T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ramalina calicaris (L.) Fr. LİKEN TÜRÜNÜN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

DAMLA GÜNEŞ YÜCEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU

İSTANBUL, 2018

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ramalina calicaris (L.) Fr. LİKEN TÜRÜNÜN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

DAMLA GÜNEŞ YÜCEL
(520113023)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU

İSTANBUL, 2018

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Damla GÜNEŞ YÜCEL'in "*Ramalina calicaris* (L.) Fr. liken türünün antibakteriyel ve antioksidan aktivitesinin araştırılması" başlıklı tez çalışması, 19/09/2018 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU (Danışman)

Marmara Üniversitesi ..... (İMZA).....

Doç.Dr. N. Cenk SESAL (Üye)

Marmara Üniversitesi ..... (İMZA).....

Prof. Dr. Tamer ÖZCAN (Üye)

İstanbul Üniversitesi ..... (İMZA).....

ONAY

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, ilgisini, desteğini, sabrını asla esirgemeyen, bir danışmandan öte aile gibi olan, bilgi ve tecrübesiyle bana çok şey katan ve görüş ve önerileriyle bu çalışmanın şekillenmesine vesile olan tez danışmanım Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU'na gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince mikrobiyoloji alanındaki bilgilerinden yararlandığım, çalışmamı sürdürebilmem için gerekli imkanları ve bölüm kaynaklarının kullanılmasında her türlü desteği sağlayan Doç. Dr. N. Cenk SESAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda yardımlarını hiç esirgemeyen, her konuda yardımcı ve destek olmuş sevgili Ezgi UÇARKUŞ ve Barış GÖKALSIN'a çok teşekkür ederim.

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

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca yanımdan hiç ayrılmadan her adımda varlığıyla ve dostluğuyla bana güç vermiş olan, her yükü paylaşarak, her zorluğu beraber aşarak bu günlere geldiğimiz sevgili dostum Sinem GÜLTEKİN'e en içten duygularımla teşekkür ederim.

Maddi, manevi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve bu günlere gelebilmem için gereken gücü veren canım annem Gülsüm ZARİFOĞLU, abim Yenal GÜNEŞ ve eşim Levent YÜCEL'e emekleri ve desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Eylül, 2018 **Damla GÜNEŞ YÜCEL**

İÇİNDEKİLER

SAYFA

TEŞEKKÜR i

İÇİNDEKİLER ii

ÖZET iv

ABSTRACT v

SEMBOLLER vi

KISALTMALAR vii

ŞEKİL LİSTESİ viii

ÇİZELGE LİSTESİ ix

BÖLÜM 1. GİRİŞ 1

1.1. Likenlerin Genel Özellikleri 2

1.1.1. Likenlerin biyolojik yapısı 3

1.1.2. Morfolojilerine göre likenler 4

1.1.3. Üzerinde geliştiği substrata göre likenler 4

1.2. Liken Metabolitleri 5

1.3. Likenlerin Antibakteriyel Ve Antioksidan Özellikleri 6

1.3.1.Likenlerin antibakteriyel aktiviteleri 6

1.3.1.1. Antibakteriyel aktiviteyi belirlemede kullanılan bazı yöntemler 11

1.3.2. Likenlerin antioksidan aktiviteleri 12

1.3.2.1. Serbest radikaller 14

1.3.2.2. Antioksidanlar 16

1.3.2.3. Antioksidan aktiviteyi belirlemede kullanılan bazı yöntemler 18

1.4. *Ramalina* Cinsi Hakkında Bilgiler 19

1.4.1. *Ramalina calicaris* (L.) Fr 20

1.5. Çalışmada Test Edilen Bakteriler Hakkında Bilgiler 20

1.5.1. Çalışmada test edilen Gram (-) bakteriler 20
1.5.1.1. *Pseudomonas aeruginosa* 20
1.5.1.2. *Escherichia coli* 21
1.5.2. Çalışmada test edilen Gram (+) bakteriler 21
1.5.2.1. *Staphylococcus aureus* 21
1.5.2.2. *Enterococcus faecalis* 22
BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM 23
2.1. Materyal 23
2.1. 1. Çalışmada kullanılan liken türü 23
2.1.2. Çalışmada kullanılan bakteri suşları 23
2.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler 23
2.1.4. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri 24
2.2. Yöntem 25
2.2.1. Liken aseton özütlerinin eldesi 25
2.2.2. Antibakteriyel aktivite ölçümünde kullanılacak liken özütlerinin hazırlanması 25
2.2.3. Bakterilerin hazırlanması 25
2.2.4. Antibakteriyel aktivite testleri 26
2.2.5. Antioksidan aktivite testleri 27
BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA 28
3.1. Bulgular 28
3.1.1. Antibakteriyel aktivite 28
3.1.2. Antioksidan aktivite 36
3.2. Tartışma 38
BÖLÜM 4. SONUÇ 47
KAYNAKLAR 48
ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

Ramalina calicaris (L.) Fr. LİKEN TÜRÜNÜN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada daha önce boya ve kozmetik endüstrisinde kullanımı olan *Ramalina calicaris* (L.) Fr. liken türünün antibakteriyel ve antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. *Ramalina* cinsinin diğer türleri üzerine yapılmış olan çalışmalardan elde edilen sonuçlar *Ramalina calicaris* türünün yeni antibakteriyel ve antioksidan ajanlar geliştirmede iyi bir aday olabileceğini işaret etmektedir. Bu bilgiler ışığında Bolu'da iki farklı lokasyondan (Mudurnu-Aladağlar) toplanmış olan *Ramalina calicaris* türüne ait liken örnekleri; ayrıştırma ve teşhis yapıldıktan sonra yıkanmış, kurutulmuş ve aseton çözücüsü kullanılarak özütü çıkarılmıştır. Elde edilen aseton özütlerinin seçilmiş olan iki Gram negatif (CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922 *Escherichia coli*) ve iki Gram pozitif (ATCC 29212 *Enterococcus faecalis,* ATCC *25923 Staphylococcus aureus*) bakteri üzerinde disk difüzyon yöntemiyle antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda aynı ilde iki farklı lokasyondan toplanmış olan liken örneklerine ait özütlerin ikisinin de sadece Gram pozitif olan *E.faecalis* ve *S.aureus* üzerinde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu, fakat antibakteriyel aktiviteleri arasında çok büyük farklılıklar olmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda antioksidan aktivite araştırması, nispeten antibakteriyel olarak daha etkili bulunan Bolu-Aladağlar lokasyonundan toplanmış olan *R. calicaris* örnekleri ile yapılmıştır. Antioksidan aktivite araştırılırken CUPRAC metodu kullanılmıştır. *R.calicaris* aseton özütünün belirli bir düzeyde kromojenik oksidan indirgeme kapasitesine sahip olduğu, dolayısıyla antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Liken, *Ramalina calicaris*, antibakteriyel aktivite, antioksidan aktivite

Eylül, 2018 **Damla GÜNEŞ YÜCEL**

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF THE LICHEN SPECIES *Ramalina calicaris* (L.) Fr.

In this study, the antibacterial and antioxidant activities of the lichen species *Ramalina calicaris* (L.) Fr., which was previously used in the paint and cosmetic industries were investigated. The results of earlier researches on antibacterial and antioxidant activities of other species of *Ramalina* genus suggest that *Ramalina calicaris* may be a good candidate for developing new antibacterial and antioxidant agents. Lichen samples belonging to *Ramalina calicaris* were collected from two different locations (Mudurnu-Aladağlar) in Bolu. After the separation and the identification steps, the samples were washed, dried and then extracted using an acetone solvent. Antibacterial activities of the acetone extracts were investigated by disk diffusion method on two selected Gram negative (CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922 *Escherichia coli*) and two Gram positive (ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*, ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*) bacteria. As a result of the study, it was observed that the both extracts of lichen samples collected from two different locations in Bolu had antibacterial activity on only Gram positive *E. faecalis* and *S. aureus*. However, they did not show a great difference between their antibacterial activities. Antioxidant activity studies were carried out with *R. calicaris* samples collected from Bolu-Aladağlar location, which indicated relatively higher antibacterial activity. CUPRAC method was used on the antioxidant activity research. It has been found that *R. calicaris* acetone extract has antioxidant activity as it has a certain level of chromogenic oxidant reduction capacity.

Keywords: Lichen, *Ramalina calicaris*, antibacterial activity, antioxidant activity

September, 2018 **Damla GÜNEŞ YÜCEL**

SEMBOLLER

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

µm: Mikrometre

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

cm: Santimetre

DPPH: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

GST: Glutatyon-S-Transferaz

GPx: Glutatyon peroksidaz

HNO_2: Nitröz asit

H_2O_2: Hidrojen peroksit

HOCl: Hipokloröz asit

LOO•: Lipid peroksil

LOOH: Lipid peroksit

mL: Mililitre

mm: Milimetre

nm: Nanometre

NO•: Nitrik oksit

NO_2•: Nitrojen dioksit

$^1O_2$: Singlet oksijen

O_2•$^-$: Süperoksit

OH•: Hidroksil

O_3: Ozon

$ONOO^-$: Peroksinitrit

ROO•: Peroksil

KISALTMALAR

ATCC: American Type Culture Collection

BHA: Butillendirilmiş hidroksianisol

CAT: Katalaz

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CIP 5: Ciprofloxacin 5 µg

CUPRAC: Cupric Reducing Antioxidant Capacity

DFO: Deferoksamin

DMSO: Dimetil sülfoksit

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

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

HUS: Hemolitik üremik sendrom

LB: Luria Bertoni

MİK: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu

MLK: Minimal Letal Konsantrasyon

ROS: Reactive Oxygen Species (Reaktif oksijen türleri)

SOD: Süperoksit dismutaz

SXT 25: Sulphamethoxazole 25 µg

TE: Troloks eşdeğeri

TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TLC: Thin Layer Chromatography (İnce tabaka kromatografisi)

TPTZ: Tripiridiltriazin

TSS: Toksik şok sendromu

UV: Ultraviyole

UV-VIS Spektrofotometre: Görünür morötesi sprektrofotometre

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 3.1. *R. calicaris* (ALA) aseton özütü konsantrasyonlarının ve SXT antibiyotik diskinin ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* üzerindeki inhibisyon zonları 32

Şekil 3.2. *R. calicaris* (ALA) aseton özütü konsantrasyonlarının ve SXT antibiyotik diskinin ATCC *25923 Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon zonları 33

Şekil 3.3. *R. calicaris* (ALA) aseton özütü konsantrasyonlarının ve CIP antibiyotik diskinin CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki inhibisyon zonları 33

Şekil 3.4. *R. calicaris* (ALA) aseton özütü konsantrasyonlarının ve CIP antibiyotik diskinin 25922 *Escherichia coli* üzerindeki inhibisyon zonları 34

Şekil 3.5. *R. calicaris* (MUD) aseton özütü konsantrasyonlarının ve SXT antibiyotik diskinin ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* üzerindeki inhibisyon zonları 34

Şekil 3.6. *R. calicaris* (MUD) aseton özütü konsantrasyonlarının ve SXT antibiyotik diskinin ATCC *25923 Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon zonları 35

Şekil 3.7. *R. calicaris* (MUD) aseton özütü konsantrasyonlarının ve CIP antibiyotik diskinin CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki inhibisyon zonları 35

Şekil 3.8. *R. calicaris* (MUD) aseton özütü konsantrasyonlarının ve CIP antibiyotik diskinin 25922 *Escherichia coli* üzerindeki inhibisyon zonları 36

Şekil 3.9. (1) *R. calicaris* (ALA) aseton özütüyle ve (2) asetonla hazırlanmış kontrol grubuna ait CUPRAC karışımları 37

ÇİZELGE LİSTESİ

SAYFA

Çizelge 3.1. *R. calicaris* (ALA) özütü inhibisyon zonları (mm) 29

Çizelge 3.2. *R. calicaris* (MUD) özütü inhibisyon zonları (mm) 30

Çizelge 3.3. *R. calicaris* (ALA) aseton özütünün denenen dozlarındaki artan özüt miktarına bağlı oluşan inhibisyon zonu değişimi grafiği 31

Çizelge 3.4. *R. calicaris* (MUD) aseton özütünün denenen dozlarındaki artan özüt miktarına bağlı oluşan inhibisyon zonu değişimi grafiği 31

Çizelge 3.5. CUPRAC yöntemiyle belirlenmiş troloks kalibrasyon grafiği 37

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Geçmişten günümüze likenler ele alındığında pek çok alanda kullanımlarının olduğu görülür. Yiyecek olarak, boya maddesi olarak ve kozmetik alanında bilinen kullanımlarının yanı sıra geleneksel ilaçlar olarak kullanıldıkları uzun zamandır bilinmektedir [1]. Özellikle geleneksel ilaçlar olarak sıklıkla kullanılmaları araştırmacıları likenler üzerindeki çalışmaları genişletmeye yöneltmiş ve likenlerin antibakteriyel, antioksidan, antifungal, antiviral, anti-inflamatuar, analjezik ve antikanser gibi pek çok açıdan araştırılmasına imkan sağlamıştır. Antibiyotik özellikleri açısından likenlerin araştırılması II. Dünya Savaşı sonrasında dönemin şartlarıyla elde edilen antibiyotik miktarlarının azalması üzerine başlamış ve yapılan araştırmalarda ciddi sonuçlar elde edilmiştir [2].

Likenlerin biyolojik aktiviteleri bünyelerinde bulundurdukları metabolitlerden ileri gelmektedir. Liken tallusunda genel anlamda iki tip metabolit sentezlenir. Primer (Birincil) metabolitler diğer bitkilerde de üretilen protein, karbonhidrat ve lipid gibi maddelerdir. Sekonder (İkincil) metabolitler ise likene özgü olup birçoğu biyolojik olarak aktif bileşiklerdir [3, 4]. Bu ikincil metabolitlerin çoğu asit özellik göstermelerinden dolayı "liken asitleri" ya da "liken maddeleri" olarak bilinmektedir.

Liken türlerinin büyük çoğunluğu bir veya daha fazla sayıda çeşitli kimyasal gruplara ait sekonder metabolit içerirler. Bu güne kadar gelişmiş analiz teknikleri kullanılarak belirlenen liken maddelerinin sayısı 1050 civarındadır [5].

Ramalina cinsi liken metabolitleri üzerine yapılan araştırmalar; bu cinsin çeşitli türlerinde usnik asit, protosetrarik asit, evernik asit, stiktik asit türevleri, lekanorik asit, fumarprotosetrarik asit ve atranorin gibi çok sayıda sekonder metabolit bulunduğunu göstermiştir [6, 7]. Bu metabolitlere sahip olan *Ramalina* cinsine ait bazı türlerin de dahil olduğu çeşitli liken türleri ile yapılan antimikrobiyal aktivite araştırmaları, bu metabolitlerin Gram (+) ve Gram (-) bazı bakterilerde dikkate değer ölçüde antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermiştir [8-11]. Bu araştırmaların ve *Ramalina* cinsinin diğer türleri üzerine yapılmış bazı çalışmaların sonuçları *Ramalina calicaris*'in yeni antibakteriyel ajanlar geliştirmede iyi bir aday olabileceğine işaret etmektedir [12-18, 43, 44].

Günümüzde sentetik maddelerin zararları ve yan etkileri konusunda bilincin artması araştırmaları doğal kaynaklara yöneltmiştir. Bu yönelimin bir sonucu olarak likenlerin antioksidan aktivite potansiyeli de araştırma konusu olmuştur. Antioksidanlar vücudu serbest radikallerden koruyarak mutasyonların, kanserin ve bazı kronik hastalıkların oluşmasını geciktirirler [28].

Ramalina cinsinin bazı türlerinin antioksidan aktivitesi üzerine yapılmış olan çalışmalar mevcuttur [29-33, 63, 64]. Bu araştırmalardan *Ramalina* cinsine ait türlerde antioksidan kapasitenin yüksek olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar *Ramalina calicaris*'in de antioksidan açıdan etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu bilgiler ışığında doğanın kaynaklarından biri olan likenlerden faydalanarak, *Ramalina calicaris* türünün antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bu çalışmada; halihazırda bulunan antibiyotiklere direnç kazanan bakterilerle mücadelede bir alternatifin temellerini atmak, serbest radikallerden kaynaklı hastalıklara karşı doğal bir antioksidan belirlemek ve günden güne artmakta olan liken araştırmalarına bir katkı sağlamak hedeflenmiştir.

1.1. Likenlerin Genel Özellikleri

Likenler belirli mantarlar ile belirli alg veya siyanobakteri türlerinin simbiyotik yaşam ile bir araya gelmesinden oluşan organizmalardır. Yeryüzünde 20.000 den fazla sayıda liken türü olduğu bilinmektedir [15]. Likenler; taşlar, kurumuş ağaç kabukları, kiremitler gibi çok sayıda verimsiz sayılabilecek substrat üzerinde ve çöller, kutuplar gibi ekstrem habitatlarda yaşamlarını sürdürebilen dayanıklı organizmalardır. Bu nedenle dünya üzerinde çok zengin bir yayılış gösterirler [2].

Liken tallusu içinde simbiyontlar farklı görevleri üstlenmişlerdir. Simbiyontlardan biri olan alg fotosentez yoluyla likene organik maddeler ve oksijen sağlarken, diğer simbiyont olan mantar ise hifleriyle gerekli su, mineral ve karbondioksiti temin eder [19, 20].

Likenlerin doğa için en önemli ekolojik rolü piyonir yani öncül bitki olmasıdır. Kaya yüzeyine tutunarak ürettiği asit özellikteki metabolitlerle kayayı aşındırır ve burada toprak oluşumunu başlatarak yüksek bitkilerin yetişmesini sağlayacak sürecin ilk aşamasını oluşturur. Likenin doğada oynadığı bir diğer rol ise hava kirliliği

biyoindikatörü olma özelliğinden ileri gelir. Eğer bir bölgenin liken biyotası çok sayıda iyi gelişmiş belirli liken türlerini bulunduruyorsa, bu bölgedeki havanın özellikle kükürt dioksit bakımından temiz olduğunu gösterebilir. Öte yandan şehirlerde olduğu gibi hava kirliliğinin yüksek olduğu bölgelerde ortamdan ilk yok olan canlılar likenler olacaktır [21].

1.1.1. Likenlerin biyolojik yapısı

Likenler genellikle bir mantar ve bir algin bir araya gelmesi sonucu oluşur fakat iki alg veya siyanobakteri türü ve birden fazla mantar türünün bir araya gelmesiyle oluşmuş likenler de mevcuttur. Liken yapısında bulunan mantarlar *Ascomycetes, Basidiomycetes* ve *Deuteromycetes* sınıfı üyelerindendir. Liken yapısında en çok rastlanan mantar türleri *Ascomycetes* sınıfından olup tropik bölgelerde yetişen likenlerde ise *Basidiomycetes* mantarların yer aldığı bilinmektedir. *Deuteromycetes* sınıfından mantarlarla oluşmuş likenlere ise nadir olarak rastlanır.

Liken bünyesinde en çok rastlanan yeşil algler *Chlorophyceae* sınıfına mensup *Trentepohlia* ve *Trebouxia* cinslerine ait türlerdir. Mavi-yeşil algler olarak da bilinen *Cyanobacteria* sınıfına mensup *Nostoc* ve *Gloeocapsa* cinsleri yine liken yapısında sık görülür. *Chrysophyceae* sınıfında bulunan altın sarısı alglerin ise nadiren liken oluşumuna katıldıkları bilinmektedir [24, 25].

Liken yapısı incelendiğinde bu yapının büyük kısmını mantar hiflerinin oluşturduğu görülür. Gövde, yaprak benzeri bir farklılaşmaya sahip olmayan, mantar hiflerinden oluşmuş bu gövdeye “tallus” adı verilir. Tallus yapısına alglerin dahil olmasıyla liken meydana gelir [26].

Liken tallusunda alglerin yoğun olarak bulunduğu tabakaya gonid, mantar hiflerinin yoğun olduğu tabakaya ise medulla denir. Likenlerde mantar ve algin tallus içindeki dağılımlarına göre bir sınıflandırma mevcuttur. Eğer tallusta alg ve mantar hifleri bir tabaka oluşturmadan homojen dağılım gösteriyorsa bu tip likenler homeomerik liken adını alır. Tallusta tabakalaşma söz konusu ise yani korteks altında tallusun üst bölümünde alg tabakası, onun altında ise yoğun olarak mantar hiflerinden oluşan tabaka bulunuyorsa bu yapıya sahip likenlere de heteromerik likenler denir [27].

Likenlerin üremeleri eşeyli ve eşeysiz olarak iki şekilde gerçekleşir. Eşeysiz üremede sored ve izid denilen tallus parçaları rol oynar. Bu yapılar mantar hifleriyle sarılmış bir kaç alg hücresinden meydana gelmiştir ve dış çevreye yayılarak vegetatif yolla eşeysiz üremeyi gerçekleştirirler [25]. Eşeyli üreme ise sadece mantar tarafından üretilen sporlar ile gerçekleştirilir. Apotesyum ve peritesyum adı verilen fruktifikasyonlarda olgunlaşan spor dışarı atılır ve uygun bir alge rastladığında birleşmesiyle liken oluşur [26].

1.1.2. Morfolojilerine göre likenler

Morfolojik görünümlerine göre likenler genel olarak 3 gruba ayrılır. Bunların içinde pulsu, unsu, dimorfik gibi farklı alt gruplar da bulunmaktadır.

1. Dalsı (Fruticose) Likenler; tallusları çalımsı veya şerit ya da iplik görünümündedir. Yaşadıkları yüzeye tek noktadan tutunurlar.
2. Yapraksı (Foliose) Likenler; tallusları yaprak benzeri görünümdedir. Yaşadıkları yüzeye rizin adı verilen kök benzeri uzantılarla gevşek şekilde tutunurlar.
3. Kabuksu (Crustose) Likenler; tallusları kabuk görünümünde olup yaşadıkları yüzeye medulla ile sıkıca tutunmuşlardır [19, 21, 22].

1.1.3. Üzerinde geliştiği substrata göre likenler

Likenlerin tutunarak üzerinde yaşam sürdüğü ona özel yaşam alanı "substrat" olarak tanımlanmış ve Türkçe karşılığı olarak "özortam" terimi önerilmiştir [85]. Likenler substratlarına göre 3 temel gruba ayrılır;

1. Epifitik Likenler; bitkilerin gövde ve dalları üzerinde yaşarlar. Yaprak döken ve dökmeyen ağaç kabukları belirli türlerin tercihi olabilmektedir.
2. Saksikol Likenler; çeşitli kayalar ve taşlar üzerinde yaşarlar. Silis veya kalker içerikli, asitli ya da bazik, mermer, kumtaşı, kireçtaşı gibi kaya tiplerinde likenler oldukça seçici davranmaktadır.
3. Terrikol Likenler; toprak üzerinde yaşarlar. Asitli veya kalkerli toprakları farklı türler tercih etmektedir.

Bu üç temel yaşam alanı dışında bitkilerin yapraklarının, karayosunlarının ve hatta bir başka likenin üstünde yaşayabilen liken türleri bulunmaktadır. Ayrıca kiremitler, bahçe

çitleri, kemik kalıntıları gibi doğal olmayan insan yapımı maddeler üzerinde de yaşayan liken türleri vardır [21].

1.2. Liken Metabolitleri

Likenler primer (intraselüler) ve sekonder (ekstraselüler) olmak üzere iki tip metabolit üretir. Primer metabolitler alg ya da mantar partner tarafından üretilen ve başka bitkilerin de üretebildiği sadece likene özgü olmayan protein, lipid, karbonhidrat ve vitaminler gibi maddelerdir. Öte yandan sekonder metabolitler likene özgüdür ve simbiyoz yaşamın ürünleri olup liken içinde bulunan organik maddelerin büyük bir kısmını oluştururlar. Sekonder metabolitler mantar hücresi içinde veya hiflerin üzerinde depo edilirler ve genellikle suda çözünmezler, sadece organik çözücülerle çözünürler [34, 35].

Liken maddeleri biyosentez yolaklarına göre şu şekilde sınıflandırılmıştır [34, 35] :

1. Asetil-Polimalonat yolağı
2. Mevalonik Asit yolağı
3. Şikimik Asit yolağı
4. Fikobiyontların fotosentetik ürünleri

Bugüne kadar 1000'in üzerinde liken maddesi tespit edilmiş, bunlar arasından 350'ye yakın sekonder metabolitin kimyasal yapısı belirlenmiştir. Belirlenen bu metabolitlerden en çok bilinenleri; usnik asit, fenolik bileşikler, anthraquinonlar, dibenzofuranlar, depsidler, depsidonlar, depsonlar, triterpenler, gamma laktonlar ve pulvinik asit türevleridir [23].

Çoğu liken maddesi asetil-polimalonat yolağından elde edilir [36]. Bu yolakla elde edilen liken maddeleri şu şekilde sınıflandırılmıştır [34, 37] :

1. Yüksek yağ asitleri (+,- Protolikesterinik asit, Kaperatik asit)
2. Fenolkarboksilik asitler
   2.1. Orsinol türevleri
      2.1.1. Depsidler (Evernik asit, Eritrin, Divarikatik asit)
      2.1.2. Depsonlar (Pikrolikenik asit)
      2.1.3. Depsidonlar (Lobarik asit, Alektoronik asit, Fisodik asit)

2.1.4. Dibenzofuranlar (Pannarik asit, Didimik asit, Porfirillik asit)

2.1.5. Kromanonlar (Sifulin)

2.2. β-orsinol türevleri

2.2.1. Depsidler (Atranorin, Barbatik asit, Tamnolik asit)

2.2.2. Depsidonlar (Fumarprotosetrarik asit, Salazinik asit)

2.3. Piloroglusinol türevleri (Usnik asit)

2.4. Kinonlar (Parietik asit, Parietin, Piksiferin)

Likenler araştırıldıkça bünyelerinde bulunan sekonder metabolitlerin; antibiyotik, antiherbivor, antioksidan, analjezik ve antipiretik, sitotoksik, antitümör, antiviral, allelokimyasal ve UV-B koruma aktivitelerine sahip olduğu ortaya konmuştur [36].

Bu araştırmaların temeli liken çok yavaş büyüdüğü halde neden bu kadar çok metabolit üretiyor sorusuna dayanmaktadır. Bu soruya cevaben ortaya konulan bazı düşünceler liken metabolitlerinde keşfedilen bu özelliklerin kendisi için nasıl bir işlevi olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin; likenler yavaş büyüme dezavantajları nedeniyle yüksek organizasyonlu bitkilerden ve toprak funguslarından korunmalıdırlar. Antibiyotik özellikteki metabolitleri toprak funguslarının gelişimini durdurarak korunmalarını sağlar hatta bitki tohumlarının çimlenmesini inhibe eder. Bu şekilde likenler varlıklarını devam ettirirler.

Liken bünyesindeki aromatik metabolitler algleri yüksek ısıdan korumak amacıyla UV ışığını güçlü bir şekilde absorbe edebilmektedir. Ekstrem şartlarda büyümek durumunda olan likenlerde sentezlenen stres metabolitleri onların zor şartlara uyum sağlamasını kolaylaştırmaktadır. Antiherbivor özellikleri metabolitlerinin nematodlar, böcekler gibi bazı hayvanlar için zehirli olmasından ileri gelmektedir [38]. Likenin kendisini korumak için sahip olduğu bu özellikler onu tıp açısından çok önemli ve umut vaat eden bir noktaya koymaktadır.

1.3. Likenlerin Antibakteriyel Ve Antioksidan Özellikleri

1.3.1. Likenlerin antibakteriyel aktiviteleri

Mikroorganizmaların mevcut antibiyotiklere direnç kazanması araştırmacıları yeni antimikrobiyal kaynaklar araştırmaya sevk etmiştir. Yapılan çok sayıdaki araştırma

likenlerin bünyesindeki biyoaktif maddelerin mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıkların tedavisinde alternatif bir seçenek olarak etkili olabileceğini ortaya koymuştur [36].

Ingólfsdóttir ve ark. (1998); bazı yaygın liken metabolitlerinin antibakteriyel aktivitelerini patojen olmayan fakat *Mycobacterium tuberculosis* ile benzer hassasiyette olan *Mycobacterium aurum* üzerinde denemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar usnik asidin en yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermekle birlikte atranorin, lobarik asit, salazinik asit ve protolikesterinik asidin de usnik asit kadar olmasa da bahsi geçen bakteri türü üzerinde etkili olduklarını ortaya koymuştur [42].

Rankovic ve Misic (2008); liken metabolitlerinden fumarprotosetrarik asit, lekanorik asit, protosetrarik asit ve stiktik asidin; insan, hayvan ve bitkilerde hastalık yapan, mycotoksin üreten ve yiyeceklerin bozulmasına neden olan altı bakteri ve on mantarda güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu özütlerin antimikrobiyal etkilerinin bakterilerde mantarlardan daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir [39].

Yuan ve ark. (2010); *Evernia divaricata* türünden petroleum eter ve etil asetat çözücüsüyle elde ettikleri usnik asit, divarik asit, atranorin, 2,4-Di-*O*-metildivarik asit, divarikatinik asit ve 2-*O*-metilnordivarikatik asit metabolitlerini *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* ve *Pseudomonas aureginosa* bakterileri üzerinde test etmiş ve usnik asit ile divarik asidin güçlü bir inhibe edici etkiye sahip olduklarını belirlemişlerdir [41].

Cansaran ve ark. (2014); çeşitli *Usnea* türlerinden aseton çözücüsüyle elde ettikleri usnik asidin *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis, Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* ve *Bacillus megaterium* bakterilerine karşı etkili olduğunu belirlemiş ve usnik asit miktarı arttıkça bu etkinin de arttığını ortaya koymuşlardır [40].

Bahsi geçen çalışmalar ve daha pek çok çalışma likene özgü metabolitlerin antibakteriyel potansiyellerine ışık tutar niteliktedir. Liken türleri çoğunlukla bir veya daha fazla sayıda çeşitli kimyasal gruplara ait sekonder metabolit içerirler. *Ramalina* cinsine mensup türlerin de usnik asit, protosetrarik asit, evernik asit, stiktik asit türevleri, lekanorik asit, fumarprotosetrarik asit ve atranorin gibi metabolitleri içerdikleri çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir [6, 7]. Bu maddelerle yapılmış

antibakteriyel aktivite testleri bazılarının daha fazla olmak üzere çoğunluğunun bakterilerde inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla bu maddelerden bir veya birkaçına sahip bir liken türünden elde edilen özütün antibakteriyel etkiye sahip olacağını düşünmek yanlış değildir.

Tay ve ark. (2004); *Ramalina farinacea'*nın aseton özütünden elde ettikleri (+)- usnik asit metabolitinin *Bacillus subtilis, Listeria monocytogenes, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Yersinia enterolitica, Candida albicans* ve *Candida glabrata* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Norstiktik asidin üstte bahsedilen mikroorganizmalara ek olarak *Aeromonas hydrophila* üzerinde de etkili olduğu fakat *Yersinia enterolitica* üzerinde etkili olmadığı, Protosetrarik asidin ise sadece *Candida albicans* ve *Candida glabrata* üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir [12].

Paudel ve ark. (2008); içinde *Ramalina terebrata*'nın da bulunduğu beş antarktik liken türünün antimikrobiyal aktivitelerini *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı test etmişlerdir. *R. terebrata*'nın iki Gram (+) bakteriye karşı da etkili olduğu belirlenmiştir. *Bacillus subtilis*'in liken özütlerine karşı *Staphylococcus aureus*'tan daha hassas olduğu ortaya çıkmıştır [43].

Cansaran ve ark. (2008); *Ramalina* cinsine ait; *R. fastigiata, R. capitata, R. polymorpha, R. pollinaria* ve *R. fraxinea* liken türlerinin aseton özütlerini *Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Proteus mirabilis, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* ve *Bacillus megaterium* bakterilerine karşı test etmişlerdir. Test edilen liken özütlerinde çeşitli bakterilere karşı farklı seviyelerde antibakteriyel etki olduğu gözlemlenmiştir. *R. fastigiata* ve *R. capitata'*nın test edilen bakterilerin çoğunluğu üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. En yüksek antibakteriyel etki gösteren tür *R. fastigiata* olmuştur ve en yüksek etkiyi *Bacillus subtilis* ve *Bacillus megaterium* üzerinde göstermiştir. Bu özüt aynı zamanda Gram (-) olan *Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis'*in de büyümesini inhibe etmiştir. Elde edilen bulgular üzerine çalışılan likenlerin kuru ağırlık üzerinden HPLC ile usnik asit miktarları belirlenmiş ve en yüksek usnik asit miktarına *R. fastigiata'*nın sahip olduğu ortaya çıkmıştır [13].

Çobanoğlu ve ark. (2010); *Ramalina farinacea, Platismatia glauca, Evernia divaricata, Bryoria fuscescens* ve *Alectoria sarmentosa* liken türlerinin antibakteriyel etkinliklerini

Gram (-) olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. ve *Escherichia coli* ATCC 11666 bakterileri üzerinde test etmişlerdir. Çözücü olarak kloroform ve aseton kullanmışlardır. Araştırılan liken türlerinin üç bakteri türü üzerinde de farklı seviyelerde etkili olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar asetonun kloroformdan daha etkin bir çözücü olduğunu ortaya çıkarmıştır [15].

Shrestha ve ark. (2013); *Ramalina menziesii* ve *Usnea lapponica* liken türlerinin antibakteriyel aktivitesini dört patojen bakteriyle test etmişlerdir. Çözücü olarak metanol ve aseton kullanmışlardır. Test edilen bakteriler *Staphylococcus aureus, Escherchia coli, Pseudomonas aureginosa* ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*' tur. İki liken türününde metanol ve aseton özütleri *E. coli* hariç diğer üç bakteriye karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Elde edilen sonuçlar asetonun metanoldan daha etkili bir çözücü olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yapılan TLC analizi iki liken türünün de başlıca sekonder metabolit olarak usnik asit içerdiğini göstermiştir [44].

Kambar ve ark. (2014*); Ramalina conduplicans* Vain. liken türünün antimikrobiyal aktivitesini 15 bakteri ve 5 mantar türü üzerinde 3 farklı çözücü kullanarak test etmişlerdir. Test edilen 15 bakteri türü referans bakteri suşları, üropatojenler, yanıklardan ve diş çürüklerinden izole edilen bakterilerden seçilmiştir. Çözücü olarak petroleum eter, etil asetat ve etanol kullanmışlardır. Antibakteriyel aktiviteyi belirlemede agar kuyu difüzyon yöntemini kullanmışlardır. Etil asetat özütlerinin referans bakteri suşlarını daha yüksek ölçüde inhibe ettiği, çözücü özütleri arasında sadece etanol özütünün tüm üriner sistem bakterilerini inhibe ettiği belirlenmiştir. Bakteriler arasında en yüksek duyarlılığı *E. faecalis* en az duyarlılığı ise *K. pneumoniae* göstermiştir [18].

Sundaraj ve ark. (2015); *Ramalina nervulosa* türünün antimikrobiyel aktivitesini 4 referans bakteri suşu ve 5 mantar üzerinde 3 farklı çözücü kullanarak test etmişlerdir. Çözücü olarak petroleum eter, etanol ve su kullanmışlardır. Bakterilerden en duyarlı olanların *Bacillus subtilis* ve Proteus vulgaris olduğu belirlenmiştir. Özütlerin mantarları inhibe etmede daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır. *Pseudomonas aeruginosa '*da su özütünde hiçbir aktivite gözlemlenemezken petroleum eter ve etanol özütlerinde düşük bir aktivite gözlemlenmiştir [29].

Sesal ve ark. (2016); *Ramalina* cinsine ait 4 türün (*R. canariensis, R. chondrina, R. fastigiata* ve *R. fraxinea*) metanol ve kloroform özütlerinin antimikrobiyal aktivitesini 2 Gram negatif (*P. aeruginosa* ve *E. coli*), 2 Gram pozitif bakteri (*E. faecalis* ve *S. aureus*) ve 1 maya (*C. albicans*) türüne karşı araştırmışlardır. Araştırma sonucunda çeşitli düzeylerde antimikrobiyal etkinlik gözlemlemişlerdir. Gram negatif bakteri türlerine karşı sadece *R. canariensis* ve *R. chondrina* türlerinin kloroform özütleri etkinlik göstermiştir. Aynı zamanda bu iki türün kloroform özütlerinin *E. coli* üzerinde standart antibiyotikten daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Maya üzerinde ise en yüksek etki ise *R. canariensis*'in metanol özütünden elde edilmiştir. Elde edilen antimikrobiyal etki maya türüne karşı denenmiş standart antibiyotikten daha yüksek bulunmuştur [86].

Ankith ve ark. (2017); *Ramalina* cinsine mensup 3 tür olan *R. hossei* Vain, *R. conduplicans* Vain ve *R. Pacifica*'nın antimikrobiyel aktivitesini araştırmışlardır. *E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis* ve *B. cereus* bakterilerine agar kuyu difüzyon yöntemiyle bu likenlerin DMSO özütlerini uygulamışlardır. Liken özütlerine en yüksek duyarlılığı *B. cereus*, en düşük duyarlılığı ise *E. coli* göstermiştir. *P. aeruginosa*'da liken özütlerine karşı yüksek duyarlılık sergilemiştir. Referans antibiyotiğin *Ramalina* türlerinin etkinliğine kıyasla çok daha yüksek bir etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. *R. pacifica*'nın diğer iki *Ramalina* türüne kıyasla antibakteriyel etkinliğinin daha yüksek olduğu görülmüştür [83].

Zrnzević ve ark. (2017); *Ramalina capitata* 'nın aseton özütünün antibakteriyel aktivitesini 2 Gram pozitif ve 3 Gram negatif bakteriye karşı test etmişlerdir. Disk difüzyon yöntemini kullanmışlardır. Test edilen Gram pozitif bakteriler; *Bacillus spizizenii* ve *Staphylococcus aureus,* Gram negatif bakteriler ise; *Escherichia coli, , Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella abony*'dir. Analizler sonucu bu liken türüne ait aseton özütünün Gram pozitif bakterilere karşı yüksek antibakteriyel etkinliği olduğu, Gram negatif bakterilere karşı ise etkinliği olmadığı belirlenmiştir. Test edilen standart antibiyotiğin liken özütüne kıyasla çok daha yüksek bir etkinliği olduğu belirlenmiştir [84].

1.3.1.1. Antibakteriyel aktiviteyi belirlemede kullanılan bazı yöntemler

1. Disk Difüzyon Yöntemi: Çok etkili olması ve ilaç kombinasyonlarının kolaylıkla değiştirilebilmesine imkan sağlaması nedeniyle sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [78]. Aerobik veya fakültatif anaerobik, hızlı üreyen bakterilerin direncini ölçebilmek için, kolay ve pratik, bu nedenle rutin çalışmalarda tercih edilen bir yöntemdir [79]. Yöntem şu şekildedir; ilgilenilen bakteri süspansiyonu agarın üzerine yayılır. Antibakteriyel madde içeren diskler agarın üzerine yerleştirilir ve bir gece inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası bakteri inhibisyon zonları cetvel ya da kaliper ile ölçülür [78]. Elde edilen ölçüm standart bir antimikrobikle karşılaştırılarak etkinliği belirlenebilir. Diskin etrafında inhibisyon zonu bulunmaması bakterinin o maddeye karşı dirençli olduğunu gösterir.

2. Dilüsyon Yöntemi: Dilüsyon yöntemi makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemi olarak iki şekilde yapılır.

Makrodilüsyon yöntemi; antibiyotiklerin minimal inhibitör konsantrasyonunu (MİK) ve minimal letal konsantrasyonunu (MLK) belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Minimal inhibitör konsantrasyonu; gecelik inkübasyon sonrasında bir mikroorganizmanın görülebilen büyümesini engelleyen bir antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyonunu veren değerdir. Çok pratik bir yöntem değildir, tanı laboratuvarlarında disk difüzyon testinde sonuç alınamaması halinde beklenmeyen bakteri direncini onaylamak amacıyla kullanılır [80]. Yöntem; tüplere uygun besiyeri ve bakteri süspansiyonu koyulduktan sonra antibiyotiğin katlı dilüsyonlar halinde ilave edilmesine dayanır. 24 saatlik inkübasyon sonrası bakteri üremesi olup olmadığı besiyerindeki bulanıklık gözlemlenerek veya spektrofotometrik olarak belirlenir. Üremenin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değerini verir [81].

Mikrodilüsyon yöntemi: Daha kolay ve pratik olması nedeniyle rutin kullanıma uygun bir testtir [79]. Mikroplak çukurlarına uygun bir besiyeri koyulduktan sonra antimikrobiyal maddenin seri sulandırımları eklenir ve bakteri süspansiyonu da eklenerek inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası gözle üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak saptanır [81].

3. Kuyu Difüzyon Yöntemi: Bu yöntemde belirli oranlarda standart inokulum bakteri besiyerine karıştırılarak bakteri-besiyeri karışımı steril petrilere dökülür.

Besiyerinin bir süre katılaşması beklenir ve sonrasında steril mantar delici kullanılarak besiyerinde paralel kuyucuklar açılır. Antibakteriyel madde bu kuyucuklara belirli miktarda aktarılır ve 24 saat inkübasyona bırakılır. Sonrasında kuyucuk etrafında oluşan zon çapı ölçülerek antibakteriyel aktivite belirlienir [82].

1.3.2. Likenlerin antioksidan aktiviteleri

Likenlerin ürettiği sekonder metabolitler arasında aromatik yapıdaki fenolik bileşiklerin de olması antioksidan özellikleri olduğuna işaret etmektedir ve bu da araştırmacıların bu konuya yönelmesine neden olmuştur [63].

Güllüce ve ark. (2006); *Parmelia saxatilis, Platismatia glauca, Ramalina pollinaria, Ramalina polymorpha* ve *Umbilicaria nylanderiana* likenlerinin metanol özütlerinin antioksidan aktivitelerini DPPH ve linoleik asit oksidasyonunun inhibisyonu tekniğiyle test etmişlerdir. Bahsi geçen liken türlerinden *U. nylanderiana* hariç diğer türler iki yöntemde de etki göstermemiştir. Mevcut liken türlerinin içerdeikleri toplam fenolik bileşik miktarları belirlenmiş ve en yüksek fenolik bileşiğe sahip türün *U. nylanderiana* olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar toplam fenolik madde içeriğiyle antioksidan aktivitenin bağlantılı olabileceğini gösterir niteliktedir [33].

Kumar ve ark. (2009); *Ramalina hossei* ve *Ramalina conduplicans* likenlerinin metanol özütlerinin antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. DPPH ve FRAP yöntemlerini kullanmışlardır. İki yöntemden elde ettikleri sonuçlar da konsantrasyona bağlı değişiklik gösteren seviyelerde antioksidan aktivite olduğunu göstermiştir. *R. hossei'*nin radikal süpürücü etkisinin *R. conduplicans'*dan daha yüksek olduğu belirlenmiştir [30].

Luo ve ark. (2010); yenilebilir bir liken olan *Ramalina conduplicans*'ın antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. Bu likene ait özütün güçlü bir anti-linoleik asit peroksidasyon aktivitesi, radikal süpürücü aktivitesi ve indirgeme gücü olduğu belirlenmiştir. Toplam fenolik bileşik içeriğinin yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. TLC ve HPLC yöntemiyle bu özütteki radikal süpürücü etkiye sahip başlıca metabolitlerin sekikaic ve homosekikaic asit olduğu belirlenmiştir [32].

Stanly ve ark. (2011); Malezyadan topladıkları *Ramalina peruviana, Bulbothrix isidiza*, *Parmotrema tinctorum* ve *Cladia aggregata* likenlerinin aseton ve metanol özütlerini antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik açısından test etmişlerdir. En yüksek

radikal süpürme etkisi *R. peruviana*'nın aseton özütünden elde edilmiştir. En yüksek antioksidan aktivite sırasıyla *B. isidiza* ve *R. peruviana'* nın aseton özütlerinden elde edilmiştir. Elde edilen etkinlik değeri standart bir antioksidan olan α-tocopherol'den daha yüksek olup bu liken türlerinin doğal bir antioksidan kaynağı olduğunu kanıtlar niteliktedir [31].

Oran ve ark. (2012); *Evernia prunastri, Melanelixia glabra, Platismatia glauca, Ramalina farinacea, Ramalina fastigiata* ve *Usnea filipendula* likenlerinin aseton ve metanol özütlerinin toplam fenol ve antioksidan kapasitelerini araştırmışlardır. Ölçümler sonucunda en yüksek toplam fenol değeri *M. glabra'*nın metanol özütünde ve en yüksek antioksidan aktivite değeri *R. fastigiata'*nın metanol özütünde çıkmıştır. Çözücülere göre kıyaslandığında diğer liken türlerinin antioksidan aktivite değerleri farklılık göstermektedir. Bazılarının aseton çözücüsündeki değerleri metanol çözücüsüne kıyasla daha yüksek değerler vermiştir. Bu durum araştırıcılar tarafından likenlerin ürettiği sekonder metabolitler farklı kimyasal yapılarda olduğu için organik çözücülerdeki davranışları da değişiklik göstermektedir şeklinde yorumlanmıştır [63].

Paudel ve ark. (2012); Nepal'den topladıkları altı familyaya ait yirmidört liken türünün metanol özütlerinin antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. *Peltigera* sp., *Cladonia* sp. ve *Canoparmelia* sp.'nin özütlerinin DPPH yöntemiyle standart bir antioksidan olan BHA (Butillendirilmiş hidroksianisol) ile kıyaslanabilir aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. *Parmoterma* sp., *Ramalina* sp., *Peltigera* sp. ve *Cladonia* sp.'nın özütlerinin ABTS+ (Troloks eşiti antioksidan kapasite yöntemi) yöntemiyle verdiği sonuçlar antioksidan aktivitelerinin askorbik asitten yüksek olduğunu göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular daha önce yayınlanmış çalışmalarla karşılaştırıldığında yüksek rakımlardan toplanan likenlerin daha güçlü antioksidan ve antibakteriyel bileşenler içerdiğini göstermiştir [64].

Sundararaj ve ark. (2015); *Ramalina nervulosa* likeninin petrol eteri, su ve etanol çözücüleriyle elde edilmiş özütlerinin antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. Total fenolik ve flavonoid içerik analizi için Folin-Ciocalteu ve Aluminyum klorid metodunu, antioksidan aktivite için ise DPPH, FRAP ve CUPRAC yöntemini kullanmışlardır. Etanol özütünden elde ettikleri sonuçlar *R. nervulosa*'nın potansiyel bir antioksidan kaynağı olduğunu ortaya koymuştur [29].

Zrnzević ve ark. (2017); *Ramalina capitata* 'nın aseton özütünün antioksidan aktivitesini CUPRAC yöntemiyle test etmişlerdir. Toplam antioksidan kapasiteyi troloks eşdeğeri cinsinden 6.1176 ± 0.2964 μg Troloks eşdeğerleri (TE) /mg (kuru ağırlık) bulmuşlardır. Çalışmalarının sonucunu Zlatanović ve ark tarafından 2017 de yapılmış güncel bir çalışmayla karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada *Umbilicaria crustulosa* likeninin aseton özütünün troloks eşdeğeri cinsinden tam antioksidan kapasitesi 19.7641 ± 0.0166 mg TE / mg bulunmuştur. Zrnzević ve ark. bu türün kendi çalışmış oldukları örnekten daha etkili olduğunu belirtmişlerdir [84].

Bahsi geçen çalışmalar likenlerin çeşitli oranlarda antioksidan aktiviteleri olduğunu göstermektedir ve *Ramalina* cinsine mensup çeşitli türlerin de bu aktiviteye sahip olmaları çalışmada test edilen *R.calicaris*'in aynı potansiyele sahip olabileceğine işaret etmektedir.

1.3.2.1. Serbest radikaller

Serbest radikaller (oksidanlar) genellikle bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir ve bu durum onları kararsız (reaktif) hale getirir. Bu moleküller komşu moleküllerin elektronlarını çalarak ciddi sorunlara neden olabilirler. DNA'ya saldırarak fonksiyon bozukluğu, mutasyon ve kansere, enzimlere ve proteinlere saldırarak normal hücresel faaliyetlerin bozulmasına yol açabilirler. Sebep oldukları bu tahribatlar doku sertliği, kalp krizi, felç gibi hastalıkların meydana gelmesine neden olabilir [28].

Serbest radikaller hücre membranındaki lipidlerden ve organellerden elektron çalabilirler, bunun sonucu olarak elektronunu kaybeden bileşen serbest radikal haline gelerek zincirleme bir reaksiyon oluşur. Bunun üzerine redoks dengesi bozulur ve bu durum antioksidanlar tarafından durdurulmazsa oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stresin pek çok hastalıkla ilişkili olduğu kabul edilmektedir [37].

Serbest radikaller üç şekilde meydana gelirler [45];

1. Kovalent bağlı bir molekülde her bir grupta ortak elektronlardan birinin kalarak homolitik bölünmenin gerçekleşmesi,

$$X : Y \longrightarrow {}^{\cdot}X + Y^{\cdot}$$

2. Bir molekülün tek bir elektron kaybetmesi,

$$X : Y \longrightarrow X :^{-} + Y^{+}$$

3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.

$$A + e \longrightarrow A^{\cdot -}$$

Biyolojik sistemlerde en önemli radikaller oksijenden oluşur. Moleküler oksijen biradikal yapısı nedeniyle yüksek derecede reaktif oksijen türleri oluşturma eğilimindedir [49]. Reaktif oksijen türleri (ROS):

1. Süperoksit ($O_2\bullet^-$): Oksijen molekülünün bir elektron alması sonucu indirgenmesiyle meydana gelir. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüştürülür. Bu radikal direkt bir oksidatif zarara nadir olarak sebep olmakla birlikte asıl zararı hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metali iyonlarını indirgemesinden ileri gelir [46].

2. Hidrojen peroksit (H_2O_2): Moleküler oksijenin asidik ortamdan iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron almasıyla oluşurlar. Biyolojik sistemdeki üretimleri süperoksitin SOD tarafından dönüştürülmesiyle gerçekleşir. Bu reaksiyon sonunda süperoksit proton alır ve hidrojen peroksit ile oksijen açığa çıkar. Hidrojen peroksitin etkisi superoksitten daha zayıftır, dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutasyon peroksidaz (GPx) enzimleriyle su ve oksijen gibi ürünlere dönüştürülerek etkisizleştirilir [47]. Hidrojen peroksit açıkta elektron bulundurmadığından serbest radikal değildir fakat reaktif oksijendir ve ortamda geçiş metalleri varlığında süperoksitle reaksiyona girerek yıkılır ve ortaya en aktif ve zararlı serbest radikal olan hidroksil çıkar [45].

3. Hidroksil (OH•): Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalarak iyonlarına ayrılmasıyla ya da ortamda geçiş metalleri olduğu durumlarda bunların hidrojen peroksitle reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkar. Aşırı derecede reaktiftir ve hızlı bir şekilde hem düşük hem de yüksek molekül ağırlıklı bileşiklere zarar verebilir [48]. Membrana yakın bir yerde üretilmesi durumunda membran fosfolipid zincirinin yağ tabakasına saldırarak lipid peroksidasyonuna neden olur. Yağ asidindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomu çıkarılmasıyla lipid radikali oluşur. Lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri oluşur ve ortaya çıkan bu radikaller membran yapısındaki diğer yağ asitlerini

etkileyerek yeni radikallerin oluşmasına neden olur. Bu şekilde olay kendini katalizleyerek devam eder [49].

4. Singlet oksijen ($^1O_2$): Eşleşmemiş elektronu olmadığı için serbest radikal değildir fakat reaktif bir oksijen molekülüdür ve serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olur [50].

Süperoksit ve hidroksilin yanı sıra; peroksil (ROO•), nitrik oksit (NO•), nitrojen dioksit (NO_2•), ve lipid peroksil (LOO•) de dikkate değer serbest radikal moleküllerdir. Serbest radikal olmadığı halde serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olabilen hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi diğer moleküllere; ozon (O_3), hipokloröz asit (HOCl), nitröz asit (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^-$) ve lipid peroksit (LOOH) örnek verilebilir [51].

Serbest radikallerin oluşumu endojen (iç) ve ekzojen (dış) kaynaklı olabilir. Endojen kaynaklara mitokondriyal elektron transportu, ksenobiyotik metabolizması, fagosotik aktivasyon ve çeşitli sentez ve yıkım reaksiyonları örnek gösterilebilir. Reaktif oksijen metabolitleri aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak ortaya çıkmaktadır [52]. Eksojen kaynaklara ise; radyasyon, sigara dumanı, bağımlılık yapan maddeler, UV ışınları, hava kirliliği, güneş ışığı, ilaç oksidasyonları ve stres örnek verilebilir [46].

1.3.2.2. Antioksidanlar

Serbest radikallerin vücutta oluşumlarını veya oluşturduğu zararları engellemek noktasında antioksidanlar devreye girer. Antioksidanlar düşük dozlarda bile oksidan denilen subtratlara karşı etkili olarak onların zararlı etkilerini durduran maddelerdir [53]. Antioksidanları enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar şeklinde iki kategoride değerlendirilebilir [50]. Buna göre;

Enzimatik olan antioksidanlar;

1. Süperoksit dismutaz (SOD)
2. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)
3. Glutatyon-S-Transferaz (GST)
4. Hidroperoksidaz
5. Katalaz (CAT)

6. Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
7. Süperoksit redüktaz
8. Peroksiredoksinler

Enzimatik olmayan antioksidanlar;

1. A Vitamini (β-Karoten)
2. E Vitamini (α-Tokoferol)
3. C Vitamini (Askorbik asit)
4. Proteinler (ferritin, bilirubin, albumin, transferin)
5. Fenolik bileşikler (polifenoller, flavonoitler)
6. Hormonlar (serotonin, melatonin)
7. Çinko, demir, bakır, selenyum
8. Deferoksamin (DFO)
9. Haptoglobin ve hemopeksin
10. Seruloplazmin
11. Mannitol
12. Lipoik asit
13. Ürik asit
14. Glutatyondur [50, 54, 56].

Enzimatik olan antioksidanlar genellikle hücre içinde daha etkiliyken, enzimatik olmayanlar ise hücre dışında daha etkilidirler [50].

Antioksidanların radikalleri etkisiz hale getirmede kullandığı başlıca dört yol vardır [55]. Bunlar;

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf bir moleküle dönüştürmek suretiyle etkisiz hale getirir. Enzim yapısındaki antioksidanların etki mekanizması bu şekildedir.

2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara hidrojen aktarmak suretiyle aktivitelerini durdurur. Fenolik bileşikler, mannitol ve vitaminler bu şekilde etki eder.

3. Zincir reaksiyonları kırma etkisi (Chain Breaking): Kendine bağlamak suretiyle aktiviteyi durdurur. Seruloplazmin ve ağır minerallerin etki mekanizmasıdır.

4. Onarma etkisi (Repair): Oksidanlarca zarara uğramış molekülleri onararak etki gösterir.

1.3.2.3. Antioksidan aktiviteyi belirlemede kullanılan bazı yöntemler

1. DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi: Toplam radikal süpürme aktivitesini test eden bir yöntemdir. DPPH stabil organik bir nitrojen radikalidir. 515 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. Koyu menekşe renginde olan DPPH radikali ortamda hidrojen verici bir antioksidan olması durumunda indirgenerek DPPH-H formuna dönüşür ve renk kaybına uğrar [57]. Antioksidan tarafından DPPH'a proton temini 517 nm de absorbansın azalmasına neden olur ve bu durum spektrofotometre ile tayin edilebilir. Bu dalga boyunda azalan absorbans değeri geriye kalan DPPH serbest radikalinin miktarını dolayısıyla serbest radikal giderme aktivitesini verir [58]. Bu yöntem bitki veya gıdalardan elde edilen özütlerin antioksidan aktivitesini belirlemekte sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [57].

2. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) Yöntemi: Toplam antioksidan kapasitesini ölçen bir yöntemdir. Benzie ve Strain (1996) tarafından geliştirilmiştir. Düşük pH'ta Fe^{+3}'ün, tripiridiltriazin (TPTZ) ile reaksiyonu sonucu oluşan [Fe(III)-TPTZ] kompleksi antioksidanların etkisiyle Fe^{+2}-tripiridiltriazin [Fe(II)-TPTZ] kompleksine indirgenir. Ortaya çıkan bu yeni kompleks koyu mavi renktedir ve 593 nm'de maksimum absorbans verir [60]. FRAP değeri; belirli konsantrasyonlardaki Fe^{+2} iyonlarına sahip karışımların bilinen absorbans değerinin 593 nm'de absorbans değişimlerinin kıyaslanmasıyla elde edilebilir [59].

3. CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) Yöntemi: Toplam antioksidan kapasitesini ölçen bir yöntemdir. Apak ve arkadaşları tarafından 2004 yılında geliştirilmiştir. Her tür antioksidanın tam antioksidan kapasitesini ölçebilen elektron transferi tabanlı bir yöntemdir. Elektron transferine dayanan bu spektrofotometrik yöntemde kromojenik oksidanın indirgenmesiyle oluşan renk değişimi antioksidan kapasitesini belirtir. Antioksidan konsantrasyonuyla renk değişim derecesi doğru orantıldır. Temel mekanizması Cu(II)-neokuproin (Nc) reaktifinin antioksidan tarafından Cu (I)-Nc kelatına indirgenmesidir. Metalden liganda yük aktarımı sayesinde renk değişikliği gözlemlenir. Oluşan kelat 450 nm'de maksimum absorbansa sahiptir [88]. CUPRAC yöntemi FRAP yönteminden daha avantajlıdır çünkü bakırın reaksiyon kinetiği demirden hızlıdır [61].

4. Folin-Ciocalteu Yöntemi: Toplam fenolik bileşik miktarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin temelleri fenolik ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyuma elektron transfer edilmesine dayanmaktadır. Folin reaktifinin indirgenmesiyle mavi renkli kompleksin oluşumu 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir [57]. Çoğu bitki kökenli antioksidan yüksek miktarlarda polifenoller içerdiği için araştırmacılar genellikle Folin-Ciocalteu yöntemini tercih etmektedir [62].

1.4. *Ramalina* Cinsi Hakkında Bilgiler

Yeryüzünde 250 den fazla tür içeren *Ramalina* cinsinin bilimsel sınıflandırması;

ALEM: Fungi
ŞUBE: Ascomycota
SINIF: Lecanoromycetes
TAKIM: Lecanorales
FAMİLYA: Ramalinaceae
CİNS: Ramalina Ach. (1809)

Bazı liken isimlerinin etimolojisi üzerine yapılmış bir çalışmada *Ramalina* isminin ince dallar, sürgünler, sık çalılık, çalı çırpı, dal, dala ait, dalda gelişen veya ölü dal anlamına gelen latince kelimelerden üretilmiş olduğu ve bu durumun hem morfolojisini hem de yaşadığı habitatı işaret ediyor olduğu belirtilmiştir [65]. Çalışmada da ifade edildiği üzere bu cinsin pek çok türüne ağaç dalları üzerinde rastlanır.

Habitatı ağaç kabuğu ve kayaların üzeridir. Bu cins üyeleri frutikoz (dalsı) likenlere mensup olup tallusu çalımsı görünümdedir ve substrata tek bir noktadan veya dağınık olarak birkaç yerden tutunurlar. Tallus dik veya sarkan formda olabilir. Basit veya dallanmış yapıda olup dallar dikotomik veya düzensizdir. Dallarında papil, kanal, oluk veya pseudosifel bulunabilir [66]. Dalların içi yoğun veya boş, dallar yassılaşmış veya yuvarlak, dibe doğru köşeli olabilir. Yüzeyi sarımtırak, grimsi yeşil veya soluk sarıdır. Kalın duvarlı hiflerin oluşturduğu ince bir korteksi vardır. Medulla genellikle gevşek araknoid, içi boş olanlarda ise yoktur. Primer fotobiontu *Trebouxia* olup sekonder fotobiont yoktur. Diskler konkav ya da konveks, sıklıkla pruinoz olup marjin tallusla benzerlik gösterir. Askus sekiz sporludur. Askosporlar 1(-3) septumlu, elipsoid veya iğ

şeklindedir. Konidiyumlar renksiz ve çubuk şeklindedir. Sekonder metabolitleri; kortekste usnik asit ve atranorin, medullada genellikle orsinol veya ß-orsinol, depsidler veya depsidonlar, triterpenler ve alifatik asittir [68].

Kozmopolitan bir cins olup tüm dünya çapında, polar ve tropikal iklimlerde dahi yayılım gösteren 200 türü listelenmiştir [67]. Bu çalışmada araştırılan *Ramalina calicaris* türünün tayin anahtarındaki kısa tanımlaması şu şekildedir;

Dalları sert sivri uçlu, özellikle taban kısmına doğru belirgin kanallı; yüzey parlak, +/- pürüzlü, < 3 mm genişliğinde, 5-8(-15) cm boyunda, apotesyum marjinal, subterminal [66].

1.4.1. *Ramalina calicaris* (L.) Fr.

Dalsı *Ramalina* liken türlerinden biridir. Yoğun dallanmaya sahip olup dallar küme küme ve dik durumdadır, yaşlandıkça sarkmış hale gelebilir. Dalları sert ve düzleşmiştir. Solgun gri-yeşil renktedir. Kuruduğunda sert ve batıcı hale gelir. Yüzeyi parlak ve pürüzsüzdür. Pseudosifeller yaygındır fakat belirgin değildir. Medullası oldukça yoğundur. Apotesyum yaygındır, asıl olarak marjinal, subterminal yada açı yapan dalların kıvrımlı kısımlarındadır. Askosporlar 10-16 x 5-7 µm boyutlarında ve geniş elipsoid şekildedir. Kimyası; Medulla: P-, K-, KC-, C-, UV- [69].

Renk reaksiyonu liken tür tayininde kullanılan bu kimyasal spot testlerin (P, K, C) madde içerikleri şöyledir: P: % 95 etil alkolde doygun parafenilendiamin, K: % 10 KOH (%10'luk potasyum hidroksit çözeltisi), C: Ticari çamaşır suyu (Sodyum hipoklorid çözeltisi), KC: K ile C'nin ardarda uygulanması, UV: Ultraviole ışığa karşı renk.

1.5. Çalışmada Test Edilen Bakteriler Hakkında Bilgiler

1.5.1. Çalışmada test edilen Gram (-) bakteriler

1.5.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Karakteristik Özellikleri: *Pseudomonas aeruginosa* aerobik, hareketli, Gram (-) ve çubuk şeklinde bir bakteridir. Bakteriyolojik olarak en dikkat çekici özelliği renkli, suda

çözünebilen pigmentler üretmesidir. Ayrıca tüm tıbbi bakımdan önemli bakterilerin antimikrobiklerine karşı en istikrarlı direnci gösteren bakteridir [70].

Sebep Olduğu Hastalıklar: *P. aeruginosa* doğada yaygın olarak bulunan fırsatçı bir patojendir. Fırsatçı enfeksiyonlara ve hastane enfeksiyonlarına yol açar. Genellike çoklu antibiyotik direnci gösteriyor olması tedavisini zorlaştırmakta ve hastalık ve ölümlere neden olmaktadır [71]. Pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları, cerrahi yara enfeksiyonları ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına sebep olur [72]. *P. aureginosa* yanıklar ve çevreden kontamine olmuş yaralarda enfeksiyona neden olan bakterilerin başında gelmektedir [70].

1.5.1.2. *Escherichia coli*

Karakteristik özellikleri: *E. coli* sıcakkanlı organizmaların bağırsağında yaygın olarak görülen, Gram (-), fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde bir bakteridir. Düz, kuru, pembe renkli koloniler oluşturur [73].

Sebep Olduğu Hastalıklar: *E. coli* türü ürettiği antijenlerin farklılık göstermesi nedeniyle serotiplere ayrılmıştır [70]. Bu tür genel olarak zararlı değildir ve normal bağırsak mikroflorasında yer alır. Fakat bu türe ait bazı serotipler gıda zehirlenmesi, gastreoenterit, idrar yolu enfeksiyonları ve neonatal menenjite sebep olmaktadır [73]. *E. coli*'nin O157:H7 serotipinin Hemolitik Üremik Sendrom (HUS)'a da sebep olabildiği bilinmektedir.

1.5.2. Çalışmada test edilen Gram (+) bakteriler

1.5.2.1. *Staphylococcus aureus*

Karakteristik Özellikleri: *S. aureus* hareketsiz, Gram (+), sporsuz, fakültatif anaerob ve küre şeklinde bir bakteridir. Gelişme sıcaklığı 6-46 ^{o}C olup, optimum gelişme sıcaklığı 30-37 ^{o}C'dir. 10-48 ^{o}C sıcaklık değerlerinde toksin oluşturur. Sporsuz olduğu halde vücut dışında uzun süre canlı kalabilen tek insan patojenidir [75].

Sebep Olduğu Hastalıklar: *S. aureus'*a ait önceden oluşmuş enterotoksinler yutulması halinde gıda zehirlenmesine sebep olur. Bu bakteri tarafından oluşturulan enfeksiyonlar

akut, agresif, lokal olarak tahrip edici, irinli lezyonlardır. Böbrek, akciğer veya kemik gibi deri dışındaki organlarda oluşturduğu enfeksiyonlar da merkezi ve yıkıcıdır hatta kana ve diğer organlara yayılma potansiyeline sahiptir. Bu tür enfeksiyonlar yüksek ateşe ve sistemik toksisiteye neden olur ve kısa sürede ölümcül hale gelebilir. Bu bakteri tarafından üretilen toksinler stafilokoksik toksik şok sendromuna (TSS) neden olabilir [70].

1.5.2.2. *Enterococcus faecalis*

Karakteristik Özellikleri: *E. faecalis* Gram (+), fakültatif anaerob, küre şeklinde bir bakteridir. Tek başına ya da diğer mikroorganizmalarla birlikte, kısa zincir halinde yaşayabilir. İnsan bağırsağında zarar vermeksizin çok sayıda bulunabilir. Yüksek pH değerlerine dayanıklıdır [76].

Sebep Olduğu Hastalıklar: *E. faecalis* travma, karın cerrahisi veya savunma sisteminde sorun olan hastanede yatan hastalarda enfeksiyona sebep olur [70]. Genellikle intraabdominal enfeksiyon, bakteriyemi ve endokardite yol açarken daha nadir olarak menenjit ve yumuşak doku enfeksiyonlarına sebep olmaktadır. İntestinal florada bol bulunmaları, oluşturduğu başlıca enfeksiyonun buraya bitişik olan üriner sistemde meydana gelmesine neden olmaktadır [77].

BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan liken türü

Deneylerde kullanılan *R. calicaris* türü liken örnekleri rakımı 840 m olan Bolu Mudurnu'dan 24.04.2016 ve rakımı 1300 m olan Bolu Aladağlar'dan 25.04.2016 tarihlerinde toplanmıştır. Örnekler ayırt edilebilmesi adına *R. calicaris* (MUD) ve *R. calicaris* (ALA) şeklinde belirtilmiştir. Toplanan örnekler Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU tarafından Marmara Üniversitesi Herbaryumu'nda teşhis edilmiştir.

2.1.2. Çalışmada kullanılan bakteri suşları

Antibakteriyel aktivite deneyinde kullanılan bakteri suşları (ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*, ATCC *25923 Staphylococcus aureus*, CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922 *Escherichia coli*) Yeditepe Üniversitesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan Doç. Dr. Nüzhet Cenk SESAL ve ekibi ile Yrd. Doç. Dr. İskender KARALTI tarafından seçilerek temin edilmiştir.

2.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Antibakteriyel ve antioksidan aktivite deneylerinde kullanılan kimyasal maddeler;

1. Aseton
2. LB Broth Besi Yeri
3. LB Agar Besi Yeri
4. Sulphamethoxazole ve Ciprofloxacin antibiyotik diskleri
5. Bakır (II) klorürdihidrat ($CuCl_2.2H_2O$)
6. Neocuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)
7. Amonyum asetat (NH_4Ac)
8. Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit).

9. Etanol

2.1.4. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri

Antibakteriyel ve antioksidan aktivite deneylerinde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri;

1. UV-VIS Spektrofotometre (Beckman Coulter DU 730) ve spektrofotometre küveti (1400 µl)
2. Dijital hassas terazi
3. Otoklav
4. İnkübatör
5. Vorteks
6. Buzdolabı
7. Derin dondurucu
8. Mikrodalga fırın
9. Steril kabin
10. Çeker ocak
11. Otomatik pipetler (1000µl, 100µl, 10µl)
12. Pipet uçları (10µl, 100 µl, 1000 µl)
13. Ependorf tüpleri, falkon tüpler ve cam deney tüpleri
14. Bek alevi
15. Platin öze
16. Distile su
17. Pens
18. Steril diskler
19. Cam ve plastik petri kabı,
20. Beher
21. Erlenmayer
22. Porselen havan
23. Otoklav şişesi (500 ml)
24. Soxhlet cihazı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Liken aseton özütlerinin eldesi

Likenler teşhisi yapıldıktan sonra yabancı maddelerden ayıklanarak yıkandı ve kurutuldu. 3'er gram tartılarak havanda ezilen likenler toz haline getirildi. Toz haline gelmiş olan likenler steril falkon tüplere alındı ve üzerlerine 35 mililitre aseton eklendi. Aseton içerisindeki likenler 24 saat karanlık bir ortamda bekletildi ve kurutma kağıdıyla süzülerek steril cam petrilere aktarıldı. Cam petriler 24 saat çeker ocakta bekletilerek asetonun uçması sağlandı. Aseton uçtuktan sonra kalan toz halindeki liken özütleri kazınarak toplandı ve steril ependorflara alındı. Elde edilen özütler deneylerde kullanılmak üzere uygun şartlarda muhafaza edildi.

2.2.2. Antibakteriyel aktivite ölçümünde kullanılacak liken özütlerinin hazırlanması

Steril ve uygun şartlarda muhafaza edilmiş olan toz *R. calicaris* (ALA) ve *R. calicaris* (MUD) özütlerinden ayrı ayrı 10,7 miligram özüt tartıldı ve bu toz özütlere tam olarak çözündükleri miktar belirlenene kadar denetimli olarak aseton eklendi. 1169 mikrolitre asetonda tam çözünme sağlayan liken özütleri disklere emdirilmek üzere steril cam tüplerde muhafaza edildi. İki liken özütü de aynı miktarda tartılarak ve aynı miktarda asetonda çözülerek karşılaştırılabilmesi adına konsantrasyonlarının eşit olması sağlandı. Elde edilen özütlerin konsantrasyonları;

R.calicaris (ALA): 9 miligram/mililitre

R.calicaris (MUD): 9 miligram/mililitre

2.2.3. Bakterilerin hazırlanması

Yeditepe Üniversitesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan Doç. Dr. Nüzhet Cenk SESAL ve ekibi ile Yrd. Doç. Dr. İskender KARALTI tarafından temin edilmiş olan bakteri suşları (ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*, ATCC *25923 Staphylococcus aureus,* CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922 *Escherichia coli*) Luria

Bertoni (LB) besiyeri kullanılarak üretici firmanın prosedürlerine uygun şartlarda çoğaltıldı ve muhafaza edildi. Deney için kullanılmak üzere stok bakteri kültürlerinden steril şartlarda LB agar besiyeri içeren steril petrilere pasaj alındı ve 37 °C 'de 24 saat bekletilerek bakterilerin aktive olmaları sağlandı. Aktive olmuş bakteri kültürlerinden steril özeyle alınan bakteriler LB broth besiyerine eklendi ve UV-VIS Spektrofotometre kullanılarak bakteri konsantrasyonları 0.5 McFarland'a ayarlandı.

2.2.4. Antibakteriyel aktivite testleri

Liken özütlerinin antibakteriyel aktivitelerini test etmek için disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Uygun şartlarda saklanmış olan aseton liken özütleri mikropipet kullanılarak 6 mm çapındaki steril disklere 20 mikrolitre, 40 mikrolitre ve 80 mikrolitre miktarında emdirildi. Emdirme işlemi diskin bir yüzeyine 10 mikrolitre özüt emdirilip asetonun uçması beklenerek aynı işlemin diğer yüzeye uygulanması ve belirlenen miktar emdirilene kadar aynı işlemin tekrarlanması şeklinde gerçekleştirildi. İşlem sonucunda disklerdeki özüt konsantrasyonu; 20 µl'de 0,18 mg, 40 µl'de 0,36 mg ve 80 µl'de 0,72 mg olmuştur. LB agar besiyeri içeren steril petrilere 0.5 McFarland konsantrasyonundaki bakterilerden steril şartlarda 35 mikrolitre ekim yapıldı ve steril cam L baget ile besiyeri üzerine tamamen yayılması sağlandı. Özüt emdirilmiş diskler ekimi yapılmış olan petrilere steril şartlarda her biri birbirine uygun mesafede olacak şekilde 3'er dozaj olarak yerleştirildi. Aynı petrilere karşılaştırma yapmak amacıyla standart antibiyotik diskler de uygun bir mesafede olacak şekilde yerleştirildi. Ekimi yapılmış ve diskleri yerleştirilmiş olan petriler 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda liken özütü içeren disklerin ve antibiyotik disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları cetvel ile ölçülerek kayıt altına alındı. Aseton çözücüsünün bakteriler üzerinde inhibe edici etkiye sahip olup olmadığını belirlemek için aseton emdirilmiş ve uçurulmuş diskler kullanıldı. Kontrol grubu olarak Gram (-) bakteriler üzerinde Ciprofloxacin 5 µg, Gram (+) bakteriler üzerinde ise Sulphamethoxazole 25 µg antibiyotik diskleri kullanıldı. Deneyler 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve sonuçlar ortalama değer üzerinden hesaplandı.

2.2.5. Antioksidan aktivite testleri

Antibakteriyel aktivite testinde araştırdığımız *R. calicaris* (ALA) ve *R. calicaris* (MUD) liken örneklerinin sonuçları değerlendirildikten sonra sonuçlar arasında çok farklılık olmaması fakat *R. calicaris* (ALA)'nın nispeten daha yüksek etkinlik göstermesi sonucu antioksidan etkinlik araştırması sadece bu lokasyondan toplanan örnek üzerinden yapıldı. *R. calicaris* (ALA) aseton özütünün antioksidan etkinliği Apak ve arkadaşları tarafından 2004'te geliştirilen CUPRAC yöntemi ile belirlendi [61]. Toz liken özütü; konsantrasyonun antibakteriyel aktivite araştırmasıyla aynı olması için 9 miligram/mililitre olacak şekilde ayarlanarak asetonla çözüldü.

CUPRAC yöntemi için 3 solüsyon hazırlandı;

1.0×10^{-2} M olacak şekilde Bakır (II) klorürhidrat ($CuCl2.2H2O$)'tan 0,4262 g tartım alınıp distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

1 M (pH=7) olacak şekilde Amonyum asetat'tan 19.27 g tartıldı ve distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

7.5×10^{-3} M olacak şekilde Neokuproin'den 0.156 g tartılarak etanolle 100 mL'ye tamamlandı.

Bir cam tüp içerisine hazırlanan üç solüsyondan 50'şer µl alındı. Üzerine 55 µl liken özütü koyuldu ve tüp iyice çalkalandı. (CUPRAC metoduna göre toplam 4,1 ml olması gereken hacim 20'de 1'i olacak şekilde oranlanmıştır.) Ağzı kapatılan tüp oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Kontrol grubu hazırlanan üç solüsyondan 50'şer µl alınarak ve bunlara 55 µl aseton eklenerek hazırlandı. 30 dakika sonra UV spektrofotometrede içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'de örneğin absorbans değeri ölçüldü. Referans antioksidan olarak troloks kullanıldı. Deneyler kontrol grupları kullanılarak ve 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi.

BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bulgular

3.1.1. Antibakteriyel aktivite

Çalışmamızda *R. calicaris*'in aseton özütünün antibakteriyel etkinliğini belirleyebilmek için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Steril disklere artan oranlarda emdirilen özüt ATCC 29212 *Enterococcus faecalis,* ATCC *25923 Staphylococcus aureus*, CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa,* ATCC 25922 *Escherichia coli* bakterilerine uygulanmıştır. Oluşan zonların çapları diskler dahil şekilde ölçülmüş ve milimetre cinsinden kaydedilmiştir. Kontrol grubu olan özütsüz disklerde aktivite gözlenmemiştir. Disk difüzyon deneyi *R. calicaris* (ALA) ve *R. calicaris* (MUD) için ayrı ayrı 3'er tekrarlı olarak yapılmış ve her iki örnek için elde edilen sonuçların ortalama değerleri Çizelge 1'de *R. calicaris* (ALA) ve Çizelge 2'de *R. calicaris* (MUD) olacak şekilde verilmiştir.

R. calicaris (ALA) ve *R. calicaris* (MUD) likenlerine ait özütlerin uygulanan hiçbir dozajı Gram negatif olan *P. aeruginosa* ve *E. coli* üzerinde inhibisyon zonu oluşturmamıştır. Bu iki bakteri türü üzerinde iki liken türünün de uygulanan dozajlarının antibakteriyel etkisi yoktur.

R. calicaris (ALA) ve *R. calicaris* (MUD) likenlerine ait özütlerin bütün dozajları Gram pozitif olan *E. faecalis* ve *S. aureus* üzerinde belirli büyüklüklerde inhibisyon zonları oluşturarak antibakteriyel aktivite göstermiştir.

R. calicaris (ALA) likeninin 20 µl'lik özütü (ALA 20) en yüksek antibakteriyel etkiyi (12 mm) *S. aureus* üzerinde göstermiştir. *R. calicaris* (MUD) likeninin 20 µl'lik özütü (MUD 20) ise en yüksek antibakteriyel etkiyi (11,3 mm) *E. faecalis* üzerinde göstermiştir.

R. calicaris (ALA) likeninin 40 µl'lik özütü (ALA 40) en yüksek antibakteriyel etkiyi (13 mm) *S. aureus* üzerinde göstermiştir. *R. calicaris* (MUD) likeninin 40 µl'lik özütü de (MUD 40) en yüksek antibakteriyel etkiyi (12,3 mm) *S. aureus üzerinde* göstermiştir.

R. calicaris (ALA) likeninin 80 µl'lik özütü (ALA 80) en yüksek antibakteriyel etkiyi (13,6 mm) *S. aureus* üzerinde göstermiştir. *R. calicaris* (MUD) likeninin 80 µl'lik özütü (MUD 80) ise *S. aureus* ve *E. faecalis* üzerinde aynı etkinliği (13 mm) göstermiştir.

Deneyde araştırılan bakterilerden kullanılan liken özütlerine karşı en duyarlı olan bakterinin *E. faecalis* ile kıyaslandığında ufak bir farkla *S. aureus* olduğu söylenebilir.

Gram negatif bakterilerin ikisine karşı da herhangi bir antibakteriyel etkinlik tespit edilemezken Gram pozitif bakterilerin ikisine karşı da antibakteriyel etkinlik gözlemlenmesi liken özütlerinin etkinliğinin bakteri hücre duvarının özelliklerine göre değişebileceğini düşündürmektedir.

Test edilen liken özütlerinin hiçbir dozajı mukayese antibiyotiğinden daha yüksek bir antibakteriyel etkinlik göstermemiştir.

Çizelge 3.1 *R. calicaris* (ALA) özütü inhibisyon zonları (mm)

Bakteriler	**İnhibisyon zonları (mm)**				
	ALA 20 µl (0,18 mg)	**ALA 40 µl (0,36 mg)**	**ALA 80 µl (0,72 mg)**	**CIP 5 µg**	**SXT 25 µg**
E. faecalis ATCC 29212	11,6±0,6	12,6±0,6	13,3±0,6	D	24,6±0,6
S. aureus ATCC *25923*	12±0	13±0	13,6±0,6	D	25,3±1
P. aeruginosa CECT 4122	-	-	-	32,8±0,6	D
E. coli ATCC 25922	-	-	-	25±0,6	D

ALA 20 µl: *Ramalina calicaris* (ALADAĞLAR) 20 µl'lik özüt,

ALA 40 µl: *Ramalina calicaris* (ALADAĞLAR) 40 µl'lik özüt,

ALA 80 µl: *Ramalina calicaris* (ALADAĞLAR) 80 µl'lik özüt,

CIP 5 µg: Ciprofloxacin 5 µg,

SXT 25 µg: Sulphamethoxazole 25 µg,

(-) : Zon oluşmadı, D: Denenmedi

(*) : Tablodaki rakamlar inhibisyon zonlarını mm cinsinden göstermektedir. Disklerin çapı 6 mm'dir. Standart sapma değerleri mm cinsinden verilmiştir. Deneyler üç tekrarlı çalışılmış, tabloda ortalama değerler verilmiştir.

Çizelge 3.2 *R. calicaris* (MUD) özütü inhibisyon zonları (mm)

Bakteriler	**İnhibisyon zonları (mm)**				
	MUD 20 µl (0,18 mg)	**MUD 40 µl (0,36 mg)**	**MUD 80 µl (0,72 mg)**	**CIP 5 µg**	**SXT 25 µg**
E. faecalis ATCC 29212	11,3±1	12±1,7	13±1	D	25±1
S. aureus ATCC *25923*	11±1	12,3±0,6	13±0	D	25,3±0,6
P. aeruginosa CECT 4122	-	-	-	33±0,6	D
E. coli ATCC 25922	-	-	-	25±0,6	D

MUD 20 µl: *Ramalina calicaris* (MUDURNU) 20 µl'lik özüt,

MUD 40 µl: *Ramalina calicaris* (MUDURNU) 40 µl'lik özüt,

MUD 80 µl: *Ramalina calicaris* (MUDURNU) 80 µl'lik özüt,

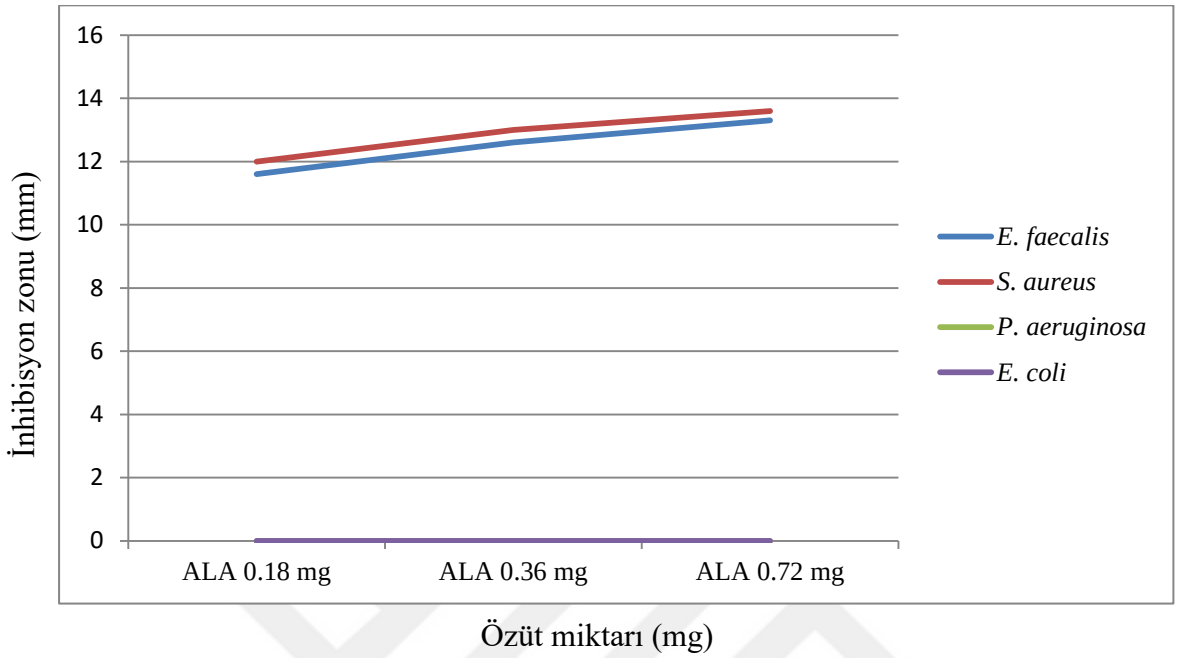
CIP 5 µg: Ciprofloxacin 5 µg,

SXT 25 µg: Sulphamethoxazole 25 µg,

(-) : Zon oluşmadı, D: Denenmedi

(*) : Tablodaki rakamlar inhibisyon zonlarını mm cinsinden göstermektedir. Disklerin çapı 6 mm'dir. Standart sapma değerleri mm cinsinden verilmiştir. Deneyler üç tekrarlı çalışılmış, tabloda ortalama değerler verilmiştir.

Çizelge 3.3 *R. calicaris* (ALA) aseton özütünün denenen dozlarındaki artan özüt miktarına bağlı oluşan inhibisyon zonu değişimi grafiği

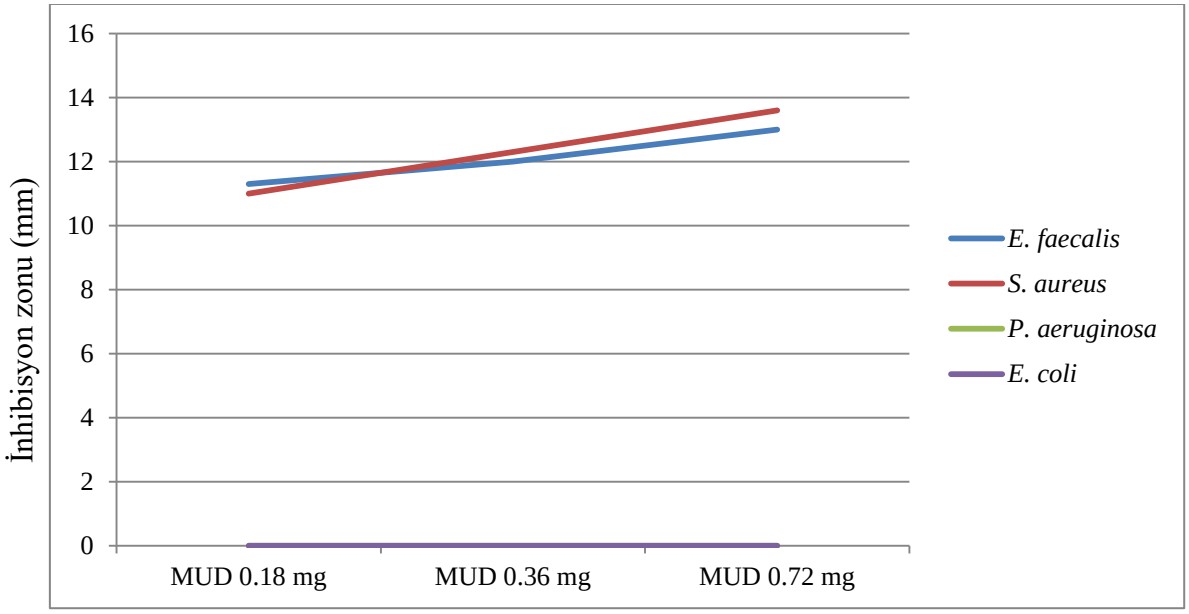


ALA 0.18 mg: *R. calicaris* (ALA) 20 µl'lik özüt emdirilen diskteki özüt miktarı,

ALA 0.36 mg: *R. calicaris* (ALA) 40 µl'lik özüt emdirilen diskteki özüt miktarı,

ALA 0.72 mg: *R. calicaris* (ALA) 80 µl'lik özüt emdirilen diskteki özüt miktarı,

Çizelge 3.4 *R. calicaris* (MUD) aseton özütünün denenen dozlarındaki artan özüt miktarına bağlı oluşan inhibisyon zonu değişimi grafiği



MUD 0.18 mg: *R. calicaris* (MUD) 20 µl'lik özüt emdirilen diskteki özüt miktarı,

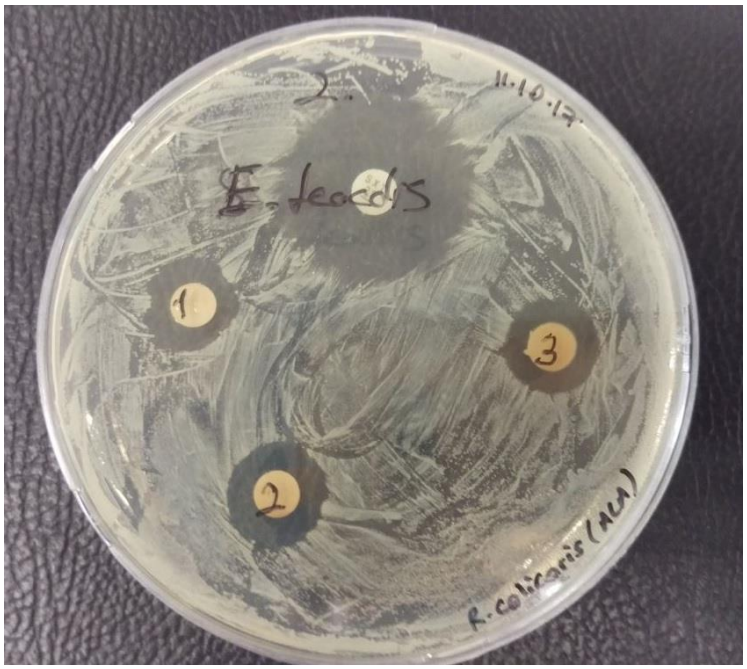
MUD 0.36 mg: *R. calicaris* (MUD) 40 µl'lik özüt emdirilen diskteki özüt miktarı,

MUD 0.72 mg: *R. calicaris* (MUD) 80 µl'lik özüt emdirilen diskteki özüt miktarı,

(*) : Grafiklerdeki inhibisyon zonu değerleri mm cinsinden verilmiştir. Disklerin çapı 6 mm'dir. Deneyler üç tekrarlı çalışılmış, grafiklerde ortalama değerler verilmiştir.

Şekil 3.1'de *R. calicaris* (ALA) aseton özütünün ve SXT antibiyotik diskinin ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* üzerindeki inhibisyon zonları, Şekil 3.2'de *R. calicaris* (ALA) aseton özütünün ve SXT antibiyotik diskinin ATCC *25923 Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon zonları, Şekil 3.3'de *R. calicaris* (ALA) aseton özütünün ve CIP antibiyotik diskinin CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki inhibisyon zonları ve Şekil 3.4'te ise *R. calicaris* (ALA) aseton özütünün ve CIP antibiyotik diskinin 25922 *Escherichia coli* üzerindeki inhibisyon zonları gösterilmiştir.

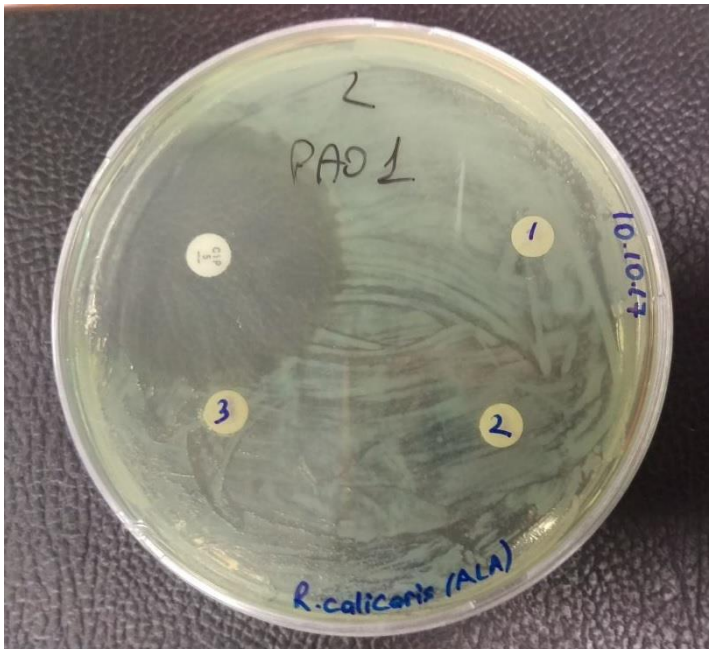
Şekil 3.5'te *R. calicaris* (MUD) aseton özütünün ve SXT antibiyotik diskinin ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* üzerindeki inhibisyon zonları, Şekil 3.6'da *R. calicaris* (MUD) aseton özütünün ve SXT antibiyotik diskinin ATCC *25923 Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon zonları, Şekil 3.7'de *R. calicaris* (MUD) aseton özütünün ve CIP antibiyotik diskinin CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki inhibisyon zonları ve Şekil 3.8'de ise *R. calicaris* (MUD) aseton özütünün ve CIP antibiyotik diskinin 25922 *Escherichia coli* üzerindeki inhibisyon zonları gösterilmiştir.



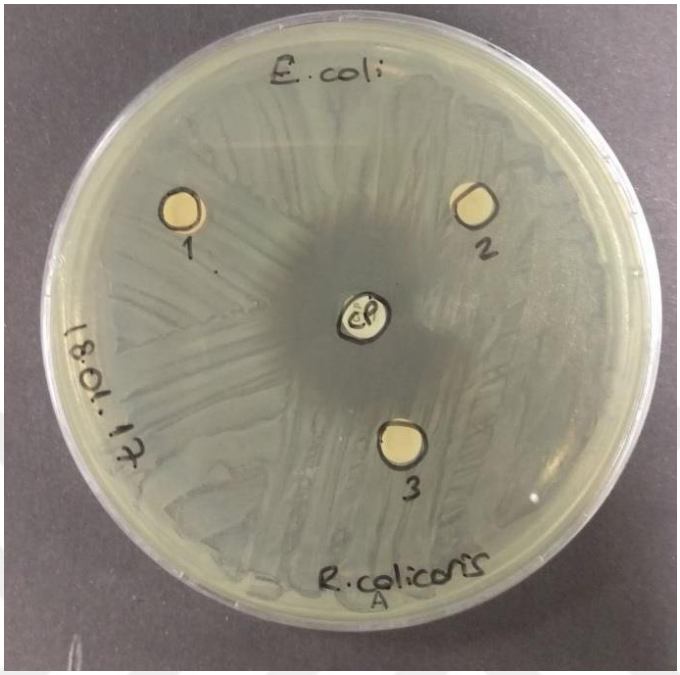
Şekil 3.1 *R. calicaris* (ALA) aseton özütü konsantrasyonlarının ve SXT antibiyotik diskinin ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* üzerindeki inhibisyon zonları. 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl, SXT 25: Sulphamethoxazole 25 µg.



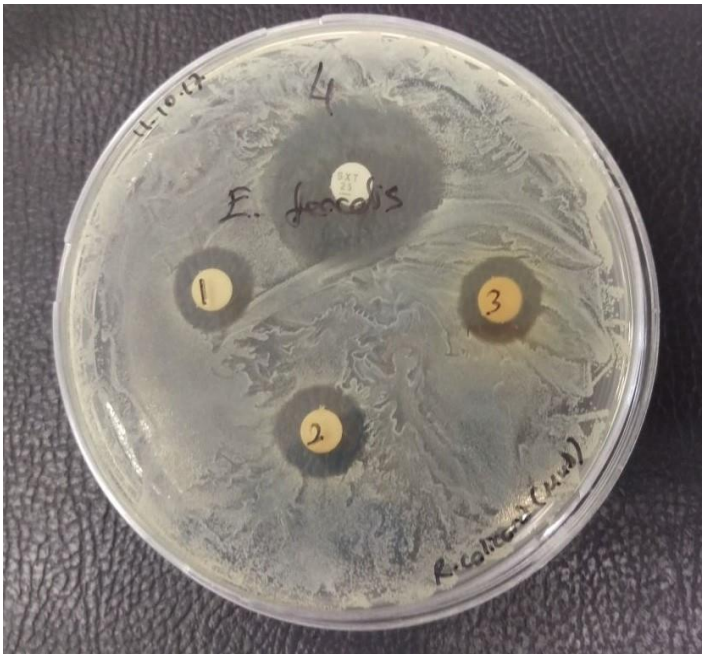
Şekil 3.2 *R. calicaris* (ALA) aseton özütü konsantrasyonlarının ve SXT antibiyotik diskinin ATCC *25923 Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon zonları. 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl, SXT 25: Sulphamethoxazole 25 µg.



Şekil 3.3 *R. calicaris* (ALA) aseton özütü konsantrasyonlarının ve CIP antibiyotik diskinin CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki inhibisyon zonları. 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl, CIP 5: Ciprofloxacin 5 µg.



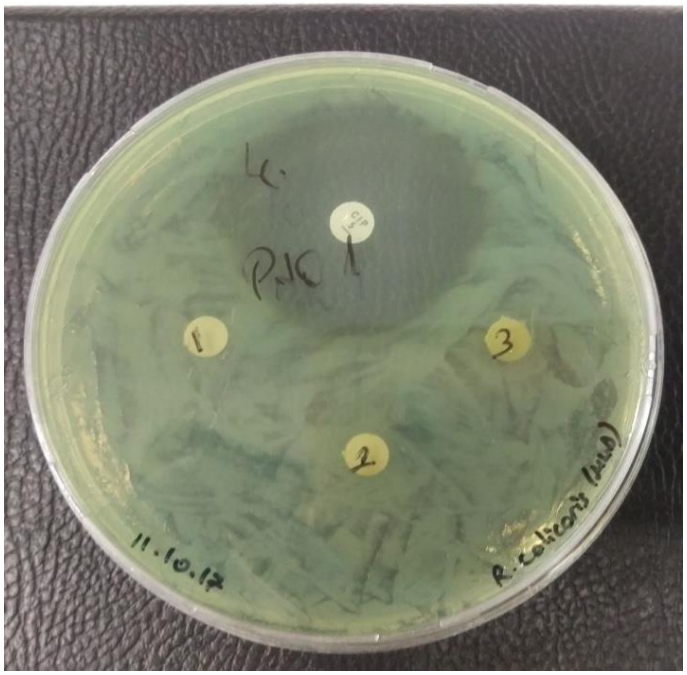
Şekil 3.4 *R. calicaris* (ALA) aseton özütü konsantrasyonlarının ve CIP antibiyotik diskinin 25922 *Escherichia coli* üzerindeki inhibisyon zonları. 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl, CIP 5: Ciprofloxacin 5 µg.



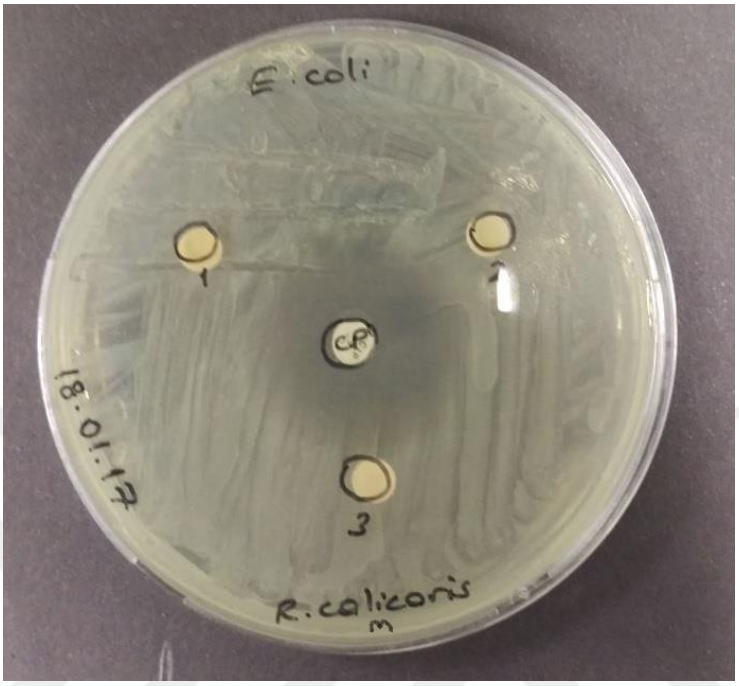
Şekil 3.5 *R. calicaris* (MUD) aseton özütü konsantrasyonlarının ve SXT antibiyotik diskinin ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* üzerindeki inhibisyon zonları. 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl, SXT 25: Sulphamethoxazole 25 µg.



Şekil 3.6 *R. calicaris* (MUD) aseton özütü konsantrasyonlarının ve SXT antibiyotik diskinin ATCC *25923 Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibisyon zonları. 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl, SXT 25: Sulphamethoxazole 25 µg.



Şekil 3.7 *R. calicaris* (MUD) aseton özütü konsantrasyonlarının ve CIP antibiyotik diskinin CECT 4122 *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki inhibisyon zonları. 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl, CIP 5: Ciprofloxacin 5 µg.



Şekil 3.8 *R. calicaris* (MUD) aseton özütü konsantrasyonlarının ve CIP antibiyotik diskinin 25922 *Escherichia coli* üzerindeki inhibisyon zonları. 1: 20 µl, 2: 40 µl, 3: 80 µl, CIP 5: Ciprofloxacin 5 µg.

3.1.2. Antioksidan Aktivite

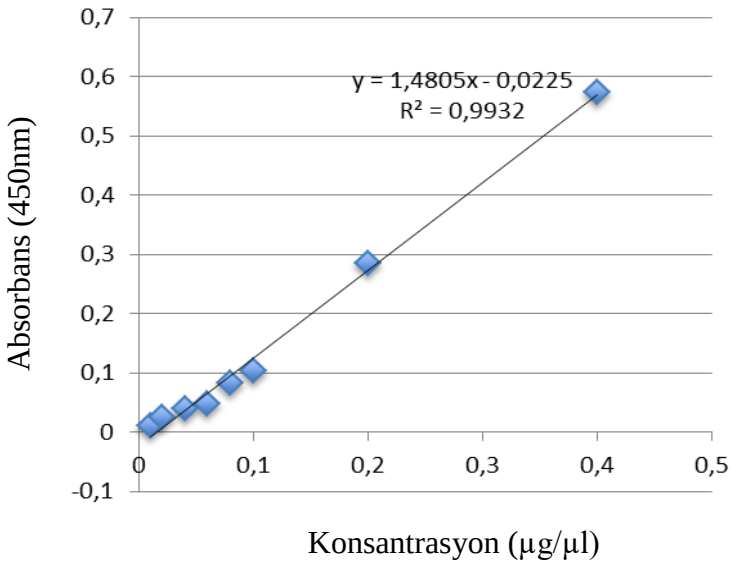
R. calicaris (ALA) aseton özütünün antioksidan aktivitesi CUPRAC yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem uygulanırken liken özütü üzerinde herhangi bir seyreltme yapılmamıştır. Kontrol grubu olarak asetonla hazırlanmış karışım kullanılmıştır. Açık mavi renkli CUPRAC reaktifine antioksidan özellikteki madde eklendiğinde kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH)n) reaksiyonu vermesi sonucu Cu(I)-Nc sarı renkli kelatı oluşur. Şekil 3.9'da (1) *R. calicaris* (ALA) aseton özütüyle ve (2) asetonla hazırlanmış kontrol grubuna ait CUPRAC karışımları gösterilmiştir. 1 numaralı liken özütü içeren karışımda sarı renkli kelat oluşumu gözlemlenmektedir.



Şekil 3.9 (1) *R. calicaris* (ALA) aseton özütüyle ve (2) asetonla hazırlanmış kontrol grubuna ait CUPRAC karışımları.

Troloks kalibrasyon grafiği hazırlanmış, grafikte belirtilen troloks miktarlarının antioksidan etkinliği incelenerek, troloksun miktarına bağlı etkinliğiyle liken özütünün etkinliği orantılanmıştır. Absorbans ve molar derişim grafiğinin eğiminden molar absorplama katsayısı bulunmuş, bulunan bu değer troloksun molar absorplama katsayısına bölünerek troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi bulunmuştur. Troloks kalibrasyon grafiği; troloks çözeltisinin konsantrasyona karşı absorbans değerleri ölçülerek ve grafiğe geçirilerek çizilmiştir. Çizelge 3.5'te troloks kalibrasyon grafiği verilmiştir.

Çizelge 3.5 CUPRAC yöntemiyle belirlenmiş troloks kalibrasyon grafiği. Y değeri lineer kalibrasyon denklemini, R^2 değeri ise korelasyon katsayısını vermektedir.



R. calicaris (ALA) aseton özütü için CUPRAC yöntemiyle elde edilen sonuç; 5.996 ± 0.122 µg Troloks eşdeğerleri (TE) /g (kuru ağırlık)' dır. Elde edilen bu sonuç troloksun 5,996 mikrogramının antioksidan etkinliğinin *R. calicaris* (ALA) aseton özütünün 1 gramının antioksidan etkinliğine eşdeğer olduğu anlamına gelmektedir.

3.2. Tartışma

Belirli mantarlar ile belirli alg veya siyanobakteri türlerinin simbiyotik yaşam ile bir araya gelmesinden oluşan likenlerin uzun yıllardan beri yiyecek, boya maddesi gibi çeşitli alanlarda kullanımlarının yanı sıra özellikle geleneksel ilaçlar olarak kullanıldıkları bilinmektedir. Likenlerin ilaç olarak kullanımları ilk olarak görüntülerinin benzer olduğu organlardaki hastalıklara iyi geleceğine dair bir düşünceyle denenmiş, bu denemelerden bazı ümit verici sonuçlar elde edilmesiyle de likenler ve içeriğinde bulundurduğu kimyasal maddeler bilimsel araştırmaların konusu olmuştur [1]. Çalışmamızda araştırmış olduğumuz *R. calicaris*' in geçmiş yıllarda peruk boyası olarak ve sarı- kırmızı yün boyası olarak kullanıldığı bilinmektedir [90]. Ayrıca XX. yüzyılın başlarından beri Avrupa'da kozmetik alanında saç pudrası olarak kullanılmıştır [100]. Bu alanlarda kullanılmasının yanı sıra; Libya'da *R. farinacea*, *Usnea plicata* ve *Pseudevernia furfuracea* ile birlikte kaynatılarak scı´ba adı verilen geleneksel bir ilaç olarak kullanıldığına dair bilgiler bulunmaktadır [91]. Liken metabolitleri üzerine yapılan araştırmalar sonucu antimikrobiyal, antifungal, antikanser, antiviral, antipiretik, anti-inflamatuar, analjezik ve anti-protozoal gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirlenen usnik asit metaboliti ilk kez 1834 yılında *R. calicaris*'in de aralarında bulunduğu bir kaç liken türünden izole edilmiştir [92]. Sonraki süreçte çeşitli araştırmalarla *R. calicaris*'in D-Arabitol [93], Usnik asit ve türevleri [93], Sekikaic asit [94,95], Ramalinoic asit [95,96], Obtusatic asit [97,98], Evernic asit [97,98] ve Spermine [99] gibi pek çok metabolite sahip olduğu belirlenmiştir.

Literatür taramalarında *Ramalina* cinsine mensup diğer türlerde bahsi geçen metabolitler ve daha çok sayıda çeşitli metabolit bulunduğuna dair çalışmalara rastlanmış [6,7] ve bu metabolitlerin antibakteriyel ve antioksidan etkinlikleri üzerinde yapılmış çok sayıda çalışma olduğu görülmüştür [8,11,32,39-42]. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda üzerinde çok fazla antibakteriyel ve antioksidan aktivite araştırması yapılmamış olduğunu belirlediğimiz *R. calicaris* türü incelenmiştir. Çalışma

sonucu Bolu ilinden toplamış olduğumuz *R. calicaris*'in aseton özütünün disk difüzyon yöntemiyle Gram pozitif olan *E. faecalis* ve *S. aureus* üzerinde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu, fakat Gram negatif *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı ise antibakteriyel etkisi bulunmadığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca antioksidan aktivite araştırması CUPRAC yöntemiyle yapılmış olup *R. calicaris* aseton özütünün belirli bir düzeyde kromojenik oksidan indirgeme kapasitesine sahip olduğu, dolayısıyla antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Çaışmamızda *R. calicaris* aseton özütünün test edilen Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkinlik gösterirken Gram negatif bakterilere karşı etkinlik göstermemiş olması içerisinde bulunan usnik asit metabolitinin miktarına bağlı olabilir. Çünkü çeşitli çalışmalar usnik asit miktarı yüksek olan liken türlerinin daha yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir [13,44]. *R. calicaris* aseton özütünün belirli bir seviyede antioksidan etkinliği bulunduğu fakat bu etkinlik seviyesinin diğer bazı liken türlerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir [84]. Bunun sebebi bünyesinde bulundurduğu ve antioksidan etkinliği diğer çalışmalarla belirlenmiş olan Sekikaic asit [32] ve Usnik asit [92] miktarına bağlı olabilir. Ayrıca liken bünyesinde bulunan metabolitlerin farklı çözücüler karşısında farklı seviyelerde açığa çıktığı ve bu durumun da araştırılan biyolojik aktiviteler üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir [63].

Tay ve arkadaşları (2004) [12] yaptıkları çalışmada *Ramalina farinacea'*nın aseton özütünün antimikrobiyal etkisini *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)'nın da içerisinde bulunduğu çok sayıda bakteri ve mantar üzerinde denemişlerdir. Kirby & Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapılmış olan deneyin sonucunda, çalışmamızda da test edilmiş olan bakterilerden *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkisi olduğunu, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı ise antibakteriyel etki bulunmadığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda da *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etki elde edilirken, Gram negatif olan *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı herhangi bir etkinlik görülmemesi çalışma sonuçlarının paralel olduğunu göstermektedir.

Cansaran ve arkadaşları (2008) [13] *Ramalina* cinsine ait; *Ramalina fastigiata, R. capitata, R. polymorpha, R. pollinaria* ve *R. fraxinea* liken türlerinin aseton özütlerini *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Enterococcus faecalis* (RSKK 508), *Proteus mirabilis* (Pasteur Ens. 235*), Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium* ve

Pseudomonas aeruginosa bakterilerine karşı test etmişlerdir. Deneyi disk difüzyon yöntemiyle her bir diske 50 µl özüt emdirerek yapmışlardır. Test edilen 5 *Ramalina* türünün hiçbiri *S. aureus* ve *P. aureginosa*'ya karşı antibakteriyel aktivite göstermemiştir. Türlerden *R. capitata* ve *R. fastigiata* ise *E. coli* ve *E. faecalis*'e karşı antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Çalışmamızda *E. faecalis*'e ve *S. aureus'a* karşı *R. calicaris* (ALA) ve *R. calicaris* (MUD) aseton özütlerinin ikisi de antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Diğer yandan *E. coli'*ye karşı olan inhibe edici etki bizim çalışmamızda görülmemiştir. *P. aeruginosa*'ya karşı iki çalışmada da etkinlik gözlemlenmemiştir. Cansaran ve ark. tarafından yapılan çalışmada deneyde araştırılan 5 liken türü üzerinde etkinliği pek çok çalışmayla belirlenmiş olan usnik asit miktarları belirlenmiş ve *E. coli'*nin gelişimini inhibe eden iki türün diğer türlere kıyasla daha fazla usnik asit içerdiğini ortaya çıkarmışlardır. Çalışmamızda Gram negatif bakterilere karşı etkinlik olmaması denenen türlerdeki usnik asit miktarının nispeten azlığından kaynaklı olabilir. Diğer farklılıklar ise konsantrasyon ve suş farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir.

Çobanoğlu ve arkadaşları (2010) [15] *Ramalina farinacea, Platismatia glauca, Evernia divaricata, Bryoria fuscescens* ve *Alectoria sarmentosa* liken türlerinin antibakteriyel etkinliklerini Gram (-) olan *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter* sp. ve *Escherichia coli* ATCC 11666 bakterileri üzerinde test etmişlerdir. Çözücü olarak kloroform ve aseton kullanmışlardır. Araştırılan liken türlerinin üç bakteri türü üzerinde de farklı seviyelerde etkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda test edilen liken türüyle aynı cinse mensup *Ramalina farinacea*'dan *P. aeruginosa*'ya karşı aseton özütünde, *E. coli*'ye karşı ise kloroform özütünde antibakteriyel etki elde etmişlerdir. Çalışmamızda ise aseton özütüyle bu iki Gram negatif bakteriye karşı da antibakteriyel etki görülememiştir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasındaki farklılık çözücülerin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir, çünkü farklı çözücüler liken içindeki farklı metabolitleri etkin hale getirebilmektedir. Aynı zamanda sonuçların farklılığı tür bazındaki farklılıktan, usnik asit miktarlarının farklı olmasından veya deneyin uygulanma metodundan ileri geliyor olabilir.

Shrestha ve arkadaşları (2013) [44]; *Ramalina menziesii* ve *Usnea lapponica* liken türlerinin antibakteriyel aktivitesini *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Escherchia coli* (ATCC 11229), *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853) ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* COL) üzerinde mikro kuyu difüzyon yöntemiyle test

etmişlerdir. Toz özütü elde etmek için çözücü olarak metanol ve aseton kullanmışlardır. Elde ettikleri özütü DMSO ile çözmüşlerdir. İki liken türünün de metanol ve aseton özütleri *E. coli* hariç diğer üç bakteriye karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Test sonuçları asetonla çıkarılan özütlerin metanolle çıkarılan özütlere kıyasla çok daha etkili olduğunu göstermiştir. Çalışma sonucu iki liken türünün de başlıca sekonder metabolit olarak usnik asit içerdiğini belirlemişlerdir. Çalışmamızda da özüt aseton çözücüsü kullanılarak çıkarılmıştır ve *S. aureus*'a karşı inhibe edici görülmüştür fakat *P. aeruginosa*'ya karşı etki görülmemiştir. Bu durum usnik asit miktarının bizim test ettiğimiz türlerde Gram negatif bakterilere etki edecek kadar yüksek miktarda olmadığını düşündürmektedir. *E. coli*'ye karşı iki çalışmada da antibakteriyel etki görülememiştir. *P. aeruginosa*'dan alınan sonuç farklılığı bakteri suşuna bağlı direnç farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir.

Kambar ve arkadaşları (2014) [18] *Ramalina conduplicans* Vain. liken türünün antimikrobiyal aktivitesini 15 bakteri ve 5 mantar türü üzerinde 3 farklı çözücü kullanarak test etmişlerdir. Çözücü olarak petroleum eter, etil asetat ve etanol kullanmışlardır. Antibakteriyel aktiviteyi belirlemede agar kuyu difüzyon yöntemini kullanmışlardır. Kuyulara koydukları 20 mg/ml oranındaki özütlerle *S. aureus* üzerinde en yüksek 20 mm inhibisyon zonu etil asetat özütüyle, *E. faecalis* üzerinde 22 mm etanol özütüyle, *P. aeruginosa* üzerinde 18 mm inhibisyon zonu etil asetat özütüyle ve *E. coli* üzerinde 13 mm petroleum özütüyle inhibisyon zonu elde etmişlerdir. *E. coli* üzerinde etil asetat özütüyle hiçbir inhibisyon zonu oluşmamıştır. Bu durum özüt çıkarmada kullanılan bazı çözücülerin belirli metabolitleri daha etkin şekilde çözdüğünü düşündürmektedir. Daha etkin şekilde çözünmüş olan metabolitin etki ettiği bakterilerin farklılığı muhtemelen buradan ileri gelmektedir. Çalışmamızda *S. aureus*' a karşı elde edilen en büyük inhibisyon zonu 13,6 mm, *E. faecalis*'e karşı elde edilen en büyük zon ise 13,3 mm'dir. Zon büyüklüklerindeki farklılıklar metodun farklı uygulanmasından veya suş direnç farklılıklarından ileri geliyor olabilir. Örneğin *E. coli'*ye karşı herhangi bir inhibe edici etki gözlemlenmemiş olan deneyimizde çözücü olan aseton değiştirilerek antibakteriyel etkinlik elde edilebileceği düşünülebilir.

Sundaraj ve arkadaşları (2015) [29] *Ramalina nervulosa* türünün antimikrobiyal aktivitesini 4 referans bakteri suşu ve 5 mantar üzerinde 3 farklı çözücü kullanarak disk difüzyon yöntemiyle test etmişlerdir. Çözücü olarak petrol eteri, etanol ve su

kullanmışlardır. Bakterilerden en duyarlı olanların *Bacillus subtilis* ve Proteus vulgaris olduğu belirlenmiştir. Özütlerin mantarları inhibe etmede daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* 'da su özütlerinde hiçbir aktivite gözlemlenemezken petroleum eter ve etanol özütlerinde düşük bir aktivite gözlemlenmiştir. Bu çalışmada da farklı çözücülerle *P. aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel etki elde edilmiş olması, etki mekanizmasının çözücüyle olan alakasına dikkat çekmektedir.

Ankith ve arkadaşları (2017) [83] *Ramalina* cinsine mensup 3 tür olan *R. hossei* Vain, *R. conduplicans* Vain ve *R. Pacifica*'nın metanol özütlerinin antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. *E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis* ve *B. cereus* bakterilerine agar kuyu difüzyon yöntemiyle bu likenlerin DMSO özütlerini uygulamışlardır. Kuyular 8mm çapında olup her bir kuyuya 100 µl özüt koyulmuştur. Liken özütlerine en yüksek duyarlılığı *B. cereus*, en düşük duyarlılığı ise *E. coli* göstermiştir. *P. aeruginosa*'da liken özütlerine karşı yüksek duyarlılık sergilemiştir. Referans antibiyotiğin *Ramalina* türlerinin etkinliğine kıyasla çok daha yüksek bir etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda özütler 6 mm çapındaki disklere emdirilmek suretiyle ve en fazla 80 µl olacak şekilde uygulanmıştır. *P. aeruginona* ve *E. coli*'de elde edilen sonuçların farklılığı uygulanan özüt miktarının farklı olmasından ileri geliyor olabilir. Çalışmamızda da elde edilen antibakteriyel etkinlik değerleri standart antibiyotiğe kıyasla daha düşüktür. Bu iki sonuç paralellik göstermektedir.

Zrnzević ve arkadaşları (2017) [84] *Ramalina capitata* 'nın aseton özütünün antibakteriyel aktivitesini iki Gram pozitif ve üç Gram negatif bakteriye karşı test etmişlerdir. Test edilen Gram pozitif bakteriler; *Bacillus spizizenii* ve *Staphylococcus aureus,* Gram negatif bakteriler ise; *Escherichia coli, , Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella abony*'dir. Disk difüzyon yöntemini kullanmışlardır. Her bir diskin çapı 12 mm olup emdirilen özüt konsantrasyonu 1 mg'dır. Analizler sonucu bu liken türüne ait aseton özütünün Gram pozitif bakterilere karşı yüksek antibakteriyel etkinliği olduğu, Gram negatif bakterilere karşı ise etkinliği olmadığı belirlenmiştir. Test edilen standart antibiyotiğin liken özütüne kıyasla daha yüksek bir etkinliği olduğu belirlenmiştir. *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı etkinlik gözlenemezken *S. aureus* üzerinde oluşan inhibisyon zonu çapı 19 mm'dir. Çalışmamızda disk çapları 6 mm olup emdirilen özüt konsantrasyonları 20 µl'de 0,18 mg, 40 µl'de 0,36 mg ve 80 µl'de 0,72 mg'dır.

Çalışmamızda da *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı etkinlik oluşmamış *S.aureus*'a karşı ise 13,6 mm'lik zon oluşmuştur. Zonlardaki büyüklük farkının disk büyüklüğü ve konsantrasyon farkından ileri geldiği düşünülebilir. Çalışmamızda da standart antibiyotiğin daha etkili çıkması iki çalışmanın paralel olduğunu ve bu iki türün benzer özellikte olduğunu göstermektedir.

Sesal ve arkadaşları (2016) [86] *Ramalina* cinsine mensup *R. canariensis, R. chondrina, R. fastigiata* ve *R. fraxinea* türlerinin metanol ve kloroform özütlerinin antimikrobiyal aktivitesini 2 Gram negatif (*P. aeruginosa* ve *E. coli*), 2 Gram pozitif bakteri (*E. faecalis* ve *S. aureus*) ve 1 maya (*C. albicans*) türüne karşı araştırmışlardır. Gram negatif bakteri türlerine karşı sadece *R. canariensis* ve *R. chondrina* türlerinin kloroform özütleri etkinlik gösterirken diğer iki türe ait özütlerde etkinlik ortaya çıkmamıştır. Aynı zamanda bu iki türün kloroform özütlerinin *E. coli* üzerinde standart antibiyotikten daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. *E. faecalis* üzerinde sadece *R. canariensis* ve *R. chondrina* türlerinin metanol özütleri hiçbir etkinlik göstermemiştir. Bu iki türe ait kloroform özütlerinin ve diğer iki türe ait hem kloroform hem metanol özütlerinin *E. faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis*'e karşı *R. fraxinea* türünün kloroform ve metanol özütlerinin standart antibiyotikten daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. *S. aureus* üzerinde 4 liken türüne ait bütün özütler belirli düzeylerde antimikrobiyal etkinlik göstermiştir fakat hiçbiri standart antibiyotikten daha etkili çıkmamıştır. Maya üzerinde ise en yüksek etki *R.canariensis*'in metanol özütünden elde edilmiştir. Elde edilen antimikrobiyal etki maya türüne karşı denenmiş standart antibiyotikten daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda Gram negatif bakterilere (*E. coli, P. aureginosa*) karşı inhibe edici bir etki elde edilememiş olup, Gram pozitif bakterilere (*E. faecalis, S. aureus*) karşı ise standart antibiyotikten daha düşük seviyede inhibe edici etki gözlemlenmiştir. Aynı cinse ait bu liken türleri arasındaki antimikrobiyal etkinlik farklılıkları türlerin sahip olduğu sekonder metabolitlerin veya bu metabolitlerin miktarlarının farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu farklılıklar ise sıcaklık, pH, kuraklık gibi abiyotik etmenlerden, coğrafi yayılıştan veya küresel ısınma gibi etmenlerin oluşturduğu çevresel koşullardan, karbon ve nitrojen kaynağının niteliğinden ve hava kirliliğinden ileri geliyor olabilir [87]. Aynı zamanda farklı çözücülerle hazırlanmış özütlerin aynı bakteri üzerinde farklı etki gösteriyor olması çözücülerin bazı sekonder metabolitleri daha etkin ortaya çıkarıyor

olabileceğine işaret etmektedir. Bu durumda *R.calicaris* türünün farklı çözücüler kullanılarak elde edilecek özütünün Gram negatif bakteriler üzerinde de etkili olabileceği veya Gram pozitif bakterilere karşı daha yüksek antibakteriyel etki gösterebileceği düşünülebilir.

Zrnzević ve arkadaşları (2017) [84] *Ramalina capitata* 'nın aseton özütünün antioksidan aktivitesini CUPRAC yöntemiyle test etmişlerdir. Yoğunluğu 15 mg/ml olan metanolde çözünmüş özütün toplam antioksidan kapasitesini troloks eşdeğeri cinsinden 6.1176 ± 0.2964 µg Troloks eşdeğerleri (TE) /mg (kuru ağırlık) bulmuşlardır. Çalışmamızda ise 9 mg/ml yoğunluğundaki *R. calicaris* (ALA) aseton özütü için elde edilen sonuç; 5.996 ± 0.122 µg Troloks eşdeğerleri (TE) /g (kuru ağırlık)' dır. İki çalışma arasındaki antioksidan etkinlik farkının tür farklılığından kaynaklanacağı gibi, özütlerin yoğunluk farkından da kaynaklanıyor olabileceği düşünülebilir. Zrnzević ve arkadaşları aynı makalelerinde kendi çalışmalarını Zlatanović ve ark tarafından 2017 de yapılmış güncel bir çalışmayla karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada *Umbilicaria crustulosa* likeninin aseton özütünün troloks eşdeğeri cinsinden tam antioksidan kapasitesi 19.7641 ± 0.0166 µg TE / mg bulunmuştur. Zrnzević ve ark. bu türün kendi çalışmış oldukları örnekten daha etkili olduğunu belirtmişlerdir, nitekim bizim çalışmamızda test ettiğimiz türden de daha etkilidir. Bu durum kullanılan çözücü ve yöntemin aynı olmasıyla tür bazındaki antioksidan etkinlik farklılığını ortaya koymaktadır.

Sundararaj ve arkadaşları (2015) [29] *Ramalina nervulosa* likeninin petrol eteri, su ve etanol çözücüleriyle elde edilmiş özütlerinin antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. Antioksidan aktiviteyi belirleyebilmek için DPPH, FRAP ve CUPRAC yöntemini kullanmışlardır. Özütlerin 100 µg/ml konsantrasyonda bakır iyonunun (Cu^{2+}) indirgeme ölçümlerinden etanol, petroleum eter ve su özütleri için sırasıyla % 62.49, % 33.4 ve % 44.49 sonuçlarını elde etmişlerdir. Aynı çalışmada özütün konsantrasyonu arttıkça indirgeme gücünün de arttığı belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında özüt elde etmede kullanılan çözücünün antioksidan etkinlik üzerinde büyük farklılıklara neden olduğu görülmektedir. Çözücü olarak bu çalışmada etkili çıkmış olan etanol kullanılarak ve özüt konsantrasyonu arttırılarak *R. calicaris* özütünden de daha yüksek bir antioksidan etkinlik elde edilebileceği düşünülebilir.

Paudel ve arkadaşları (2012) [64] Nepal'den topladıkları altı familyaya ait yirmidört liken türünün metanol özütlerinin antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. *Parmoterma*

sp., *Ramalina* sp., *Peltigera* sp. ve *Cladonia* sp.'nın özütlerinin ABTS+ (Troloks eşiti antioksidan kapasite yöntemi) yöntemiyle verdiği sonuçlar antioksidan aktivitelerinin askorbik asitten yüksek olduğunu göstermiştir. Bir başka çalışmada askorbik asidin $TEAC_{ABTS}$ değeri troloksun yaklaşık 0,87 katı olarak bulunmuştur [89]. Bu çalışmada yöntem farklılığı da göz önünde bulundurularak orantılama şeklinde karşılaştırma yapılmış ve *Ramalina* sp. türünden elde edilmiş sonuç neredeyse troloksun etkinliğine yakın bir değer göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise *R. calicaris* türüne ait özüt trolokstan bir hayli düşük bir antioksidan etkinlik göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular daha önce yayınlanmış çalışmalarla karşılaştırıldığında yüksek rakımlardan toplanan likenlerin daha güçlü antioksidan ve antibakteriyel bileşenler içerdiğini göstermiştir [64]. Dolayısıyla aynı cinse mensup likenlerin antioksidan etkinliklerinin tür bazında farklılık gösterebildiği gibi bu değer arasındaki farklılığın rakıma bağlı değişkenlik gösterebileceği de düşünülebilir.

Oran ve arkadaşları (2012) [63] içerisinde *Ramalina farinacea ve Ramalina fastigiata'*nın da bulunduğu 6 liken türünün aseton ve metanol özütlerinin toplam fenol ve antioksidan kapasitelerini araştırmışlardır. Ölçümler sonucunda en yüksek antioksidan aktivite değeri *R. fastigiata'*nın metanol özütünde çıkmıştır. *R. fastigiata'*nın metanol özütünün antioksidan aktivite değeri 154.3±0.2 mg troloks/10 g örnek iken *R. farinacea*'nın metanol özütünün antioksidan aktivite değeri 31.7±0.5 mg troloks/10 g örnek bulunmuştur. Aynı liken türlerinin aseton özütlerinin antioksidan aktivite değerleri ise sırasıyla; 123.9±0.3 mg troloks/10 g örnek ve 11.1±0.9 mg troloks/10 g örnek bulunmuştur. Çalışmamızda ise *R. calicaris* aseton özütü için bu değer 5.996 ± 0.122 µg Troloks eşdeğerleri (TE) /g örnek olarak bulunmuştur. Sonuçlar karşılaştırılmak üzere orantılandığında *R. fastigiata'*nın da, *R. farinacea*'nın da metanol ve aseton özütlerinin antioksidan etkinliği bizim özütümüzden yüksek çıkmıştır. Bu durum tür bazındaki farklılıkların ve çözücü farklılıklarının antioksidan aktivite üzerindeki etkisi olarak yorumlanabilir. Aynı liken türü üzerindeki çözücü değişiminden kaynaklanan antioksidan aktivite değeri farklılığı araştırıcılar tarafından likenlerin ürettiği sekonder metabolitler farklı kimyasal yapılarda olduğu için organik çözücülerdeki davranışları da değişiklik göstermektedir şeklinde yorumlanmıştır [63]. Örnek verilen çalışmadan elde edilen sonuçlardan hareketle araştırmış olduğumuz

R.calicaris türünün de metanol çözücüsünde daha yüksek bir antioksidan aktivite gösterebileceği düşünülebilir.

Stanly ve arkadaşları (2011) [31] Malezyadan topladıkları *Ramalina peruviana, Bulbothrix isidiza, Parmotrema tinctorum* ve *Cladia aggregata* likenlerinin aseton ve metanol özütlerini antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik açısından test etmişlerdir. En yüksek antioksidan aktivite sırasıyla *B. isidiza* ve *R. peruviana'* nın aseton özütlerinden elde edilmiştir. Elde edilen etkinlik değerinin standart bir antioksidan olan α-tocopherol'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bir başka çalışmada α-tocopherol'ün $TEAC_{CUPRAC}$ değerinin troloksun yaklaşık 1,2 katı olduğu tespit edilmiştir [89]. Bu çalışmada elde edilen antioksidan kapasite değeri bizim çalışmamızda elde edilen değerden yüksek çıkmış olup, bu farklılık tür bazındaki farklılıktan kaynaklanabileceği gibi, liken örneklerinin toplandığı lokasyonun rakım ve iklimsel özelliklerinden de kaynaklı olabileceği düşünülebilir.

Kumar ve arkadaşları (2009) [30] *Ramalina hossei* ve *Ramalina conduplicans* likenlerinin metanol özütlerinin antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. DPPH ve FRAP yöntemlerini kullanmışlardır. İki yöntemden elde ettikleri sonuçlar da konsantrasyona bağlı değişiklik gösteren seviyelerde antioksidan aktivite olduğunu göstermiştir. Fakat elde etmiş oldukları aktivite değeri test etmiş oldukları standart antioksidanlardan olan askorbik asit ve tannik asitten düşük çıkmıştır. Bizim çalışmamızda da standart antioksidandan düşük etkinlik elde edilmiş olup, elde edilen sonuçlar paralellik göstermektedir. Bu çalışmada konsantrasyona bağlı olarak etkinliğin arttığı görülmüş olup, çalışmamızda test etmiş olduğumuz özütün de konsantrasyonu arttırılarak uygulanması durumunda daha etkili olabileceği düşünülebilir.

BÖLÜM 4. SONUÇ

Literatür incelendiğinde birçok liken türünün biyolojik aktiviteleriyle ilgili çalışmalar bulunduğu, ancak *R. calicaris* türü üzerinde cinsin diğer türleri kadar araştırmaya rastlanılmadığı için çalışmamız bu türün antibakteriyel ve antioksidan özellikleri ile ilgili yeni veriler sağlamaktadır. Bu araştırmamız sonucunda *R. calicaris*'in aseton özütlerinin *S. aureus* ve *E. faecalis* Gram pozitif bakterileri üzerinde antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu ve aynı zamanda Cu(II)-neokuproin (Nc) reaktifini Cu (I)-Nc kelatına indirgeme özelliği göstermesi nedeniyle antioksidan etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonuçları, bu liken türünün Gram pozitif bakteriler üzerinde potansiyel bir antibakteriyel kaynağı ve doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanımının mümkün olduğunu göstermektedir. Karşılaştırma yaptığımız benzer çalışmaların sonuçları; bu liken türünden elde edilmiş olan antibakteriyel ve antioksidan etkinlik değerlerinin, alternatif yöntemlerin ve alternatif materyallerin kullanılacağı çalışmalarla arttırılmasının mümkün olduğuna işaret etmektedir. Genotipleme yöntemiyle uygun tür ve çözücü belirlenerek etkinliği maksimize etmek mümkündür. Ülkemizde doğal yetişen bir tür olarak bu liken üzerinde yapılabilecek daha kapsamlı kimyasal çalışmalar sayesinde, ilaç sektöründe kullanılabilecek bir kaynak olma potansiyelinin değerlendirilmesi gereklidir. Bu ve benzeri çalışmalardan elde edilen veriler, hem yaygın bir sorun haline gelmeye başlayan antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalara karşı mücadelede hem de doğala yönelim sonucu daha çok tercih edilmeye başlamış olan doğal antioksidan ilaçların elde edilmesinde likenlerden yararlanılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Çobanoğlu, G., Dilsizoğlu, A., Kavuncuoğlu, Z., & Oba, D. (2004). Eski ve yeni kullanım alanları, bilinmeyen yönleriyle likenler. *Tubitak Bilim ve Teknik Dergisi*, *439*, 86-89.

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

[3] Rankovic, B., Mısıc, M., Sukdolak, S. (2009). Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata, Parmelia caperata, Parmelia pertusa, Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Biologia, 64* (1): 53–58.

[4] Aydın, S., Kınalıoğlu, K. (2010). *P. Furfuracea* (L.) Zopf var. *Furfuracea* ve *Parmelina tiliaceae* (Hoffm.) Ach. Liken Ekstraktlarının Antimikrobial Aktivitesi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi, 1*(2): 30-38.

[5] Molnár, K., & Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *65*(3-4), 157-173.

[6] Yoshimura, I., Kinoshita, Y., Yamamoto, Y., Huneck, S., & Yamada, Y. (1994). Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. *Phytochemical Analysis*, *5*(4), 197-205.

[7] Şahin, S., Oran, S., Şahintürk, P., Demir, C., Öztürk, Ş. (2015). *Ramalina* Lichens and Their Major Metabolites as Possible Natural Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Journal of Food Biochemistry*, *39* (4): 471-477.

[8] Francolini, I., Norris, P., Piozzi, A., Donelli, G., & Stoodley, P. (2004). Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*(11), 4360-4365.

[9] Ingolfsdottir, K. (2002). Usnic acid. *Phytochemistry*, *61*(7), 729-736.

[10] Yilmaz, M., Türk, A. O., Tay, T., & Kivanç, M. (2003). The antimicrobial activity of extracts of the lichen Cladonia foliacea and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, *59*(3-4), 249-254.

[11] Garcia Rowe, J., Gimenez, G., & Saenz Rodriguez, M. T. (1999). Some lichen products have antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *54*(7-8), 605-609.

[12] Tay, T., Türk, A. Ö., Yılmaz, M., Türk, H., & Kıvanç, M. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen Ramalina farinacea and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *59*(5-6), 384-388.

[13] Cansaran, D. et al. (2007). HPLC analysis of usnic acid in some *Ramalina* species from anatolia and investigation of their antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 45, No. 1, pp. 77–81.

[14] Karagöz, A. et al. (2009). Antibacterial activity of some lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 3(12), pp. 1034-1039, December.

[15] Çobanoğlu, G. et al. (2010). Evaluation of the antimicrobial properties of some lichens. *South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment* Vol. 1, No. 2, pp. 153 – 158.

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

[17] Gulluce, M. et al. (2006). Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana. Phytomedicine* Volume 13, Issue 7, 10 July 2006, Pages 515–521.

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

[19] Ahmadjian, V. (1993). The Lichen Symbiosis. *New York:Wiley*;1-264.

[20]] Cansaran, D. (2008). Likenler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 65(1): 43-50.

[21] http://www.biyologlar.com/liken-biyocesitliligi-acisindan-uludagin-onemi Erişim tarihi: 20.11.2016.

[22] Yavuz, M., Özyiğitoğlu, G.(2015). Tıp Tarihinde Likenlerle İlgili Terimler. *Avrasya Terim Dergisi*, 3(1): 1-9.

[23] Gayathri, S., Swamy, CT. (2012). Lichens: a novel and potential source as antimicrobials for human use. *Journal of Phytology*, 4(1): 38-43 ISSN: 2075-6240.

[24] Henderson, D. M., & Prentice, H. T. (1969). Contributions to the bryophyte flora of Turkey. *VIII. Edinb Roy Bot Gard Notes*.

[25] Solak, S. (2016). Fatih ormanlarının (Şişli, İstanbul) likenleri (Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).

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

[27] http://dergipark.gov.tr/marupj/issue/17925/188478 Erişim tarihi: 20.11.2016.

[28] http://www.antioksidan.info/serbest-radikaller Erişim tarihi: 20.11.2016.

[29] Sundararaj, J. P., Kuppuraj, S., Ganesan, A., Ponnusamy, P., & Nayaka, S. (2015). In vitro assesssment of antioxidant and antimicrobial activities of different solvent extracts from lichen *Ramalina nervulosa*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(8), 200-204.

[30] Kumar, S. P., Kekuda, T. P., Vinayaka, K. S., & Sudharshan, S. J. (2009). Anthelmintic and antioxidant efficacy of two macrolichens of *Ramalinaceae*. *Pharmacognosy Journal*, *1*(4), 238-242.

[31] Stanly, C., Hag Ali, D. M., Keng, C. L., Boey, P. L., & Bhatt, A. (2011). Comparative evaluation of antioxidant activity and total phenolic content of selected lichen species from Malaysia. *J Pharm Res*, *4*, 2824.

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

[33] Gulluce, M., Aslan, A., Sokmen, M., Sahin, F., Adiguzel, A., Agar, G., & Sokmen, A. (2006). Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis, Platismatia glauca, Ramalina pollinaria, Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine*, *13*(7), 515-521.

[34] Nash, T. H. (1996). Lichen biology. *Cambridge University Press*.

[35] Özenoğlu, S., Aydoğdu, G., Dinçsoy, A. B., Taghidizaj, A. A., Derici, K., Yılmaz, E., ...& Cansaran-Duman, D. (2013). Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel BiyolojiİDergisi*.

[36] Molnar, K., & Farkas, E. Biological activities of secondary lichen metabolites.

[37] Aydın, S. (2012). Giresun ilinden toplanan *Flavoparmelia caperata* (L.) hale (*parmeliaceae*) ve *roccella phycopsis* ach.*(roccellacaea*) likenlerinin antibakteriyal ve antioksidan özelliklerinin araştırılması (Doctoral dissertation).

[38] Çakar, T. (2009). Likenlerin Karatepe Aslantaş Açık Hava Müzesi Bazaltik Kayaç Eserler Üzerindeki Ayrışmaya/Bozunmaya Etkisi (Yüksek Lisans Tezi).

[39] Ranković, B., & Mišić, M. (2008). The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens Cladonia furcata, Ochrolechia androgyna, Parmelia caperata and Parmelia conspresa. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *22*(4), 1013-1016.

[40] Cansaran, D., Kahya, D., Yurdakulol, E., & Atakol, O. (2006). Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of Anatolia and antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung* C, 61(11-12), 773-776.

[41] Yuan, C. H. A. O., Zhang, X. J., Du, Y. D., Guo, Y. H., Sun, L. Y., Ren, Q., & Zhao, Z. T. (2010). Antibacterial compounds and other constituents of Evernia divaricata (L.) Ach. *J Chem Soc Pak*, 32(2), 189-193.

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

[43] Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, J. S., Hong, S. G., Shin, H. W., & Yim, J. H. (2008). Antibacterial potential of Antarctic lichens against human pathogenic Gram-positive bacteria. *Phytotherapy Research*, 22(9), 1269-1271.

[44] Shrestha, G., & St Clair, L. L. (2013). Antimicrobial activity of extracts from two lichens *Ramalina menziesii* and *Usnea lapponica*. *Bulletin of the California Lichen Society*, 20(1), 5-10.

[45] Tanas, S. (2007). Deneysel olarak enflamasyon oluşturulan ratlarda *Peltigera rufescens* (Weis) Humb. isimli likenden elde edilen metanol ekstrelerinin antioksidant enzim aktiviteleri üzerine etkisi. (Yüksek lisans tezi)

[46] Mutlu, S. (2008). Bazı liken türlerinden elde edilen su, etanol ve aseton ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. (Yüksek lisans tezi)

[47] Mercan,U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,* 15(1), 91-96.

[48] Erenel, G., Erbaş, D., & Arıcıoğlu, A. (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi medical journal*, 3(4).

[49] http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf Erişim tarihi: 15.12.2016.

[50] Baddal, M. (2010). *Origanum minutiflorum* bitkisinin antioksidan özelliklerinin incelenmesi. (Yüksek lisans tezi)

[51] Genestra, M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling*, 19(9), 1807-1819.

[52] Burçak, G., & Andican, G. (2004). Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, *35*(4).

[53] Rhee, M. H., Park, H. J., & Cho, J. Y. (2009). Salicornia herbacea: Botanical, chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(8), 548-555.

[54] Işık, M. (2012). *Helichrysum plicatum* DC. ve *Phlomis pungens* L. bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin mukayesesi. (Yüksek lisans tezi)

[55] Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., & Durmaz, Y. (2006). Algal Antioksidanlar. *Su Ürünleri Dergisi*, 23(1).

[56] Velioğlu, S. (2000). Doğal antioksidanların insan sağlığına etkileri. *Gıda/The Journal Of Food*, 25(3).

[57] Albayrak, S., Sağdıç, O., & Aksoy, A. (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(4), 401-409.

[58] Sarıçam, A. (2014). Üzüm çekirdeği ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi. (Yüksek lisans tezi)

[59] Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, *239*(1), 70-76.

[60] Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ. (2013). Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Ürünler. *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi D*ergisi, 13 (1): 48-59.

[61] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.

[62] Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K., & Yamane, Y. (2004). Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(8), 2391-2396.

[63] Oran, S., Şahin, S., Öztürk, Ş., Demir, C. (2012). Bazı dalsı ve yapraksı liken türlerinde toplam fenol ve antioksidan kapasite tayini. *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 03–07 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.

[64] Paudel, B., Datta Bhattarai, H., Prasad Pandey, D., Seoun Hur, J., Gyu Hong, S., Kim, I. C., & Han Yim, J. (2012). Antioxidant, antibacterial activity and brine shrimp toxicity test of some mountainous lichens from Nepal. *Biological research*, 45(4), 387-391.

[65] Yavuz, M. (2016). Bazı Liken Cins (Genus) İsimlerinin Etimolojisi Üzerine.

[66] Açıkgöz, B., Çobanoğlu, G., Bakir, Y., Sesal, C. (2011). Ramalina cinsine ait bazı liken türlerinin rDNA ITS dizi analizine göre moleküler filogenisi. (Yüksek lisans tezi).

[67] Bannister, P., Bannister, J. M., & Blanchon, D. J. (2004). Distribution, habitat, and relation to climatic factors of the lichen genus Ramalina in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 42(1), 121-138.

[68] http://lichenportal.org/portal/taxa/index.php?taxon=52119 Erişim tarihi: 18.12.2016.

[69]http://www.lichens.uni-hamburg.de/lichens_descriptions/ramalina/ramalina_calicaris.htm Erişim tarihi: 18.12.2016.

[70] Ryan, KJ., Ray, CG., (2010). Sherris medical microbiology. (5th ed.) *McGraw Hill.*

[71] Gül, M., Şensoy, A., Çetin, B., Korkmaz, F., & Seber, E. (2004). Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığın E-test ve disk diffüzyon yöntemleri ile araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 34(1), 33-6.

[72] Cooper, M., Tavankar, G. R., & Williams, H. D. (2003). Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology*, 149(5), 1275-1284.

[73] Şermet, M.Ö., (2015). Antioxidant, antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Pistacia vera* L. skin. (Yüksek lisans tezi).

[74] Vogt, R. L., & Dippold, L. (2005). *Escherichia coli* O157: H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June-July 2002. *Public health reports*, 120(2), 174.

[75] Halkman AK. (2013). Gıda Mikrobiyolojisi II ders notları. Ank. Üniv. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü.

[76] Ayhan, T. (2012). Dört farklı kök kanalı irrigasyon yönteminin *E.faecalis* ile enfekte edilen kök kanallarındaki antibakteriyal etkinliklerinin in-vitro karşılaştırılması. (Doktora tezi).

[77] Tollu, G. (2015). İdrar ve gaita örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının biyotiplendirilmesi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. (Yüksek lisans tezi).

[78] Barut, B. (2011). Antioxidant capacities of selected fruits and herbal teas consumed in regular diet and their antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus.* (Yüksek lisans tezi).

[79] Şirin, N. (2015). *Ramalina farinacea* (L.) Ach. ve *Usnea intermedia* (A.Massal.) Jatta likenlerinin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine araştırmalar. (Yüksek lisans tezi).

[80] Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, *48*(suppl 1), 5-16.

[81] http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Antibiyotik%20Duyarl%C4%B1l%C4%B1k%20Testi.pdf Erişim tarihi: 21.12.2016.

[82] Özer, E. (2012). Nane (*Mentha piperita* L.)'nin Farklı Kısımlarına Uygulanan Farklı Kurutma Tekniklerinin Uçucu Yağın Bileşimine Ve Antimikrobiyel Aktivitesi Üzerine Etkisi. (Yüksek lisans tezi).

[83] Ankith, G. N., Kekuda, P. T., Rajesh, M. R., Karthik, K. N., Avinash, H. C., & Vinayaka, K. S. (2017). Antibacterial and antifungal activity of three *Ramalina* species. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 7(5), 27-32.

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

[85] Özyiğitoğlu, G. (2017). New Proposals for The Turkish Lichen Terminology. *Avrasya Terim Dergisi*, *5*(2), 14-18.

[86] Sesal, C., Çobanoğlu, G., Karaltı, İ., Açıkgöz, B. (2016). In Vitro antimicrobial potentials of four *Ramalina* lichen species from Turkey. *Current Research in Environmental & Applied Mycology6(3), 202–209, Doi 10.5943/cream/6/3/8.*

[87] Öztiğitoğlu, G. Ç., Açıkgöz, B., & Sesal, C. (2017). Lichen secondary metabolites: Synthesis pathways and biological activities. *Acta Biologica Turcica*, *29*(4), 150-163.

[88] Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Celik, S. E., Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*, *3*(11), 2439-2453.

[89] Yavaşer, R. (2011). Doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).

[90] http://web.uvic.ca/~stucraw/part2NX.html#Lichens_N-X Erişim tarihi: 08.02.2018.

[91] Crawford S.D. (2015). Lichens Used in Traditional Medicine. Chapter 2. In: Lichen Secondary Metabolites- Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential (Edited by Rankovic B.). *Springer International Publishing*, Switzerland. ISBN 978-3-319-13373-7

[92] Moura, J. B., Vargas, A. C. D., Gouveia, G. V., Gouveia, J. J. D. S., Ramos-Júnior, J. C., Botton, S. D. A., ... & Costa, M. M. D. (2017). In vitro antimicrobial activity of the organic extract of *Cladonia substellata* Vainio and usnic acid against *Staphylococcus* spp. obtained from cats and dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(4), 368-378.

[93] Moreira, A. S. N., Braz-Filho, R., Mussi-Dias, V., & Vieira, I. J. C. (2015). Chemistry and biological activity of Ramalina lichenized fungi. *Molecules*, 20(5), 8952-8987.

[94] Mittal, O.P.; Neelakantan, S.; Seshaadri, T.R. Chemical investigation of Indian lichens. XIV. Chemical components of Ramalina calicaris and Ramalina sinensis. *J. Sci. Ind. Res*. India 1952, 11B, 386–387.

[95] Asahina, Y.; Shibata, S. Chemistry of Lichen Substances, A; Asher & Co. Ltd: Vaals–Amsterdam, The Netherlands, 1971.

[96] Huneck, S.; Yoshimura, I. Identification of Lichen Substances; *Springer-Verlag*: Berlin, Germany, 1996.

[97] Solberg, Y.J. Dyeing of wool with lichens and lichen substances. *Acta Chem. Scand*. 1956, 10, 1116–1123.

[98] Asahina, Y.; Fukuziro, F. Lichen substances.III. Constitution of obtusatic acid. *Ber. Dtsch. Chem. Ges*. B 1932, 65B, 580–583.

[99] Mateos, J.L.; Legaz, M.E. Presence and Identification of Polyamines and their Conjugation to Phenolics in Some Epiphytic Lichens. *Eukaryotism and Symbiosis*; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 1997; pp. 491–498.

[100] Hanuš, L. O., Temina, M., & Dembitsky, V. M. (2008). Antibacterial and antifungal activities of some phenolic metabolites isolated from the lichenized ascomycete Ramalina lacera. *Nat Prod Commun*, 3, 233-236.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Ankara'da doğdu. İlköğretimini 1996-2001 yılları arasında Gökçe Karataş İlköğretim Okulu'nda, ortaöğretimini 2001-2004 yılları arasında Kemal Hasoğlu İlköğretim Okulu'nda ve lise eğitimini 2004-2008 yılları arasında Adnan Menderes Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini 2008-2013 yılları arasında Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamladı. 2013 senesinde Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ana bilim dalında lisans üstü eğitimine başladı. 2014-2016 yılları arası Acıbadem Hastanesi Labmed bünyesinde laboratuvar teknisyeni olarak görev yaptı. 2016 yılında Türk Hava Yolları'nda kabin memuru olarak göreve başladı ve halen bu görevini devam ettirmektedir.