

***Mnium marginatum* Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivitesi**

***Dilşad ONBAŞILI¹, Ergin Murat ALTUNER², Gökçen YUVALI ÇELİK¹**

¹Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji ABD, Kayseri

²Kastamonu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kastamonu

*Sorumlu yazar: odilsad@gmail.com

Geliş Tarihi:15.09.2011

Özet

Bu çalışmada *Mnium marginatum* özütlerinin antimikrobiyal etkilerinin gözlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 4 farklı çözücü (aseton, kloroform, metanol ve steril distile su (sdH₂O)) kullanılarak özütler elde edilmiş ve antimikrobiyal etkileri için, bazı gram pozitif bakteriler (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213), gram negatif bakteriler (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076) ve maya kültürleri (*Candida glabrata* RSKK 04019, *Candida albicans* ATCC 90028), disk difüzyon metodu kullanılarak denenmiştir. Disk difüzyon metodu ile elde edilen sonuçlarda; *M. marginatum*'un kloroform ekstraktı, diğer ekstraktlarla karşılaştırıldığında *E. coli* ATCC 25922 (15 mm) üzerine yüksek bir antimikrobiyal etki gösterirken; en düşük inhibisyon etkiyi ise *C. glabrata* RSKK 04019 (6 mm) üzerine kloroform ve sdH₂O ekstraktları göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Mnium marginatum*, antimikrobiyal aktivite, disk difüzyon metodu

Antimicrobial Activity of *Mnium marginatum* Extracts

Abstract

The aim of this study is to observe the antimicrobial activity of *Mnium marginatum* extracts. In this study, 4 different solvents (acetone, chloroform, methanol and sterile distilled water (sdH₂O)) were used for the extraction and the antimicrobial activity of the extracts were tested by disc diffusion method against some gram positive bacteria (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213), gram negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076) and yeasts (*Candida glabrata* RSKK 04019, *Candida albicans* ATCC 90028). According to the disc diffusion test results, the antimicrobial activity of chloroform extract of *M. marginatum* against *E. coli* ATCC 25922 (15 mm) was the highest when compared to others, where the lowest activity was the chloroform and sdH₂O extracts against *C. glabrata* RSKK 04019 (6 mm).

Keywords : *Mnium marginatum*, antimicrobial activity, disc diffusion method

Giriş

Bryofitler bilinen en eski kara bitkileridir (Zinsmeister ve Mues, 1987). Bryofitlerin bir üyesi olan karayosunları yüzyıllar önce tedavi amaçlı kullanılmıştır. Örneğin; *Philonotis*, *Bryum*, *Mnium* cinslerine ait türler ezilerek bir çeşit macun hâline getirilmiş ve yaraların üzerine merhem olarak sürülmüştür (Glime, 2007). Hastalıkların tedavisi için, yeni etken maddelerin keşfi amacıyla bilim adamları bitkilerin antimikrobiyal, antitümoral gibi tıbbi kullanım alanlarını araştırmışlardır (Rajakaruna ve ark., 2002). Bir çok bryofitin bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Basile ve ark., 1998a, b; 1999; Frahm ve Kirchoff, 2002;

Subhisha ve Subramoniam, 2005; Ilhan ve ark., 2006; Sabovljevic ve ark., 2006; Bodade ve ark., 2008; Dülger ve ark., 2009). Hemen hemen tüm bryofit türleri böcek larvaları, mantar, bakteri, salyangoz ve memelilerden zarar görmezler (Asakwa, 2001). Çünkü bryofitlerdeki oligosakkaritler, polisakkaritler, şeker alkoller, amino asitler, yağ asitleri, alifatik bileşikler, fenilkinon gibi biyolojik bileşikler ve aromatik ve fenolik maddeler, bu organizmalara karşı onları korumaktadır (Asakawa, 1990, 2000). Bu yüzden bryofitler, tıbbi kullanım için potansiyele sahiptir.

Yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere, bakteri ve mantarların sürekli olarak direnç kazandığı göz önüne alınırsa, yeni antibiyotik

maddelerin araştırılması ve keşfinin önemi de belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır (Erdoğan, 2002).

Bu çalışmada; *Mnium marginatum* özütlerinin bazı patojen test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitelerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmamızda kullanılan *Mnium marginatum*'un teşhisi Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde, Kerem Canlı tarafından yapılmıştır.

Test Mikroorganizmaları

Çalışmada kullanılan mikroorganizma kültürleri Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Araştırmada *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 35218, *S.aereus* ATCC 29213 bakteri, *Candida glabrata* RSKK 04019 ve *Candida albicans* ATCC 90028 maya kültürleri kullanılmıştır.

Ekstraksiyon

Ekstraksiyon öncesinde karayosunu örneklerini topraktan arındırmak için steril distile su (sdH₂O) ile iyice yıkanmıştır. Örneklerden ekstraksiyonu kolaylaştırmak için sıvı azot kullanılmış ve örnekler toz hâline getirilmiştir. Ekstraksiyon için 50 mg karayosunu tozu, 2 mL çözücü içinde bekletilmiştir. Çözücü olarak aseton (MERCK), kloroform (MERCK), metanol (MERCK) ve steril distile su (sdH₂O) kullanılmıştır.

Çözücüler içinde 1 saat bekletilen örnekler deneylerde kullanılmıştır.

Yöntem

Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde Disk Difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Hazırlanan özütler mikropipet ile 6 mm çapındaki steril disklerle 20 µl hacimlerde emdirilmiştir. Bakteriler için Mueller Hinton Agar (MERCK), mayalar

için Malt Extract Agar (DIFCO) besi ortamları kullanılmıştır.

Denemede kullanılacak olan bakteri kültürlerini tazelemek için Nutrient Broth (MERCK), maya kültürleri için Malt Extract Broth (DIFCO) kullanılmıştır. Stok kültürlerden alınan bakteri suşları ayrı ayrı 4-5 ml buyyonda süspanse edilerek, 2-5 saat, 37°C' lik etüvde inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Bu süre sonunda bakteri süspanasyonu MacFarland 0.5 yoğunluğuna steril serum fizyolojik ile hazırlandıktan sonra ekim yapılmıştır. Bakteri süspaniyonuna steril eküvyon daldırılarak karıştırılmıştır. Bu eküvyonla plağa yaygın inokulasyon yapılmıştır. Mueller Hinton Agar ve Malt Extract Agara bakteri ve maya suşlarından 24 saatlik buyyondaki kültürü %1 oranında aşılansak iyice çalkalandıktan sonra steril petri kutularına steril pipetlerle 15'er ml dağıtılmış ve besiyerinin homojen şekilde petri kutusu içinde dağılması sağlanmıştır. Tüm petri plakları bundan sonra 5-15 dakika süre ile oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Süre sonunda petrilerin içlerine aseptik koşullarda farklı özütler emdirilmiş diskler yerleştirilmiştir. Bakterilerin inokule edildiği plaklar 37°C'de 48 saat, mayaların inokule edildiği plaklar ise 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür (Collins ve Lyne, 1987; Dülger ve ark., 1999).

Bulgular

Mnium marginatum' un farklı ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmanın bulguları Tablo 1'de verilmiştir. Bulgularımıza göre; *M. marginatum*' un antimikrobiyal aktivitesinin, çözücülere ve çalışılan test mikroorganizmalarına göre değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktlar, genellikle çalışmada kullanılan gram negatif bakteriler üzerine yüksek inhibisyon etki gösterirken, gram pozitif bakteriler ve mayalar üzerine daha düşük inhibisyon etki göstermiştir.

Tablo 1. Disk difüzyon test sonuçları
(inhibisyon zon çapları mm)

SUŞLAR	<i>Mnium marginatum</i> ekstraktları			
	Aseton	Kloroform	Metanol	sdH ₂ O
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	11±1	8±2	7±1	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	10±0	10±2	8±1	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10±0	15±2	12±2	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218	12±1	14±1	12±2	-
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	11±0	12±1	10±1	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	9±0	11±1	10±0	-
<i>C. glabrata</i> RSKK 04019	-	8±1	8±1	6±2
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	-	8±1	10±0	8±1

‘-’:Herhangi bir etki gözlenmemiştir.

M. marginatum ekstraktlarından kloroform ekstraktı, *E. coli* ATCC 25922 (15 mm) üzerine diğer ekstraktlarla karşılaştırıldığında yüksek bir antimikrobiyal etki gösterirken; en düşük inhibisyon etkiyi *C. glabrata* RSKK 04019 (6 mm) üzerine sdH₂O ekstraktları göstermiştir.

M. marginatum ekstraktlarından sdH₂O ekstraktının, *C. glabrata* RSKK 04019 ve *C. albicans* ATCC 90028 hariç diğer test mikroorganizmalarına karşı herhangi bir inhibisyon etki göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca *M. marginatum* ekstraktlarından aseton ekstraktının, *C. glabrata* RSKK 04019 ve *C. albicans* ATCC 90028 üzerine herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Bryofitlerin antimikrobiyal aktivitelerini saptamak amacıyla yapılan araştırmalarda değişik çözücülerde hazırlanan ekstraktların değişik test mikroorganizmalarına karşı farklı

tipte antagonistik etki oluşturdukları bildirilmektedir (İlhan ve ark., 2006; Bodade ve ark., 2008; Altuner ve Çetin, 2009; Altuner ve ark., 2010; Elibol ve ark., 2011).

Antimikrobiyal aktivite araştırmalarında çok çeşitli test yöntemlerinin ve test mikroorganizmalarının kullanılmakta olduğu, bu yöntemler arasında ise en uygun ve güvenilir olanının Disk Difüzyon Metodu olduğu bildirilmektedir (Benedict ve Brady, 1972; Alsheik ve Trappe, 1983). Çalışmada *M. marginatum*' un 4 farklı çözücü (Aseton, Kloroform, Metanol ve sdH₂O) ile hazırlanan ekstraktlarının çeşitli test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkileri disk difüzyon test yöntemine göre araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; bu dört çözücünden, kloroform antimikrobiyal maddelerin ekstrakte edilmesi bakımından en etkili çözücü olmuştur.

Çalışma sonuçları Altuner ve Çetin (2009) ve Altuner ve ark. (2010) da farklı çözücüler kullanılarak elde ettikleri bulgularla benzerlik göstermektedir.

M. marginatum' un kloroform özütü, *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* ATCC 35218 'a karşı diğer test mikroorganizmaları ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir etki göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma, bulaşıcı hastalıklara karşı seçici ajanlar olarak hizmet eden yeni antibiyotiklerin keşfine yardımcı olabilecektir. Karayosunlarının da dâhil olduğu Bryofitler, antimikrobiyal ajanların iyi ve yeni bir kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır ve onların antimikrobiyal özellikleri bakımından taranması ve tanımlanması, tıp, eczacılık gibi alanlarda kullanımlarının araştırılması onlardan gerektiği kadar yararlanmamızı mümkün kılacaktır.

Kaynaklar

Alsheik AM., Trappe JM. 1983. Desert Truffles: The Genus *Tirmania*. Transactions of The British Mycological Society, 81: 83-90.

Altuner EM., Çetin B. 2009. Antimicrobial Activity of *Thuidium delicatulum* (Bryopsida) Extracts. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2 (2): 85-92.

Altuner EM., Çetin B., Çökmüş C. 2010. *Tortella tortulosa* (Hedw.) Limpr. Özütlelerinin Antimikrobiyal Aktivitesi. Kastamonu

Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 10 (2): 111-116.

Asakawa Y. 1990. Biologically active substances from bryophytes. In: Chopra RN, Bhatla SC (Eds.). *Bryophytes Development: Physiology and Biochemistry*. CRC Press, Boca Raton, pp. 259-287.

Asakawa Y., Toyota M., Tori M., Hashimoto T. 2000. Chemical structures of macrocyclic bis(bibenzyls) isolated from liverworts (Hepaticae). *Spectroscopy*, 14: 149-175.

Asakawa Y. 2001. Recent advances in phytochemistry of bryophytes: acetogenins, terpenoids and bis(bibenzyl)s from selected Japanese, Taiwanese, New Zealand, Argentinean and European liverworts. *Phytochemistry*, 56: 297-312.

Basile A., Sorbo S., Giordano S., Lavitola A., Castaldo Cobiانchi R. 1998a. Antibacterial activity in *Pleurochaete squarrosa* extract (Bryophyta). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 10: 169-172.

Basile A., Vuotto ML., Ielpo MTL., Moscatiello V., Ricciardi L., Giordano S., Castaldo Cobiانchi R. 1998b. Antibacterial Activity in *Rhynchostegium riparioides* (Hedw.) Card. Extract (Bryophyta). *Phytotherapy Research* 12: 146-148.

Basile A., Giordano S., López SJA., Cobiانchi RC. 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*, 52: 1479-1482.

Benedict RG., Brady LR. 1972. Antimicrobial Activity of Mushroom Metabolites, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61 (11): 1820- 1821.

Bodade RG., Borkar PS., Saiful Arfeen MD., Khobragade CN. 2008. In vitro Screening of bryophytes for antimicrobial activity *Journal of Medicinal Plants*, 7(4): 23-28.

Collins, CM., Lyne, PM. 1987. *Microbiological Methods*. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd., London.

Dülger B., Şen F., Gücin F. 1999. *Russula delica* Fr. Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktivitesi. *Turkish Journal Of Biology* 23: 127-133.

Dülger B., Hacıoglu N., Uyar G. 2009. Evaluation of Antimicrobial Activity of Some Mosses From Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 21(5): 4093-4096.

Elibol B., Ezer T., Kara R., Yuvalı C., Colak E. 2011. Antifungal and antibacterial effects of some acrocarpic mosses. *African Journal of Biotechnology*, 10(6): 986-989.

Erdogruđ ÖT. 2002. Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Used in Folk Medicine. *Pharmaceutical Biology*, 40:4, 269-273.

Frahm JP., Kirchoff K. 2002. Antifeeding effects of bryophyte extracts from *Neckera crispa* and *Porella obtusata* against slug *Arion lusitanicus*. *Cryptogamie Bryologie*. 23: 271-275.

Glime JM. 2007. *Bryophyte Ecology*. Volume 1. Physiological. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International association of Bryologists. <http://www.bryoecol.mtu.edu/>.

Ihan S., Savaroglu F., Colak F., Filik Iscen C., Erdemgil FZ. 2006. Antimicrobial Activity of *Palustriella commutata* (Hedw.) Ochyra Extracts (Bryophyta). *Turkish Journal of Biology*, 30: 149-152.

Rajakaruna N., Harris Cs., Towers, GHN. 2002. Antimicrobial Activity of Plants Collected from Serpentine Outcrops in Sri Lanka. *Pharmaceutical Biology*, 40:3, 235-244.

Sabovljevic A., Sokovic M., Sabovljevic M., Grubisic D. 2006. Antimicrobial activity of *Bryum argenteum*. *Fitoterapia*, 77: 144-145.

Subhisha S., Subramoniam A. 2005. Antifungal activities of a steroid from *Pallavicinia lyellii*, a liverwort. *Indian Journal of Pharmacology*, 37(5): 304-308.