

Bazı Deniz Alglerinin (*Phaeophyta*, *Rhodophyta*) Antifungal Aktiviteleri Üzerine Bir Araştırma

*Alev Haliki¹, A. Akın Denizci², Vildan Çetingül¹

¹Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bornova, İzmir, Türkiye
²TÜBİTAK, MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Gebze, Türkiye
*E mail: alev.haliki@ege.edu.tr

Abstract: An investigation on antifungal activities of some marine algae (*Phaeophyta*, *Rhodophyta*). In this study, 9 taxa, belonging to Phaeophyta and Rhodophyta (*Cystoceira barbata* (Good and Woodw.) C.Ag., *Cystoceira compressa* (Esper) Gerloff et Nizamuddin, *Halopteris scoparia* (L.) Sauv., *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lam., *Dictyopteris membranaceae* (Stackh.) Batters, *Colpomenia sinuosa* (Mert Ex Roth) Derb et Sol. In Castagne, *Acanthophora najadiformis* (Delile) Papenfuss, *Laurencia papillosa* (Forssk.)Grev and *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lam.) were collected FROM Foça and Karaburun coasts of bay of İzmir; toluen-methanol (1:3) extracts of these taxa were detected against to 7 test microfungi such as *Candida albicans* ATCC 10239, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Penicillium funiculosum* Thom, *Trichoderma viride* Pers ex Grey, *Rhizopus arrhizus* Fischer for their in vitro antifungal activities. As a result of our investigation, no significant activities were found among to taxa.

Key Words: Phaeophyta, Rhodophyta, antifungal activities.

Özet: Bu çalışmada, İzmir Körfezi'nin Foça ve Karaburun kıyılarından toplanan Phaeophyta ve Rhodophyta'ya ait 9 taksonun (*Cystoceira barbata* (Good and Woodw.) C.Ag., *Cystoceira compressa* (Esper) Gerloff et Nizamuddin, *Halopteris scoparia* (L.) Sauv., *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lam., *Dictyopteris membranaceae* (Stackh.) Batters, *Colpomenia sinuosa* (Mert Ex Roth) Derb et Sol. In Castagne, *Acanthophora najadiformis* (Delile) Papenfuss, *Laurencia papillosa* (Forssk.)Grev ve *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lam.)in vitro antifungal aktivitelerinin saptanması için toluen-metanol (1:3) ekstraktları *Candida albicans* ATCC 10239, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Penicillium funiculosum* Thom, *Trichoderma viride* Pers ex Grey, *Rhizopus arrhizus* Fischer gibi 7 test mikrofungusuna karşı denenmiştir. Sonuç olarak denemeye alınan taksonlar arasında kayda değer bir antifungal aktiviteye rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Phaeophyta, Rhodophyta, antifungal aktivite.

Giriş

Ülkemizin karasularında yayılmış alglerle ilgili çalışmaların büyük bir çoğunluğu, genellikle Ege denizi, Akdeniz ve Marmara denizinin ekonomik değeri olan alg topluluklarının tanımlanmaları ve dağılımları gibi ekolojik çalışmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (Güner ve Aysel, 1979; Sukatar, 1983; Aysel ve diğ., 1984; Güner ve diğ., 1984; Aysel ve diğ., 1986; Güner ve diğ., 1987; Aysel ve diğ., 1987; Sukatar ve diğ., 1987). Deniz alglerinden, bazı kırmızı (*Rhodophyta*) ve kahverengi alg (*Phaeophyta*) türlerinin çok çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır. Bunlar toplanmak veya kültürü yapılmak suretiyle doğrudan kendileri yiyecek maddesi olarak kullanılabilirler gibi ekili alanlarda gübre olarak da kullanılabilir; ayrıca çeşitli ürünleri de gıda endüstrisi, boya sanayii, tekstil sanayii, Kauçuk sanayii, kağıt sanayii, inşaat sektörü, zararlılarla mücadele, kozmetik sanayii, diş hekimliği kalıplarının yapımı, ilaç sanayii, alkol sanayii ve tıpta yararlanılmaktadır. Ülkemizde de bazı çalışmalar alglerin kimyasal içeriklerinin, farmakolojik ve mikrobiyolojik yönden önemlerinin belirtilmesine yönelik olarak yapılmıştır.

Deniz alglerinin proteinler, aminoasitler, vitaminler ve çeşitli mineral maddeler yönünden zengin olduğu ayrıca

polisakkaridler, lipidler, lipoidler ve sterinler içerdiği, bu nedenle de kullanım alanlarının çok geniş olduğu bilinmektedir. Yine bazı alglerin eterik yağlarının ve bromlu bileşiklerinin antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiş; birkaç algin de protein fraksiyonlarının antikoagülant, antilipolitik, antitümöral ve antiülseratif etkinlikleri saptanmıştır (Güven ve diğ., 1987; Aysel ve diğ., 1992; Çetingül ve diğ., 1994; Haliki ve diğ., 1998). Son zamanlarda, antimikrobiyal aktiviteye sahip doğal ürünler kullanılması giderek daha çok önem kazandığından başta özellikle geniş okyanus kıyıları bulunan Sri-Lanka, Hindistan, Çin, Arjantin ve ABD gibi ülkelerin yanı sıra Fransa ve İtalya gibi Akdeniz ülkelerinde de ilgili konularda bir kısım araştırmalar yapılmaktadır (Shaw, 1974; Sachithanathan, 1975; Caccamese ve Azzolina, 1979; Biard et al., 1980; Espeche et al., 1984; Ma Jing Wen ve Tan Wei-Ci, 1984; Pesando et al., 1984; Usmanghani et al., 1984; Caccamese et al., 1985; Perez et al., 1990). Türkiye üç tarafı dört denizle çevrili ve geniş bir alg florasına sahip bir ülke olduğundan kıyılarımızda bulunan alglerin antimikrobiyal aktiviteleri yönünden de araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada İzmir körfezi kıyılarından toplanan ve antibakteriyel etkinlikleri araştırılan (Haliki ve diğ., 1998) alglerin antifungal etkinliklerinin bulunup bulunmadığı araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

İzmir Körfezi'nin Foça ve Karaburun kıyılarından sonbahar mevsiminde supralittoral ve infralittoral zonlardan toplanan 9 taksondan taksonun *Cystoseira barbata* (Good and Woodw.) C.Ag., *Cystoseira compressa* (Esper) Gerloff et Nizamuddin, *Halopteris scoparia* (L.) Sauv., *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lam., *Dictyopteris membranaceae* (Stackh.) Batters, *Colpomenia sinuosa* (Mert Ex Roth) Derb et Sol. In Castagne Phaeophyta divisiosuna; *Acanthophora najadiformis* (Delile) Papenfuss, *Laurencia papillosa* (Forssk.)Grev ve *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lam. ise Rhodophyta divisiosuna ait türlerdir.

Alg ekstraktlarının hazırlanması için önce normal su ile daha sonra distile su ile yıkanan türler havada kurutulduktan sonra her birinden 50 gr tartılarak Waring-Blender içinde 100 ml toluen: metanol (1:3) karışımı içinde 10 dakika homojenize edilmiştir.

Çözünmeyen kısımların uzaklaştırılması amacıyla 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek elde edilen alg ekstraktları buzdolabında +4°C'de korunmuştur (Caccamese ve Azzolina, 1979; Biard *et al.*, 1980; Espeche *et al.*, 1984; Ma Jing Wen ve Tan Wei-Ci, 1984).

Antifungal etkinliklerinin saptanması amacıyla seçilen *Candida albicans* ATCC 10239, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Aspergillus fumigatus* *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus arrhizus* 7 test mikrofungusunun Sabouraud Maltoz Agar besiyerinde inkübasyon sıcaklıkları dermatofitler için 37°C, diğer küfler ve mayalar için 27°C olmak üzere büyütülmüş (İkizler ve diğ.,

1997); mayanın iki günlük, dermatofitlerin ve küflerin iki haftalık kültürlerinin spor süspansiyonları steril distile su ile çalkalanarak elde edilmiş, daha sonra sayım yapılarak ve yine steril saf su ile seyreltilerek 10⁵ cfu/ml verecek spor süspansiyonları 0.5 McFarland bulanıklık skalasına göre hazırlanmıştır (Caccamese ve Azzolina, 1979; Ma Jing Wen ve Tan Wei-Ci, 1984; Gür, 1992).

Steril tüplerde 0.2 ml.si 10⁵ cfu/ml mikrofungus içeren solüsyonlar, 20 ml Sabouraud Maltoz agar besiyeri içeren steril petrilere inokule edilmiştir. Kirby Bauer yöntemi olarak da bilinen disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan araştırmada (Seeley ve Van Demaki 1981; Ma Jing Wen ve Tan Wei-Ci, 1984) 20µl ekstrakt emdirilen 13 mm çapındaki Whatman No.1 diskler (Caccamese ve Azzolina, 1979; Ma Jing Wen ve Tan Wei-Ci, 1984) steril bir pens yardımıyla besiyeri üzerine yerleştirilerek, kültürler yine dermatofitler için 37°C, diğer küfler ve mayalar için 27°C sıcaklıklarda inkübe edilmişlerdir. Pozitif kontrol amacıyla bir azol türevi olan antifungal 5µg ketokonazol, 25µg sikloheksimid ve 20µl toluen: metanol (1:3) (Caccamese ve Azzolina, 1979; Seeley ve Van Demak, 1981; Ma Jing Wen ve Tan Wei-Ci, 1984; Gür, 1992) içeren diskler de yerleştirilerek tüm denemeler her mikrofungus için üç paralel halinde tekrarlanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Phaeophyta divisiosuna ait 6 alg türünün ve Rhodophyta divisiosuna ait 3 alg türünün toluen: metanol ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile denenen antifungal aktiviteleri ile ilgili bulgular Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Bazı deniz alglerinin toluen-metanol ekstraktlarının antifungal aktiviteleri.

Ordo	Deniz Algleri	1	2	3	4	5	6	7
Fucales	<i>Cystoseira barbata</i> (Good et. Woodw.) C.A.g <i>C. compressa</i> (Esper) Gerloff et Nizamuddin <i>Dictyota dichotoma</i> (Hunds.) Lam.	-	-	-	-	-	-	-
Dictyotales	<i>Dictyopteris membranaceae</i> (Stackh.) Batters	-	-	-	-	-	-	-
Scytosiphonales	<i>Colpomenia sinuosa</i> (Mert ex Roth) Derb et Sol. In Castagne	-	-	-	-	-	-	-
Sphacelariales	<i>Halopteris scoparia</i> (L.) Sauv.	-	-	-	-	-	-	-
Gigartinales	<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) Lam.	-	-	-	-	-	-	-
Ceramiales	<i>Laurencia papillosa</i> (Forssk.) Grev. <i>Acanthophora najadiformis</i> (Delile) Papenfuss.	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 1'den de açıkça görülebileceği gibi 9 alg ekstraktımızın hiçbirinde in vitro koşullarda kayda değer antifungal etkiye rastlanmamıştır. Bu konuda yapılan değerlendirmelere göre; eğer disk çapı ile difüzyon çapı aynı ise mikroorganizmamız dayanıklıdır, ancak inhibisyon çapı disk çapından biraz büyük ise duyarlı ve disk çapından iki veya daha fazla misli ise ekstrakt etkin sayılmıştır (Seeley ve Van Demak 1981). Alg ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili yapılan diğer bir araştırmada ise bizim de araştırmamızda kullandığımız 13 mm çapındaki Whatman No.1 diskler göre inhibisyon zonu 16 mm'den küçük ise (+), 16-19 mm arasında ise (++) ve 19 mm'den büyük ise (+++) ile gösterilmiştir. Ekstraktın etkin sayılabilmesi için inhibisyon zonunun (+++)=>19 mm olması gerekmektedir (Caccamese ve Azzolina 1979).

Alg ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili yapılan çalışmalara göre farklı konsantrasyonlarda kullanılmak üzere (%30-95) etanol,eteroksitler, dietileter, aseton,, heksan, metanol gibi çözümler ve su kullanılabildiği gibi ; kloroform-metanol (1:1), metanol-su (4:1) ve toluen-metanol (1:3) gibi karışımların da kullanıldığı görülmektedir (Sachithanantan, 1975; Caccamese ve Azzolina, 1979; Biard *et al.*, 1980; Espeche *et al.*, 1984; Ma Jing Wen ve Tan Wei-Ci, 1984; Pesando *et al.*, 1984; Usmanhani *et al.*, 1984; Caccamese *et al.*, 1985; Perez *et al.*, 1990). Araştırmamızda toluen-metanol (1:3) karışımı kullanılmıştır, bu karışımın antifungal etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla yaptığımız pozitif kontrol de literatur bilgilerini desteklemiş (Caccamese ve Azzolina, 1979; Ma Jing Wen ve Tan Wei-Ci, 1984) ve etkin olmadığı saptanmıştır. Pozitif kontrol sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.

Test Mikroorganizmaları:

1. *Candida albicans*,
2. *Trichophyton rubrum*,
3. *Microsporidium canis*,
4. *Aspergillus fumigatus*,
5. *Penicillium funiculosum*,
6. *Trichoderma viride*,
7. *Rhizopus arrhizus*

Tablo 2. Test mikroorganizmalarının disk difüzyon yöntemi ile pozitif kontrol sonuçları (mm).

Test organizmaları	Ketakonazol	Toluen-metanol	Sikloheksimid
<i>Candida albicans</i>	<16	<16	16
<i>Trichophyton rubrum</i>	16	<16	24
<i>Microsporidium canis</i>	<16	<16	26
<i>Aspergillus fumigatus</i>	32	<16	36
<i>Penicillium funiculosum</i>	20	<16	22
<i>Trichoderma viride</i>	16	<16	16
<i>Rhizopus arrhizus</i>	18	<16	21

Bilindiği gibi antimikrobiyal maddeler sekonder metabolitlerdir ve ortamda bulunan besin zincirindeki değişikliklerden ve iklim değişiklikleri gibi çevre parametrelerinden de oldukça etkilenmektedirler (Sachithanantan, 1975; Caccamese ve Azzolina, 1979; Biard *et al.*, 1980; Espeche *et al.*, 1984; Ma Jing Wen ve Tan Wei-Ci, 1984; Perez *et al.*, 1990). Antifungal ve antibakteriyel etkinlik çalışmalarında, aynı mevsimde farklı bölgelerden toplanan örnekler için mevsimsel ve hatta örneğin iz elementler veya ağır metal kirliliklerine bağlı biriktirmelerde de olduğu gibi (Güner ve diğ., 1987) aylık değişimler de görülmektedir. Araştırmamızda, sonbahar mevsiminde aynı bölgeden toplanan ve aynı çözügen kullanılarak ekstraktları hazırlanan alg örneklerimizin kayda değer antifungal aktiviteleri saptanamamakla beraber; diğer tüm mevsimlerde aynı alg örnekleri toplanarak ve farklı solventlerle ekstraktları hazırlanarak; buna ek olarak diğer alg türlerinin de antifungal ve antibakteriyel aktivitelerinin araştırılması sonucunda muhtemelen yeni potansiyel biyoaktif ürünler belirlenebilecektir kanısındayız.

Kaynakça

- Aysel,V., Güner, H., Sukatar,A., and Öztürk,M., 1984. Check-List of Izmir Bay Marine Algae. Rhodophyceae. Jour.of Fac.of Sci., Series B, Vol.VII,Nr.1, 47-55.
- Aysel,V., Zeybek,N., Güner,H., ve Sukatar,A., 1986. Türkiye'nin Bazı Derin Deniz Algleri III.Rhodophyta (Kırmızı Algler), Doğa Tr.Bio.Der.10.1, p:8-29.
- Aysel,V., Güner,H., ve Sukatar,A., 1987. Türkiye'nin Ege Denizi Florası ve Türkiye Deniz Florasındaki Yeri.VIII.Ulusal Biyoloji Kongresi, Cilt II, p: 494-508.

- Aysel,V., Çetingül,V., Güner,H., ve Dural,B.,1992. Determination of Soluble Carbohydrate and Protein Amounts of Some Brown Algae.Fac.of Fish.,9 (33,34,35,36), p: 114-123.
- Biard,J.F.,Verbist,J.F.,*et al.*, 1980. Algues Fixees de la Cote Atlantique Francaise Contenant des Substances Antibacteriennes et Antifongiques. Jour.of Med.Plants Res., p:136-151.
- Caccamese,S.,Toscano,R.M.,Furnari,G., and Cormaci, M., 1985. Antimicrobial Activities of Red and Brown Algae from Southern Italy Coast. Bot.Mar.,28 (11), p: 505-507.
- Çetingül,V., Aysel,V., Dural,B., and Güner,H., 1994. An Investigation on the Soluble Carbohydrate and Protein Amounts of Some Red Algae Collected from Different Sites of Izmir Bay. Fac.of Fish. 11 (41), p: 11-18.
- Espeche,M.E.,Fraile,E.R., and Mayer,A.M.S., 1984. Screening of Argentina Marine Algae for Antimicrobial Activity. Hydrobiol.,116/117, p: 525-528.
- Güner,H., ve Aysel,V., 1979. Qualitative and Quantitative Studies of the Algae Population in the Aegean and Marmara Sea (2) *Dictyopteris membranacea* (Stackh.) Batt.Population (Phaeophyta),Jour.of Fac.of Sci., Series b,Vol.III, p: 85-94.
- Güner,H., Aysel,V., Sukatar,A., and Öztürk,M., 1984. Check-List of Izmir Bay Marine Algae II. Phaeophyceae., Chlorophyceae and Cyanophyceae. Jour.of Fac.of Sci., Series B, Vol.VII,Nr.1, 57-65.
- Güner,H., Aysel,V., Özelsel,S., and Sukatar,A., 1987. Periodical Variation of Trace Element Accumulations in Some Algae Found in the Bay of Izmir.Internationale d'Océanographic Medicale, p: 52-55.
- Güner,H., Aysel,V., ve Sukatar,A., 1987. Marmara Denizi'nin Sahil Algleri Üzerinde Taksonomik Araştırma. VIII.Ulusal Biyoloji Kongresi, Cilt II, p: 483-493.
- Gür,D., 1992. Antibiyotik Duyarlılık Testleri : Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri.E.H.Akalin.Pfizer İlaçları A.Ş.Kitaplar Serisi, p: 45-67.
- Güven,K., Güvener,C., and Güler,E., 1987. Pharmacological Activities of Marine Algae. Introduction to Appl. Phycology, ed. By I.Akatsuha, SPB. Acad.Pub.Hague, Netherlands, p: 67-92.
- Haliki,A., Çetingül,V., and Denizci,A.A., 1998. An Investigation on Antibacterial Activities of Some Marine Algae (Phaeophyta, Rhodophyta). Jour.of Fac.of Sci.Vol.21(1),p: 1-9.
- Ma-Jing Wen and Tan Wei-Ci, 1984. Screening for Antimicrobial Activites in Marine Algae from Qingdao Coast, China. Hydrobiol. 116/117,p: 517-520.
- Perez,R.M.G., Avila, J.G., Perez, S.G., Martiner,A.C., and Martiner, G.C., 1990. Antimicrobial Activity of Some Marine Algae . Jour.Ethno.Pharmo.,29,p: 111-116.
- Pesendo,D, Caram, B., 1984.Screening of Marine Algae from the French Mediterranean Coast for Antibacterial and Antifungal Activitiy. Bot.Mer.,27 (8), p: 381-386.
- Sachithanathan, K., and Sivapalan,A., 1975. Antibacterial Properties of Some Marine Algae of Sri Lanka.Bull.Fish.Res.Stn.,Sri Lanka, 26 (1-2),
- Seeley, H.W.,Van Demak,J.P.,1981. Sensitivity Discs in the Therapeutic Use of Antibiotics: Kirby Bauer Technique. In Selected Exercises from Microbes in Action, A Laboratory Mon. Of Microbiology.Ed.by W.H.Freeman and Company, 3. edition, p: 128-130.
- Shaw,P.D.,Mc Clure,W.O., Van Blaricom,G.,Sims,J., and Fenical,W., 1974. Antimicrobial Activities from Marine Organisms. Food-Drug from the Sea. Proc.Mar. Technol.Soc., Washington D.C., p: 429-431.
- Sukatar,A., 1983. İzmir Körfezinde Yayılış Gösteren Bazı *Laurencia* Lam. (Rhodophyta, Ceramiales) Türlerinin Sistematiği.Jour.of Fac.of Sci., Series B,p: 280-288.
- Sukatar,A., Aysel,V., and Güner,H., 1987. İzmir Limanı Karşıyaka Konak Kıyı Şeridindeki Algler.VIII.Ulusal Biyoloji Kongresi, Cilt II, p: 509-516.
- Usmanghani, K., Shameel,M., Sualah,M., Khan,K.H., and Mahmood,Z.A., 1984. Antibacterial and Antifungal Activities of Marine Algae from Karachi Seashore of Pakistan. Fitoterapia, 55 (2) p: 73-78.