 mm, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29853 türü üzerinde 0,2 mg/mL'de 12,3±0,5 mm'lik inhibisyon değerleri kaydetmişlerdir.

Escherichia coli ATCC 25922 ve *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 türlerinde aktivite belirleyememişlerdir. Çalışmamızdaki etanol ekstrakt değerleri ise *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P üzerinde U25’de 20,0 mm, U50’de 22,0 mm ve U75’de 29,6 mm inhibisyon değerleri ölçülmüştür. *Bacillus cereus* ATCC 7064 türü üzerinde 16,0 mm, 15,0 mm ve 22,0 mm’lik değerler ölçülmüştür. Araştırmacıların kullandığı tür ile aynı olan *Escherichia coli* ATCC 25992 türünde 16,3 mm, 10,3 mm ve 10,0 mm inhibisyon zonları bulunmaktadır. Yaptıkları çalışmada *Escherichia coli* türünde aktivite saptayamamaları bizim çalışmamızda ise kayda değer bulgu elde edilmesi kullanılan çözücünün konsantrasyonunun farklı olmasından kaynaklanabilir. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 türü üzerinde 9,6 mm, 10,0 mm ve 11,6 mm’lik değerler kaydedilmiştir. *Salmonella typhimurium* CCM 5445 türünde ise 11,6 mm, 15,0 mm ve 15,0 mm değerinde inhibisyon zonu bulunmaktadır.

Usnea ghattensis ile yapılan bir başka çalışmada Behera ve diğ. (2005) metanol ve aseton ekstraktların aktiviteleri araştırmışlardır. *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus licheniformis* türleri üzerine uyguladıkları farklı konsantrasyonlardaki (5µg, 10µg ve 20µg) metanol ve aseton ekstrelerin benzer aktivite gösterdiklerini bulmuşlardır. Petroleum ekstresinde ise daha fazla aktivite elde etmişler. *Staphylococcus aureus* türünde en fazla aktiviteyi petroleum 20 µg ekstraktında 3,5 cm olarak, *Bacillus licheniformis* türünde en fazla aktiviteyi 20 µg petroleum ekstraktında 3,0 cm olarak ölçmüşler. Etanol ekstraktı kullandığımız çalışmamızda *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 türü üzerinde en fazla aktivite 20,6 mm’lik değeri ile U75 konsantrasyonunda görülmektedir.

Sultana ve Afolayan (2011)’de *Usnea undulata* likeninden *n*-hekzan ve etil asetat çözücülerini kullanarak farklı bileşikler elde etmiş, Gram (+) ve Gram (-) bakteriler üzerine olan aktivitelerini MIC metoduyla araştırmışlardır. Bütün bileşiklerin *Bacillus subtilis* türüne karşı kayda değer aktivite gösterdiğini saptamışlardır. (+) usnik asit bileşiğinin *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* türlerine karşı en aktif bileşik olduğunu kaydetmişlerdir. Kullandığımız *Usnea intermedia* likeninin de bakteriler üzerindeki kayda değer aktivitelere sahip olması sayesinde, aynı genusa ait türlerin içerdikleri komponentler aracılığıyla benzer etkiler oluşturdukları gözlemlenebilmektedir.

Yapılan tüm çalışmalardaki benzerlik ve farklılıklar; kullanılan mikroorganizmadan, çözücüden ve çözücünün farklı konsantrasyonlarından, uygulanan farklı metodlardan, likenlerin farklı habitatlarda yetişmesinden kaynaklanmaktadır. Özenoğlu ve diğ. (2013), Shrestha ve St. Clair (2013), Sultana ve Afolayan (2011), Saenz ve diğ. (2006), Tay ve diğ. (2004), Esimone ve Adikwu (1999) yaptıkları çalışmalarda belirttikleri liken sekonder metabolitlerinin oluşturduğu antimikrobiyal etki de bu benzerlik ve farklılığın oluşmasında büyük rol oynamıştır. Ayrıca artan konsantrasyonlarda uyguladığımız ekstrelerin bazı türlerdeki inhibe edici etkisinde kademeli artış gözlemlenirken Ritika ve Jayanthi (2013), Balaji ve Hariharan (2007) ve Saenz ve diğ. (2006)'da da olduğu gibi bazılarında tam tersi durum görülmüştür. Bu farklılık antagonistik etkinin belli bir seviyeden sonra doygunluğa ulaşarak etkisini azaltmasına bağlanabilir.

Çizelge 1. *Ramalina farinacea* likeninin antifungal aktivitesi.

Test Mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonları (mm)*											
	Ektraktlar			Mukayese Antibiyotikleri								
	R 25	R 50	R 75	GRS 10	ITR 10	CLT 10	5FC 1	KTC 10	MCZ 10	FLU 25	AMB 100	NY 100
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	24,0	27,0	26,6	16,0	14,0	18,0	12,0	10,0	12,0	19,0	20,0	10,0
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	20,3	23,0	27,3	16,0	7,0	10,0	12,0	15,0	10,0	17,0	13,0	11,0
<i>Candida lipolytica</i> ATCC 8660	19,6	22,3	21,0	16,0	14,0	16,0	16,0	16,0	8,0	24,0	15,0	14,0
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	21,0	23,0	23,3	13,0	13,0	7,0	18,0	15,0	10,0	12,0	14,0	8,0
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 4563	20,6	23,6	19,6	12,0	16,0	8,0	12,0	15,0	12,0	18,0	15,0	14,0
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 32045	23,3	22,0	23,0	12,0	14,0	7,0	16,0	18,0	18,0	20,0	7,0	10,0
<i>Debaryomyces hansenii</i> DSM 70238	20,0	22,3	19,3	16,0	10,0	10,0	17,0	22,0	18,0	22,0	16,0	10,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9796	19,6	23,6	28,3	15,0	8,0	12,0	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	20,0

R 25: *Ramalina farinacea* 25µL ekstraktı,
R 50: *Ramalina farinacea* 50µL ekstraktı,
R 75: *Ramalina farinacea* 75µL ekstraktı,
GRS 10: Griseofulvin 10µg,

ITR 10: Itraconazole 10µg,
CLT 10: Clotrimazole 10µg,
5FC 1: Flucytosine 1µg,
KTC 10: Ketoconazole 10µg,

MCZ 10: Miconazole 10µg,
FLU 25: Fluconazole 25µg,
AMB 100: Amphotericin 100µg,
NY 100: Nystatin 100µg,

(*) : Rakamlar inhibisyon zonlarının çaplarını göstermektedir, her disk 6mm çapındadır ve deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Çizelge 2. *Ramalina farinacea* likeninin antibakteriyel aktivitesi.

Test mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonları (mm)*														
	Ekstraktlar			Mukayese antibiyotikleri											
	R 25	R 50	R 75	E 15	K 30	IPM 10	FF 50	VA 30	S 10	N 30	TE 30	AK 30	TOB 10	P 10U	NR 100
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064	13,0	13,6	15,0	28,0	22,0	17,0	19,0	14,0	30,0	24,0	16,0	20,0	25,0	10,0	15,0
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	16,3	16,0	18,0	13,0	20,0	37,0	22,0	18,0	27,0	18,0	24,0	24,0	20,0	11,0	16,0
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	18,0	21,3	21,0	15,0	20,0	39,0	22,0	18,0	25,0	22,0	30,0	25,0	21,0	8,0	16,0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	12,6	10,3	10,6	28,0	20,0	20,0	20,0	15,0	16,0	20,0	27,0	30,0	28,0	22,0	18,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25992	17,3	16,0	10,0	36,0	24,0	36,0	22,0	14,0	14,0	20,0	18,0	25,0	25,0	7,0	18,0
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	13,3	13,6	16,0	20,0	21,0	28,0	20,0	17,0	24,0	20,0	30,0	20,0	24,0	15,0	20,0
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	14,3	16,3	16,0	26,0	22,0	24,0	14,0	12,0	21,0	22,0	18,0	30,0	28,0	24,0	14,0
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	16,0	21,6	20,0	30,0	15,0	32,0	26,0	18,0	30,0	18,0	12,0	21,0	14,0	12,0	16,0

R 25: *Ramalina farinacea* 25µL ekstraktı,
R 50: *Ramalina farinacea* 50µL ekstraktı,
R 75: *Ramalina farinacea* 75µL ekstraktı,
E 15: Erythromycin 15µg,
K 30: Kanamycin 30µg,
(*) : Rakamlar inhibisyon zonlarının çaplarını göstermektedir, her disk 6mm çapındadır ve deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

IPM 10: Imipenem 10µg,
FF 50: Fosfomicin 50µg,
VA 30: Vancomycin 30µg,
S 10: Streptomycin 10µg,
N 30: Neomycin 30µg,

TE 30: Tetracycline 30µg,
AK 30: Amikacin 30µg,
TOB 10: Tobramycin 10µg,
P 10U: Penicillin G 10Uµg,
NR 100: Nitrofurazone 100µg,

Çizelge 2. (devam) *Ramalina farinacea* likeninin antibakteriyel aktivitesi.

Test mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonları (mm)*														
	Ekstraktlar			Mukayese antibiyotikleri											
	R 25	R 50	R 75	E 15	K 30	IPM 10	FF 50	VA 30	S 10	N 30	TE 30	AK 30	TOB 10	P 10U	NR 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13,6	15,0	12,6	25,0	23,0	26,0	26,0	22,0	25,0	16,0	8,0	27,0	30,0	26,0	20,0
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	18,6	23,0	29,6	8,0	10,0	14,0	23,0	23,0	12,0	14,0	10,0	11,0	12,0	10,0	20,0
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 5445	10,0	13,0	10,0	39,0	24,0	20,0	18,0	15,0	28,0	24,0	22,0	26,0	26,0	7,0	16,0
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	15,0	17,3	15,6	36,0	24,0	26,0	18,0	18,0	30,0	22,0	13,0	25,0	26,0	7,0	20,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	13,6	14,6	22,6	25,0	21,0	25,0	30,0	15,0	24,0	22,0	12,0	20,0	26,0	12,0	12,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 3699	15,6	17,6	19,3	29,0	18,0	32,0	20,0	17,0	27,0	18,0	17,0	24,0	20,0	10,0	10,0
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	16,3	17,6	15,6	30,0	30,0	32,0	18,0	15,0	27,0	25,0	18,0	29,0	30,0	9,0	14,0
<i>Yersinia pestis</i> ATCC 19428	10,3	14,0	13,0	27,0	22,0	35,0	17,0	15,0	22,0	30,0	23,0	20,0	30,0	20,0	14,0

R 25: *Ramalina farinacea* 25µL ekstraktı,
R 50: *Ramalina farinacea* 50µL ekstraktı,
R 75: *Ramalina farinacea* 75µL ekstraktı,
E 15: Erythromycin 15µg,
K 30: Kanamycin 30µg,

IPM 10: Imipenem 10µg,
FF 50: Fosfomycin 50µg,
VA 30: Vancomycin 30µg,
S 10: Streptomycin 10µg,
N 30: Neomycin 30µg,

TE 30: Tetracycline 30µg,
AK 30: Amikacin 30µg,
TOB 10: Tobramycin 10µg,
P 10U: Penicillin G 10Uµg,
NR 100: Nitrofurazone 100µg,

(*) : Rakamlar inhibisyon zonlarının çaplarını göstermektedir, her disk 6mm çapındadır ve deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Çizelge 3. *Usnea intermedia* likeninin antifungal aktivitesi.

Test Mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonları (mm)*											
	Ekstraktlar			Mukayese Antibiyotikleri								
	U	U	U	GRS	ITR	CLT	5FC	KTC	MCZ	FLU	AMB	NY
	25	50	75	10	10	10	1	10	10	25	100	100
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	16,3	24,0	29,3	16,0	14,0	18,0	12,0	10,0	12,0	19,0	20,0	10,0
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	14,0	14,6	22,6	16,0	7,0	10,0	12,0	15,0	10,0	17,0	13,0	11,0
<i>Candida lipolytica</i> ATCC 8660	14,3	19,3	18,0	16,0	14,0	16,0	16,0	16,0	8,0	24,0	15,0	14,0
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	16,3	24,0	21,6	13,0	13,0	7,0	18,0	15,0	10,0	12,0	14,0	8,0
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 4563	13,0	10,3	23,3	12,0	16,0	8,0	12,0	15,0	12,0	18,0	15,0	14,0
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 32045	15,0	18,0	21,3	12,0	14,0	7,0	16,0	18,0	18,0	20,0	7,0	10,0
<i>Debaryomyces hansenii</i> DSM 70238	10,0	8,6	10,0	16,0	10,0	10,0	17,0	22,0	18,0	22,0	16,0	10,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9796	12,6	18,3	21,6	15,0	8,0	12,0	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	20,0

U 25: *Usnea intermedia* 25µL ekstraktı,
 U 50: *Usnea intermedia* 50µL ekstraktı,
 U 75: *Usnea intermedia* 75µL ekstraktı,
 GRS 10: Griseofulvin 10µg,

ITR 10: Itraconazole 10µg,
 CLT 10: Clotrimazole 10µg,
 5FC 1: Flucytosine 1µg,
 KTC 10: Ketoconazole 10µg,

MCZ 10: Miconazole 10µg,
 FLU 25: Fluconazole 25µg,
 AMB 100: Amphotericin 100µg,
 NY 100: Nystatin 100µg,

(*) : Rakamlar inhibisyon zonlarının çaplarını göstermektedir, her disk 6mm çapındadır ve deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Çizelge 4. *Usnea intermedia* likeninin antibakteriyel aktivitesi.

Test mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonları (mm)*														
	Ekstraktlar			Mukayese antibiyotikleri											
	U	U	U	E	K	IPM	FF	VA	S	N	TE	AK	TOB	P	NR
	25	50	75	15	30	10	50	30	10	30	30	30	10	10U	100
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064	16,0	15,0	22,0	28,0	22,0	17,0	19,0	14,0	30,0	24,0	16,0	20,0	25,0	10,0	15,0
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	13,0	14,3	20,6	13,0	20,0	37,0	22,0	18,0	27,0	18,0	24,0	24,0	20,0	11,0	16,0
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	17,0	16,3	23,0	15,0	20,0	39,0	22,0	18,0	25,0	22,0	30,0	25,0	21,0	8,0	16,0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	8,6	17,0	9,6	28,0	20,0	20,0	20,0	15,0	16,0	20,0	27,0	30,0	28,0	22,0	18,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25992	16,3	10,3	10,0	36,0	24,0	36,0	22,0	14,0	14,0	20,0	18,0	25,0	25,0	7,0	18,0
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	9,6	10,0	11,6	20,0	21,0	28,0	20,0	17,0	24,0	20,0	30,0	20,0	24,0	15,0	20,0
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	15,6	12,3	14,6	26,0	22,0	24,0	14,0	12,0	21,0	22,0	18,0	30,0	28,0	24,0	14,0
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	26,3	12,3	11,0	30,0	15,0	32,0	26,0	18,0	30,0	18,0	12,0	21,0	14,0	12,0	16,0

U 25: *Usnea intermedia* 25µL ekstraktı,

U 50: *Usnea intermedia* 50µL ekstraktı,

U 75: *Usnea intermedia* 75µL ekstraktı,

E 15: Erythromycin 15µg,

K 30: Kanamycin 30µg,

(*) : Rakamlar inhibisyon zonlarının çaplarını göstermektedir, her disk 6mm çapındadır ve deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

IPM 10: Imipenem 10µg,

FF 50: Fosfomycin 50µg,

VA 30: Vancomycin 30µg,

S 10: Streptomycin 10µg,

N 30: Neomycin 30µg,

TE 30: Tetracycline 30µg,

AK 30: Amikacin 30µg,

TOB 10: Tobramycin 10µg,

P 10U: Penicillin G 10Uµg,

NR 100: Nitrofurazone 100µg,

Çizelge 4. (devam) *Usnea intermedia* likeninin antibakteriyel aktivitesi.

Test mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonları (mm)*														
	Ekstraktlar			Mukayese antibiyotikleri											
	U 25	U 50	U 75	E 15	K 30	IPM 10	FF 50	VA 30	S 10	N 30	TE 30	AK 30	TOB 10	P 10U	NR 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	9,6	10,0	11,6	25,0	23,0	26,0	26,0	22,0	25,0	16,0	8,0	27,0	30,0	26,0	20,0
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	16,0	16,3	27,3	8,0	10,0	14,0	23,0	23,0	12,0	14,0	10,0	11,0	12,0	10,0	20,0
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 5445	11,6	15,0	15,0	39,0	24,0	20,0	18,0	15,0	28,0	24,0	22,0	26,0	26,0	7,0	16,0
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	22,3	23,0	26,3	36,0	24,0	26,0	18,0	18,0	30,0	22,0	13,0	25,0	26,0	7,0	20,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	20,0	22,0	29,6	25,0	21,0	25,0	30,0	15,0	24,0	22,0	12,0	20,0	26,0	12,0	12,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 3699	15,6	17,6	20,3	29,0	18,0	32,0	20,0	17,0	27,0	18,0	17,0	24,0	20,0	10,0	10,0
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	24,3	24,3	30,3	30,0	30,0	32,0	18,0	15,0	27,0	25,0	18,0	29,0	30,0	9,0	14,0
<i>Yersinia pestis</i> ATCC 19428	11,3	10,6	13,6	27,0	22,0	35,0	17,0	15,0	22,0	30,0	23,0	20,0	30,0	20,0	14,0

U 25: *Usnea intermedia* 25µL ekstraktı,

U 50: *Usnea intermedia* 50µL ekstraktı,

U 75: *Usnea intermedia* 75µL ekstraktı,

E 15: Erythromycin 15µg,

K 30: Kanamycin 30µg,

IPM 10: Imipenem 10µg,

FF 50: Fosfomicin 50µg,

VA 30: Vancomycin 30µg,

S 10: Streptomycin 10µg,

N 30: Neomycin 30µg,

TE 30: Tetracycline 30µg,

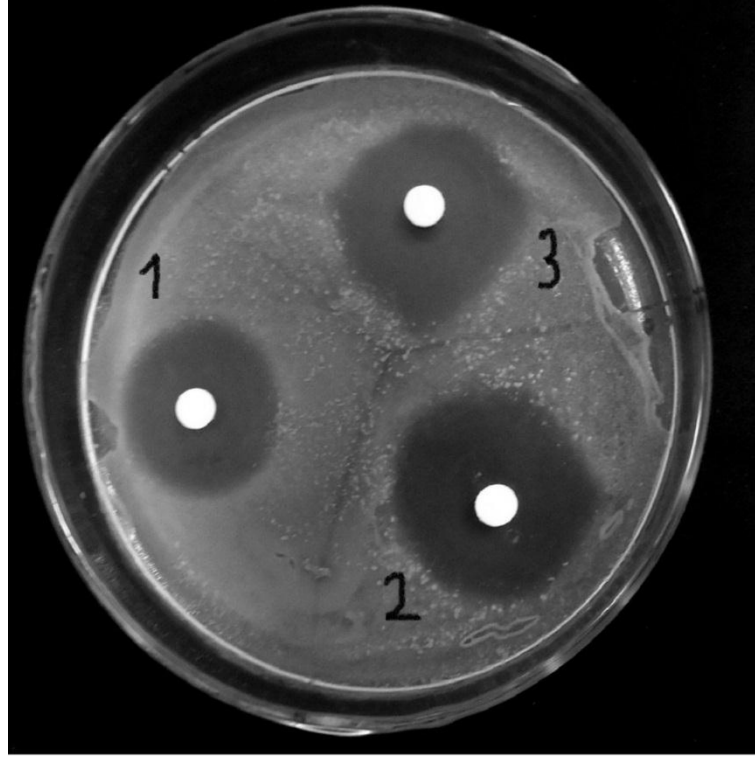
AK 30: Amikacin 30µg,

TOB 10: Tobramycin 10µg,

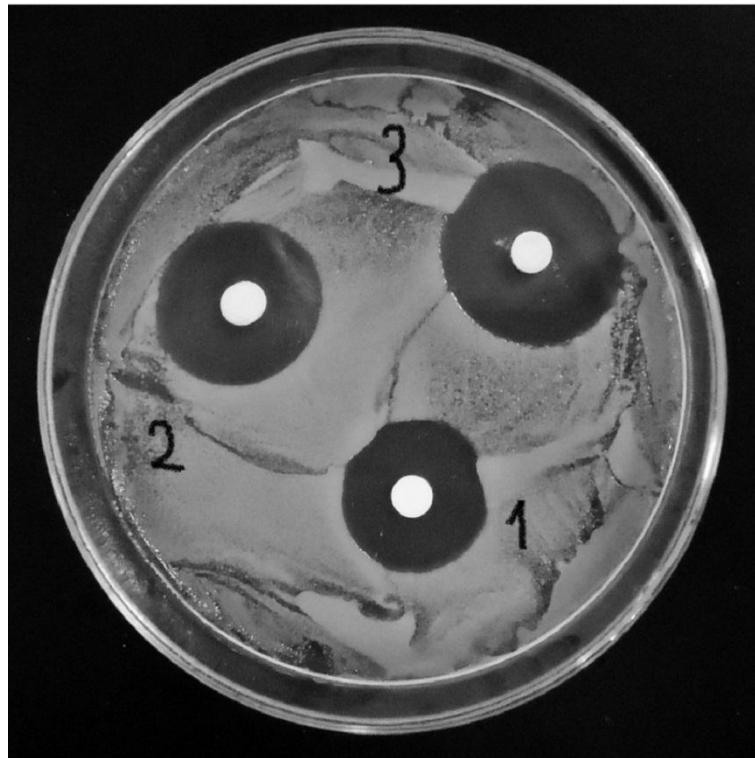
P 10U: Penicillin G 10Uµg,

NR 100: Nitrofurazone 100µg,

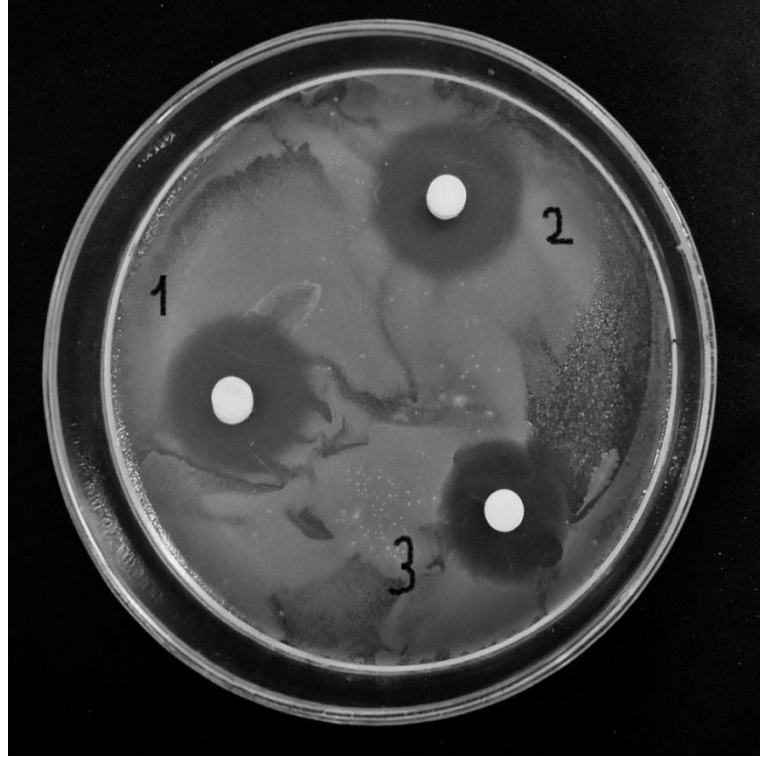
(*) : Rakamlar inhibisyon zonlarının çaplarını göstermektedir, her disk 6mm çapındadır ve deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.



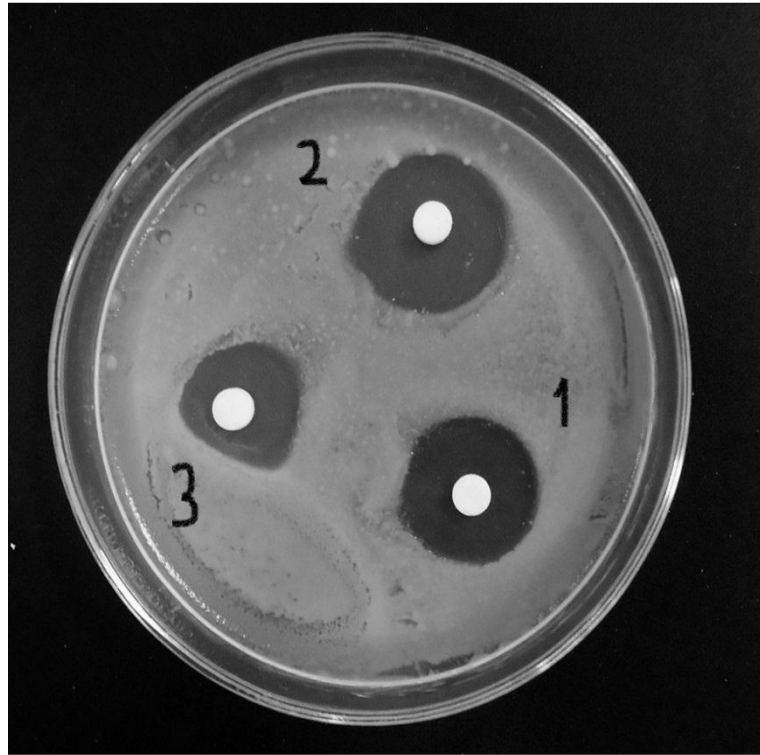
Şekil 1. *Ramalina farinacea* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Candida albicans* ATCC 90028 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL.



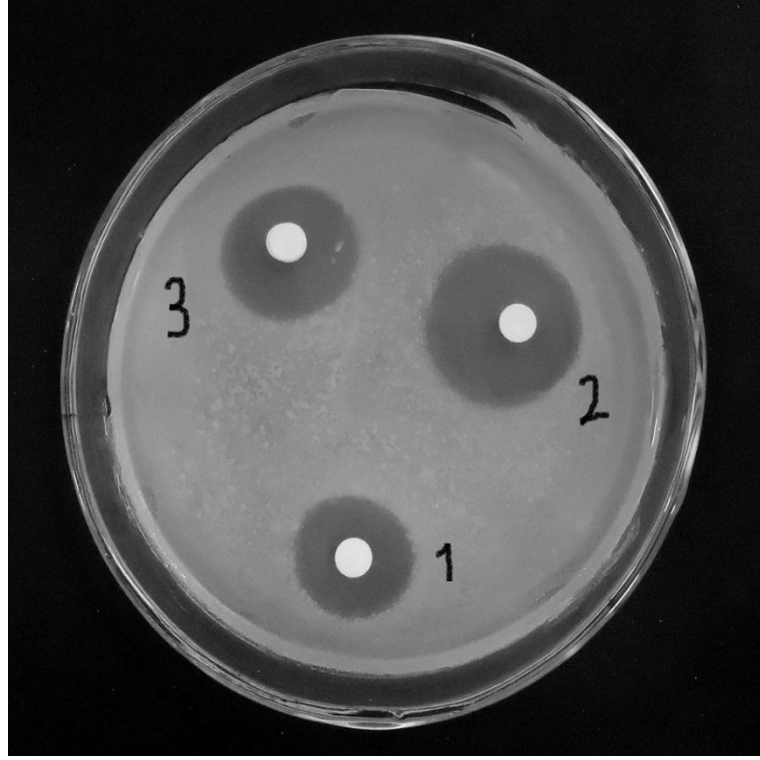
Şekil 2. *Ramalina farinacea* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Candida parapsilosis* ATCC 22019 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL.



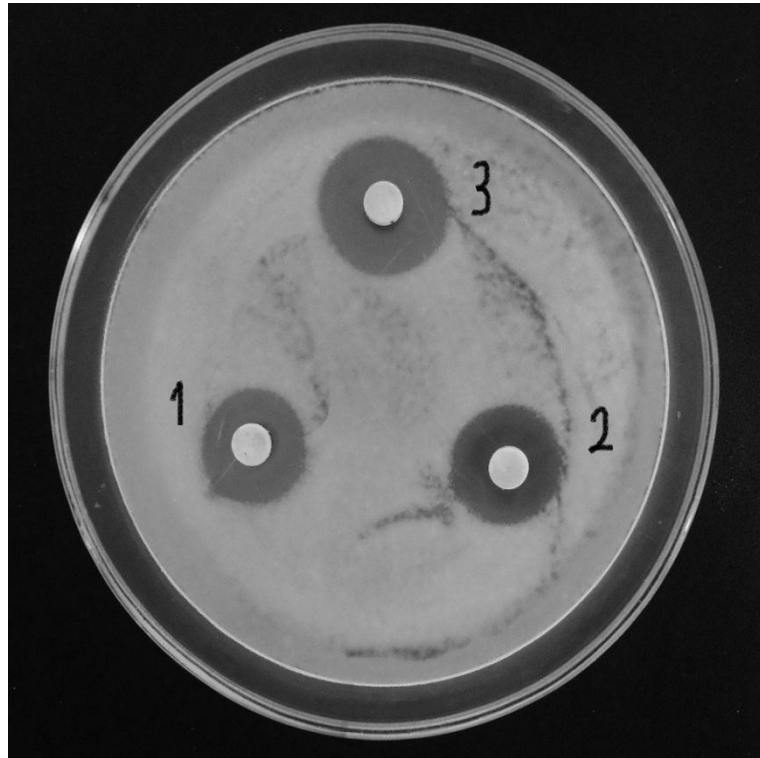
Şekil 3. *Ramalina farinacea* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Candida tropicalis* ATCC 4563 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25 μ L; 2: 50 μ L; 3: 75 μ L.



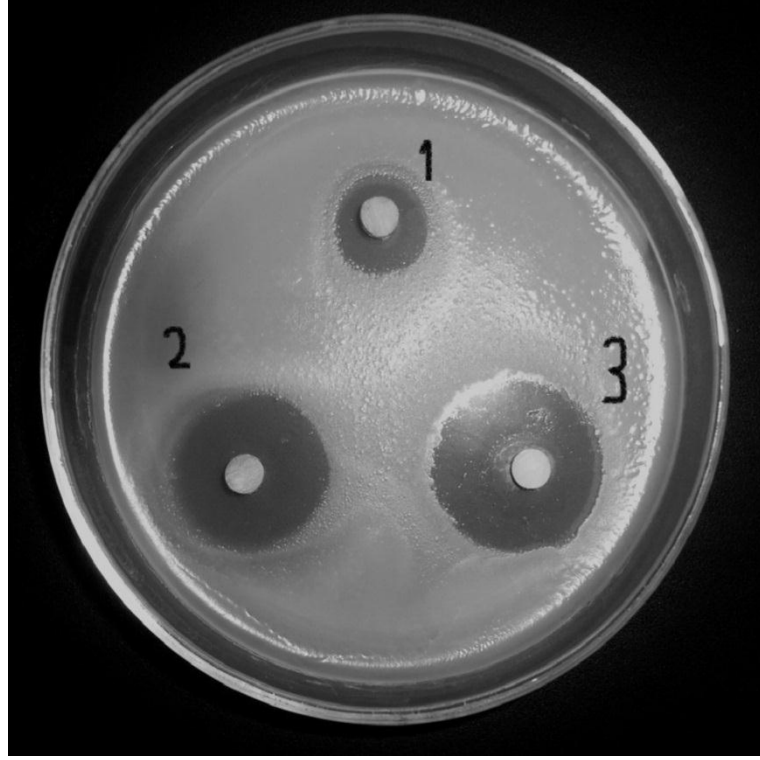
Şekil 4. *Ramalina farinacea* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Debaryomyces hansenii* DSM 70238 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25 μ L; 2: 50 μ L; 3: 75 μ L.



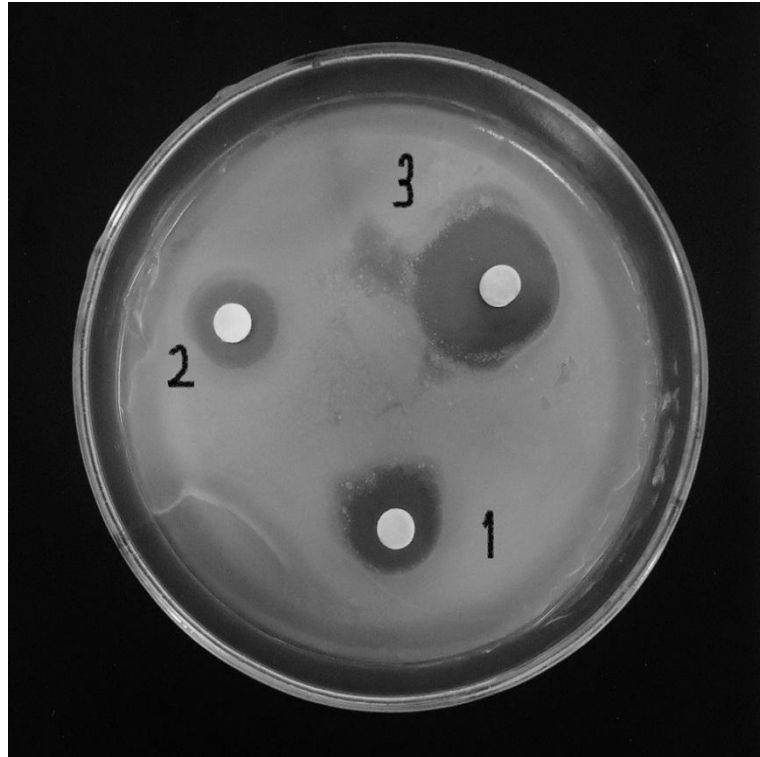
Şekil 5. *Ramalina farinacea* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Citrobacter freundii* ATCC 8090 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL.



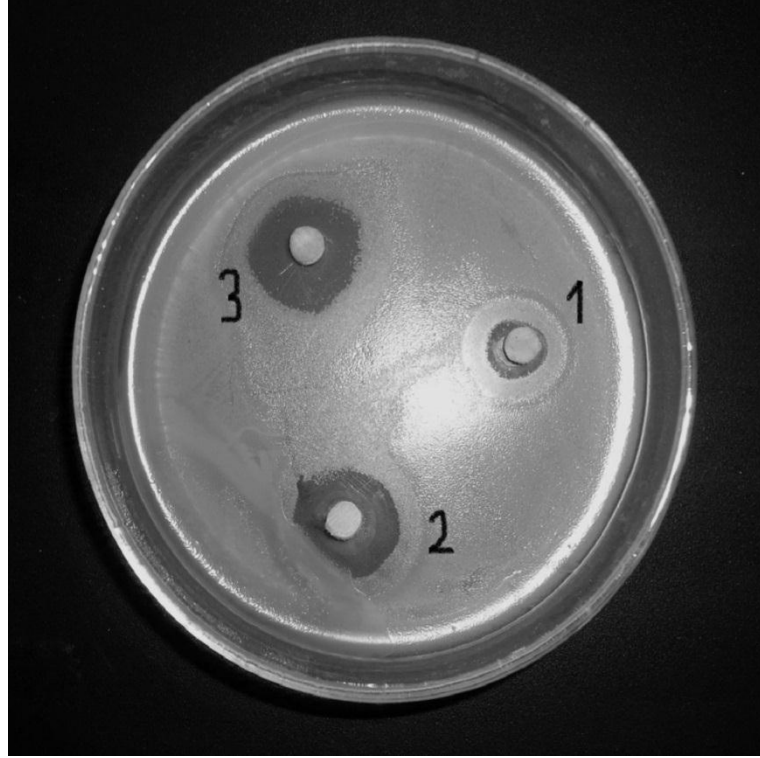
Şekil 6. *Usnea intermedia* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL.



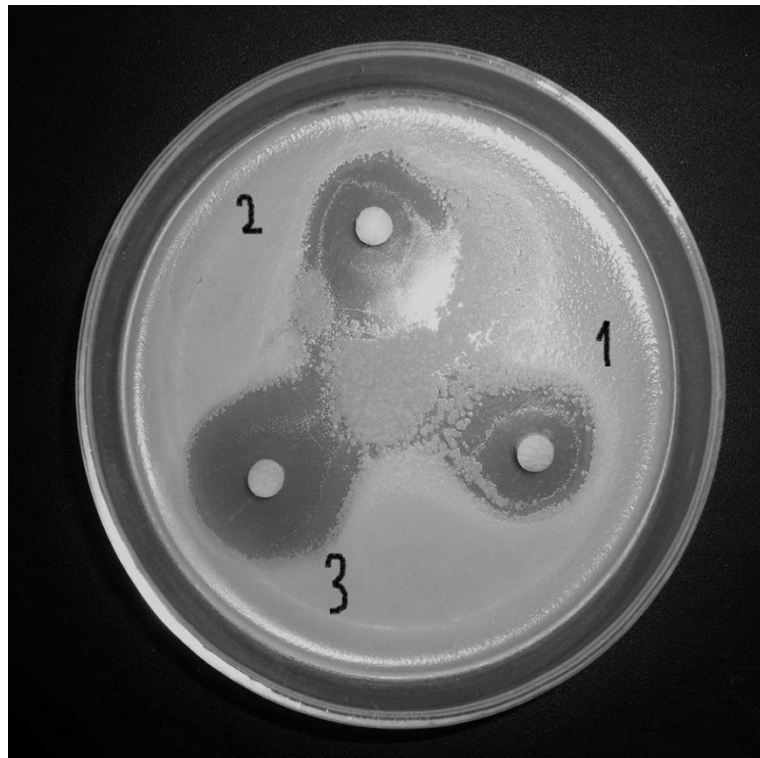
Şekil 7. *Usnea intermedia* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P üzerine inhibisyon zonları. 1: 25 μ L; 2: 50 μ L; 3: 75 μ L.



Şekil 8. *Usnea intermedia* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Bacillus cereus* ATCC 7064 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25 μ L; 2: 50 μ L; 3: 75 μ L.



Şekil 9. *Usnea intermedia* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL.



Şekil 10. *Usnea intermedia* etanol ekstraktı konsantrasyonlarının *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 üzerine inhibisyon zonları. 1: 25µL; 2: 50µL; 3: 75µL.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ramalina farinacea türü ile farklı deneysel çalışmalar var olmasına karşın *Usnea intermedia* için, çalışmamız, bu likenin araştırıldığı ve etkili sonuçların elde edildiği ilk çalışma niteliğindedir. Deneyler sonucunda en yüksek antifungal etki *Ramalina farinacea* ekstraktlarında *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9796 (28,3 mm) türüne karşı, *Usnea intermedia* ekstraktlarında *Candida albicans* ATCC 90028 (29,3 mm) türüne karşı bulunurken, en yüksek antibakteriyel etki *Ramalina farinacea* ekstraktlarında *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 (29,6 mm) türüne karşı, *Usnea intermedia* ekstraktlarında *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (30,3 mm) türüne karşı bulunmuştur.

Ülkemizde doğal olarak yetişmekte olan bu iki liken türü ile yaptığımız çalışmada, bakteri ve maya kültürlerine karşı kayda değer antimikrobiyal aktivite verileri elde edilmiştir. Hali hazırda var olan antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı ve gün geçtikçe direnç kazanan mikroorganizmalar yüzünden aktiviteleri azalmaktadır. Bu likenlerin daha detaylı çalışılarak içerdikleri komponentler aracılığıyla, mikroorganizmalara karşı doğal olarak elde edilmiş materyalden ilaç yapımı mümkün olacaktır. Doğal olarak yetişen ilaç hammaddelerin daha fazla araştırılıp keşfedilmesi gelecek neslin hastalıkla mücadeledeki ilaç sorunu yükünü azaltmaya olanak sağlayacaktır. Çalıştığımız likenlerinde bu alanda kullanılması için daha yoğun ve detaylı çalışmalarının yapılması, yeni ilaçların kullanıma geçmesinde önemli bir katkı oluşturacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Agboke A.A., Esimone C.O., Antimicrobial evaluation of the interaction between methanol extract of the lichen *Ramalina farinacea* (Ramalinacea) and ampicilin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (4) (2011) 644-648.
- Agboke A., Jackson C., Adedokun M., Momoh M.A., *In vitro* evaluation of the interaction between methanol extract of lichen (*Ramalina farinacea*) and tetracycline against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *African Journal of Biotechnology*, 10 (12) (2011) 2314-2318.
- Akpınar A. U., Ozturk S., Sinirtas M., Effects of some terricolous lichens *Cladonia rangiformis* Hoffm. *Peltigera neckerii* Hepp ex Müll. Arg. *Peltigera rufescens* (Weiss) Humb. on soil bacteria in natural conditions, *Plant Soil Environ*, 55 (4) (2009) 154-158.
- Anonim, <http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf> (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2015).
- Anonim, Tıbbi laboratuvar antibiyotik duyarlılık testi 725TTT107, *T.C. Milli Eğitim Bakanlığı*, (2011).
- Aydın S., Kınalıoğlu K., *P. furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea* ve *Parmelia tiliaceae* (Hoffm.) Ach. liken ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 1 (2) (2010) 30-38.
- Balaji P., Hariharan G. N., *In vitro* antimicrobial activity of *Parmotrema praesorediosum* thallus extracts, *Research Journal of Botany*, 2 (1) (2007) 54-59.
- Behera B. C., Verma N., Sonone A., Makhija U., Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* *in vitro*, *Biotechnology Letters*, 27 (2005) 991-995.
- Brito Marques Ramos D., Gomes F. S., Napoleao T. H., Paiva P. M. G., Silva M. D. C., et al., Antimicrobial activity of *Cladonia verticillaris* lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance, *Chinese Journal of Biology*, 2014 (2014).

- Cansaran Duman D., Farklı liken örneklerindeki usnik asit miktarlarının yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile belirlenmesi ve antimikrobiyal aktiviteleri, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 64 (3) (2007) 17-21.
- Cansaran Duman D., Halıcı M. G., *Squamarina lentigera* türlerinde usnik asit konsantrasyonunun antimikrobiyal aktivitesi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69 (3) (2012) 127-134.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; approved standard, CLSI document M02-A11*, 11th edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, (2012).
- Collins CH., Lyne PM., Grange JM., *Microbiological methods*, 6th edition, Butterworths, (1989) 410.
- Çobanoğlu G., Doğada ve tıpta likenler, *Sağlık Çevre Kültürü*, Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi Süreli Yayını, 6 (2012) 4-7.
- Dilsizoğlu A., Kavuncuoğlu Z., Oba D., Çobanoğlu G., Eski ve yeni kullanım alanları bilinmeyen yönleriyle likenler, *Bilim ve Teknik*, (2004) 86-89.
- Dülger B., Gücin F., Aslan A., *Cetraria islandica* (L.) Ach. likeninin antimikrobiyal aktivitesi, *Turkish Journal of Biology*, 22 (1998) 111-118.
- Esimone C. O., Adikwu M. U., Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*, *Fitoterapia*, 70 (1999) 428-431.
- Gomes A. T., Smania Junior A., Seidel C., Smania F. A., Honda N. K., et al., Antibacterial activity of orsellinates, *Brazilian Journal of Microbiology*, 34 (2003) 194-196.
- Gulluce M., Salan A., Sokmen M., Sahin F., Adiguzel A., ve diğ., Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis* *Platismatia glauca* *Ramalina pollinaria* *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*, *Phytomedicine*, 13 (2006) 515-521.
- Gücin F., Dülger B., Aslan A., *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf likeninin antimikrobiyal aktivitesi, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 7 (25) (1997) 22-24.

- Gücin F., Öztürk Ş., Dülger B., Güvenç Ş., *Umbilicaria crustullosa* (Ach.) Frey'nin antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 24 (1997) 21-24.
- Güven K., Kıvanç M., Mutlu M. B., Sarıözlü N., Dermirel R., *Genel Mikrobiyoloji*, Editör: K. Güven, 3. Baskı, Anadolu Üniversitesi, (2009).
- Ingolfsdottir K., Chung G. A. C., Skulason V. G., Gissurarson S. R., Vilhelmsdottir M., Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6 (1998) 141-144.
- İlçim A., Dığrak M., Bağcı E., Bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması, *Turkish Journal of Biology*, 22 (1998) 119-125.
- Javeria S., Shahi S. K., Uperti D. K., *Parmotrema nilgherrense* potential antimicrobial activity against drug resistant pathogens, *International Journal of Microbial Resource Technology*, 2(1) (2013).
- Karthikar Devi G., Anantharaman P., Kathiresan K., Balasubramanian T., Antimicrobial activities of the lichen *Roccella belangeriana* (Awasthi) from mangroves of Gulf of Manner, *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 40 (3) (2011) 449-453.
- Karthikaidevi G., Thirumaran G., Manivannan K., Anantharaman P., Kathiresan K., et al., Screening of the antibacterial properties of lichen *Roccella belangeriana* (Awasthi) from Pichavaram Mangrove (*Rhizophora* sp.), *Advances in Biological Research*, 3 (3-4) (2009) 127-131.
- Khan NH., Nur-e-Kamal MSA., Rahman M., Antimicrobial activity of *Euphorbia thymifolia* Linn., *Indian Journal of Medical Research*, 87 (1988) 395-397.
- Kıran F., Yıldız A., Osmanağaoğlu Ö., Bazı liken örneklerinin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 43 (3) (2013) 97-103.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A., Clark D. P., *Brock Biology of Microorganisms*, 13. Edition, Benjamin Cummings, (2012).
- Manojlovic N. T., Vasiljevic P. J., Maskovic P. Z., Bogdanovic-Dusanovic G., Chemical composition antioxidant and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae), *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012 (2012).

- Martins M. C. B., Lima M. J. G., Silva F. P., Azevedo-Ximenes E., Silva N. H., et al., *Cladia aggregata* lichen from Brazilian Northeast chemical characterization and antimicrobial activity, *Brazilian Archives of Biology Technology*, 53 (1) (2010) 115-122.
- Mitrovic T., Stamenkovic S., Cvetkovic V., Tosic S., Stankovic M., et al., Antioxidant antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species, *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (2011) 5428-5448.
- Odabaşoğlu F., Likenler, *Pharma Şark Dergisi*, 3 (2001) 16-19.
- Osmanağaoğlu Ö., Yıldız A., Saçılık S. C., Türkiyedeki farklı bölgelerden izole edilen likenlerin antimikrobiyal aktiviteleri, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30 (2000) 17-19.
- Özçelik S., *Genel Mikrobiyoloji*, 3. Baskı, Süleyman Demirel Üniversitesi, 1 (2009).
- Özdemir Türk A., Yılmaz M., Kıvanç M., Türk H., The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent, *Z. Naturforsch*, 58 (2003) 850-854.
- Özenoğlu S., Aydoğdu G., Dinçsoy A. B., Taghidizaj A. A., Derici K., ve diğ., Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70 (4) (2013) 215-226.
- Öztürk R., Antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu, *Akılci Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi*, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 31 (2002) 83-100.
- Paudel B., Bhattarai H. D., Pandey D. P., Hur J. S., Hong S. G., et al., Antioxidat antibacterial activity and brine shrimp toxicity test of some mountainous lichens from Nepal, *Biological Research*, 45 (2012) 387-391.
- Rankovic B. R., Kosanic M. M., Stanojkovic T. P., Antioxidant antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata* *Leconara atra* and *Leconara muralis*, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11 (97) (2011).
- Rankovic B., Misic M., Sukdolak S., Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata* *Parmelia caperata* *Parmelia pertusa* *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*, *Biologia*, 64 (1) (2009) 53-58.

- Rankovic B., Misic M., The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata* *Ochrolechia androgyna* *Parmelia caperata* and *Parmelia conspresa*, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22 (4) (2008) 1013-1016.
- Rankovic B., Misic M., Sukdolak S., The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia* *Umbilicaria polyphylla* *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (2008) 1239-1242.
- Rankovic B., Rankovic D., Kosanic M., Maric D., Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Anaptychia ciliaris* *Nephroma parile* *Ochrolechia tartarea* and *Parmelia centrifuga*, *Central European Journal of Biology*, 5 (5) (2010) 649-655.
- Ritika C., Jayanthi A., *In vitro* antimicrobial potential of the lichen *Parmotrema* sp. extracts against various pathogens, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16 (2013) 882-885.
- Saenz M. T., Garcia M. D., Rowe J. G., Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain, *Fitoterapia*, 77 (2006) 156-159.
- Shrestha G., Clair L. L., Antimicrobial activity of extracts from two lichens *Ramalina menziesii* and *Usnea lapponica*, *Bulletin of California Lichen Society*, 20 (1) (2013).
- Sharma P., Sharma P. C., Patil S., Sen R., Kumar A., *In vitro* evaluation of antibacterial activity of extract from *Parmelia* and *Dermatocarpon* spp. of lichen against the MDR clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Advances in Pharmacology and Toxicology*, 13 (1) (2012) 15-21.
- Soyuduru D., Fermentasyonla etanol üretiminde etanol veriminin artırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi, (2007).
- Srivastava P., Upreti D. K., Dhole T. N., Srivastava A. K., Nayak M. T., Antimicrobial property of extracts of Indian lichen against human pathogenic bacteria, *Interdisciplinary Perspective on Infectious Diseases*, 2013 (2013).
- Stojanovic I., Radulovic N., Cvetkovic V., Mitrovic T., Stamenkovic S., Antimicrobial activity of methanol extracts of four Parmeliaceae lichen species, *Physics Chemistry and Technology*, 11 (1) (2013) 45-53.

Sultana N., Afolayan A. J., A new depsidone and antibacterial activities of compounds from *Usnea undulata* Stirton, *Journal of Asian Natural Products Research*, 13 (12) (2011) 1158-1164.

Tay T., Özdemir Türk A., Yılmaz M., Türk H., Kıvanç M., Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)- usnic acid norstictic acid and protocetraric acid constituents, *Z. Naturforsch*, 59 (2004) 384-388.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ŞİRİN Neslihan
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 17.02.1988 / Düzce
Telefon : 0 (505) 867 36 11
E-posta : nesli-sirin@yandex.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Sinop Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Düzce Lisesi (Y.D.A.)	2006

İş deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-2013	Düzce Merkez Atatürk İlkokulu	Öğretmen
2011-2012	Düzce Gölyaka Çok Programlı Lisesi	Öğretmen
2010	Düzce Atatürk Devlet Hastanesi	Mikrobiyoloji- Biyokimya Stajı
2009	Düzce Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi	Patoloji Stajı

Yabancı Dil

İngilizce (YDS) : 67.50

Yayımlar

1. Şirin N., Dülger B. “*Ramalina farinacea* (L.) Ach. ve *Usnea intermedia* (A.Massal.) Jatta Likenlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Araştırmalar”, Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, Düzce, 2015. (Yayın Aşamasında.)