

Su Ürünleri Dergisi J.Fish.Aquat.Sci.	Cilt No.18/1 Vol.18/1	Özel Sayı Suppl.	161 - 166 161 - 166	İzmir – Bornova 2001 İzmir – Bornova 2001
--	--------------------------	---------------------	------------------------	--

## Türkiye Koşullarında Üretimi Yapılan *Spirulina platensis*' in Çeşitli Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivite Kapasitesinin Belirlenmesi\*<sup>1</sup>

Güven Özdemir<sup>1</sup> Meltem Conk Dalay<sup>2</sup> Köksal Küçükakyüz<sup>3</sup>  
Barış Pazarbaşı<sup>4</sup> Mete Yılmaz<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Ege Üniv, Fen Fak., Biyoloji Böl., Tem. ve End. Mikrob. Anab. Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye.

<sup>2</sup> Ege Üniv., Mühendislik Fak., Biyomühendislik Böl., Bornova, İzmir, Türkiye.

<sup>3</sup> Muğla Üniv., Fen Fak., Biyoloji Böl., Muğla, Türkiye.

<sup>4</sup> Celal Bayar Üniv., Fen Fak., Biyoloji Böl., Manisa, Türkiye.

<sup>5</sup> Ege Üniv., Su Ürün.Fak., Yetiştiricilik Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye.

**Abstract :** *Determining the Antimicrobial Activity Capacity of Various Extracts of Spirulina platensis Produced in Turkey's Conditions.* In this study, extracts extracted in different solvents (Ethanol, Acetone, Chloroform, Hexane) of *Spirulina*, propagated in Turkey, were tested for their antimicrobial activities on different organisms (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *Klebsiella pneumoniae* 2318, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 11230, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 p, *Streptococcus faecalis* ATCC 8043, *Proteus vulgaris* ATCC 6897, *Salmonella typhimurium* CCM 583 and a yeast *Candida albicans* ATCC 10239) according to disk diffusion method. Our results revealed that, while ethanol extracts of *Spirulina* showed antimicrobial activity on gram positive organisms, acetone and chloroform extracts showed on both gram positive and negative organisms. Hexane extracts, on the other hand, showed antimicrobial activity only on *S. faecalis* ATCC 8043, which is a gram positive organism. Finally, antimicrobial activity on *Candida albicans* ATCC 10239 has been found only in ethanol extracts of *Spirulina*.

**Key Words :** *Spirulina*, antimicrobial, activity, extraction

**Özet :** Bu çalışmada Türkiye koşullarında üretimi yapılan *Spirulina*'nın çeşitli çözügenlerde (etanol, kloroform, hegzan ve aseton) elde edilen ekstraktlarının bazı test mikroorganizmalarına (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *Klebsiella pneumoniae* 2318, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 11230, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 p, *Streptococcus faecalis* ATCC 8043, *Proteus vulgaris* ATCC 6897 ve *Salmonella typhimurium* CCM 583 ile maya türü *Candida albicans* ATCC 10239) karşı disk difüzyon yöntemine göre antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Deney sonuçlarına göre etanol ekstraktlarında

\*Bu çalışma E.Ü. Araş. Fon Saym. 2000 Bil 026 nolu proje tarafından desteklenmektedir

gram negatif bakterilere karşı aseton ve kloroform ekstraktlarında ise hem gram pozitif hemde gram negatif bakterilere karşı aktivite saptanmıştır. Hegzan ekstraktlarında ise *S. faecalis* ATCC 8043 hariç önemli bir aktivite saptanmamıştır. *Candida albicans* ATCC 10239' karşı tek aktivite ise etanol ekstraktlarında saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler :** *Spirulina*, antimikrobiyal, aktivite, ekstraksiyon

## Giriş

Bir Siyanobakter olan *Spirulina* ticari önemi olan bir mikroorganizmadır. Bu kaynaklanmaktadır. Ayrıca düşük oranda yağ, gammalinoleik asit ve vitamin özellikle B12 vitamini bakımından zengindir. 16. yy.'ın başlarında , Aztekler , Texcoco Gölünden hasat ettikleri *Spirulina*'yı tüketmekteydi. Benzer şekilde, *Spirulina*, Afrika'da Çad Gölü kıyıları boyunca yaşayan Kanembu kabilesi tarafından da besin olarak kullanılmıştır. Günümüzde, *Spirulina*, özellikle A.B.D, Bankok, Tayland, Tayvan, Japonya ve Hawai' deki bazı şirketlerce ticari olarak üretilmektedir. Bunların yıllık total kuru ağırlık üretimi 30-40 ton ile 300-400 ton arasında değişmektedir (Borowitzka, 1992)

*Spirulina*'nın içeriğinde bulunan  $\beta$  karoten, antikansorejen etkisinin yanı sıra doğal bir A vitamini kaynağıdır. 2 gr *Spirulina*, günlük A vitamini ihtiyacını karşılar. Ayrıca yüksek dozda alındığında sentetik A vitaminleri gibi toksik değildir. İçeriğinde yüksek oranda bulunan demir sayesinde kansızlık tedavisinde kullanılmaktadır. Yüksek tansiyona, damar setliğine, kalp ve şeker hastalıklarına iyi gelir (Conk Dalay, 1997)

Besleyici özelliğe sahip düşük kalorili bir gıda olması sebebiyle *Spirulina*, zayıflama dietleri için ideal bir

özelliği, içeriğinde bulunan kuru ağırlığının % 60-70'ini teşkil eden proteinden

besindir. Yapılan denemeler sonucunda zayıflatıcı etkisinde olduğu belirtilmiştir (Seshadri ve diğ. 1992).

Bunlara ek olarak bazı zehirlenmelere iyi geldiği ve radyasyon düzeyini düşürücü etkisi olduğu saptanmıştır. Çernobil kazası sonucu yüksek radyasyon almış çocuklar üzerinde yapılan bir deneyde *Spirulina*'nın radyasyonu düşürücü etkisi kanıtlanmıştır (Fox, 1993).

*Spirulina*, tek başına bir ilaç olmamakla birlikte doğal bir tedavi aracıdır. İnsan sağlığı üzerine olan etkileri, bilim adamlarının hala üzerinde çalıştığı ve olumlu sonuçlar aldığı bir konudur. Özellikle

Fransa'da yapılan alg üretiminin bir kısmı, kozmetik sanayiinde yan ürün eldesinde kullanılmaktadır. Ayrıca *Spirulina*'nın yanıklar üzerindeki tedavi edici etkisi de deneysel olarak kanıtlanmıştır (Becker and Venkateraman 1981).

## Materyal ve Metod

Araştırmada kullanılan bakteri türleri *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *Klebsiella pneumoniae* 2318, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 11230, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 p,

*Streptococcus faecalis* ATCC 8043, *Proteus vulgaris* ATCC 6897 ve *Salmonella typhimurium* CCM 583 ile maya türü *Candida albicans* ATCC 10239 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bakteri suşları nutrient broth (Oxoid)'a aşılanarak  $30\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat, maya suşu ise malt ekstrakt broth (Oxoid)'a aşılanarak 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Otoklavda sterilize edilen Müller Hinton Agar (Oxoid) ve Malt Ekstrakt Agar aseptik şartlarda petrilere yeterli miktarda dökülüp katılaştırılmıştır. McFarland standart sayım yöntemi kullanılarak bakteri kültürlerinin  $1\times 10^7$ - $1\times 10^8$ /ml, maya kültürünün  $1\times 10^5$ - $1\times 10^6$ /ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Petrilere 0,1 ml test mikroorganizmaları aktarılıp tüm yüzeye homojen olacak biçimde steril L-bağette inoküle edilmişlerdir. Mayanın bulunduğu plaklar  $25^{\circ}\text{C}$ 'de bakterilerin bulunduğu petrilere ise  $30^{\circ}\text{C}$ 'de bir saat inkübasyona tabi tutulmuşlardır.

Ege Üniversitesi EBİLTEM'den getirilen *Spirulina* örnekleri liyofilize edildikten sonra toz haline getirilmiştir. Uygun yöntemler kullanılarak (Khan ve diğ., 1988, Vlachos ve diğ., 1996) 15 g tartılan toz *Spirulina* 150 ml etanol içerisinde 24 saat ekstraksiyona tabii tutulmuştur. Süre sonunda ekstraksiyon fazı ayrıldıktan sonra yöntem diğer çözenler olan kloroform, aseton ve hegzan içinde uygulanmıştır. Bu metoda göre elde edilen tüm ekstraktlar  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

*Spirulina* ekstraktlarının anti mikrobiyal aktivitesini belirlemede steril kağıt disk metodu (Finegold ve diğ., 1978, Collins and Lyne, 1989, Bradshaw, 1992) uygulanmıştır. 6 mm çapında boş steril antibiyotik diskler (Schleicher and Schül, Nr. 2668, Almanya) hazırlanmış ve bu diskler yine aseptik şartlara uyularak, buzdolabında bekletilen ekstraktlardan mikropipet ile 20-30  $\mu\text{l}$  *Spirulina* ekstraktı emdirilmiştir. Daha sonra diskler  $50^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış bir etüvde kurutulmuştur. Etüvde bir saat inkübasyona bırakılmış bakteri ve mayaların bulunduğu petrilere aseptik olarak farklı ekstraktlar emdirilmiş antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Bakterilerin bulunduğu petrilere  $30\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat mayaların bulunduğu petrilere ise  $25\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda plaklarda disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülmüştür. Ayrıca sadece çözenlerin emdirilmiş olduğu diskler ve mukayese antibiyotiği olarak 6 mm çapındaki standart tobramisin ve nistadin diskleri kontrol amacıyla kullanılmıştır. Çıkan zon çapları ekstraktların emdirilmiş olduğu disklerin etrafındaki zon çaplarından ve disklerin çapından çıkarılmıştır. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

### Bulgular

Çalışmada elde edilen bulgular Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çeşitli çözümlerdeki Spirulina ekstraktlarının test mikroorganizmalarına karşı gösterdiği inhibisyon zon çapları

Test Mikroorganizmaları	İnhibisyon zonları (mm)			
	Etanol	Aseton	Kloroform	Hegzan
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	3	1	2
<i>Mycobacterium smegmatis</i> CCM 2067	1	3	6	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 2318	1	1	3	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	14	3	6	3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11230	2	5	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 p	2	1	6	-
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	-	5	-	9
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6897	2	1	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 583	7	-	1	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	5	-	-	-

Tablo 2. Standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm)

Test Mikroorganizmaları	İnhibisyon zonları (mm)	
	Tobramisin(10µg/disk)	Nistatin (30µg/disk)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	18	ND
<i>Mycobacterium smegmatis</i> CCM 2067	4	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 2318	5	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11230	4	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 p	10	ND
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	3	ND
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6897	7	ND
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 583	4	ND
<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	ND	12

ND:denenmedi

Çalışmada kullandığımız standart antibiyotiklerle karşılaştırıldığında (Tablo 2), etanol ekstraktlarında (Tablo 1) oluşan zon çapları *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Salmonella typhimurium* CCM 583' da aseton ekstraktlarında, *Streptococcus faecalis* ATCC 8043'da, kloroform ekstraktlarında *Mycobacterium*

*smegmatis* CCM 20672'de, hegzan ekstraktlarında ise *Streptococcus faecalis* ATCC 8043'de daha fazla aktivite görülmüştür.

Etanol ekstraktlarında *E.coli*, *Proteus vulgaris* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi gram negatif bakterilere karşı aktiviteler

gözlenmiştir. *Candida albicans*'a karşı tek aktivite yine etanol ekstraktlarında bulunmuştur. Aseton ekstraktlarında hem Gr- hem de Gr+ bakterilere karşı bir aktivite tespit edilmiştir. Ancak bu aktiviteler *E.coli* hariç diğerlerinde çok fazla olmadığı görülmektedir. Aynı şekilde, kloroform ekstraktlarında yine hem Gr- hem de Gr+ bakterilere karşı aktivite saptanmıştır. Hegzan ekstraktlarında ise ya hiç ya da fazla olmayan bir aktivite gözlenmiştir.

### Tartışma ve Sonuç

*Spirulina*'nın insan sağlığı üzerindeki etkileri deneylerle kanıtlanmıştır. *Spirulina*'da yüksek oranda bulunan linoleik asit, Prostoglandin(PGE<sub>1</sub>) sentezini stümüle eder. Bu hormon da kandaki kolesterolü etkiler (Fox 1993). Yapılan çalışmalar, *Spirulina*'nın T lenfosit hücrelerinin fonksiyonlarını arttırdığı ve bu yolla vücudun savunma mekanizmasını kuvvetlendirdiği göstermiştir. Ayrıca *Spirulina*'nın kanser ve AIDS tedavilerinde de etkili olduğu,

antitümör özellik taşıdığı, mide ve deri kanserlerinde hastalığın seyrini yavaşlatıcı hatta tedavi edici etkisi olduğu da deneylerle kanıtlanmıştır (Manoj ve diğ., 1992).

Siyanobakterilerden antimikrobiyal madde elde etmek için giderek artan bir ilgi olduğu görülmektedir. Bloor and Englan (1991)'de *Nostoc*'un, Fish and Codd (1994) *Phormidium*'un, Kreitlow ve diğ (1999) *Anabaena Oscillatoria*, *Pseudoanabaena* ve *Synechocystis*'in çeşitli izolatlarının, Issa (1999) *Oscillatoria angustissima* ve *Calothrix parietina*'nın çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitelerini incelemişler. Genellikle bu araştırmacıların çeşitli çözenlerde elde ettikleri ekstraktların hem Gr – hem de Gr + bakterilere karşı etkileri olduğu görülmüştür. Bizim de yapmış olduğumuz çalışmada bu siyanobakterilerle yapılmış olan çalışmalara benzer şekilde çeşitli çözenlerden elde edilen *Spirulina* ekstraktlarının bu bakterilere karşı etkisi olduğu görülmektedir.

### Kaynakça

- Becker; E. W., Venkateraman; L., V., 1981. Biotechnology and Exploitation of Algae-The Indian Approach- Edited by R.D. Fox, All Indian Coordinated Project on Algae Dep. Of Science and Tech., India.
- Bloor,S.and Englan, R.R., 1991, Elucidation and optimization of the medium constituents controlling antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*., *Enzym. Microbiol. Technol.*,13(1):76-81.
- Borowitzka, M.A., 1992 . Vitamins and fine chemicals from micro-algae. Micro algal Biotechnology pp:153-184, Edited by Michael A.. Borowitzka, Lesley J. Borowitzka. Cambridge University press-Cambridge.
- Bradshaw, L.J., Laboratory Microbiology, Fourth Edition, Printed in USA, 1992
- Collins, C.M. and Lyne, P.M. 1989, Microbiological Methods. Butterworths and Co. (Publishers) Ltd. London.

G. Özdemir, M. Conk Dalay, K. Küçükakyüz, B. Pazarbaşı, M. Yılmaz

- Conk Dalay; M., 1997. İzole Edilmiş *Spirulina sp.*'nin Kültür Ortamlarında Yetiştirilmesi ve Besin Kalitesi Değişimleri Üzerine Bir Araştırma. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İZMİR.
- Finegold, S.M., Martin, W.J., and Scott, E.G., Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 5. Edition The C.V. Masby Company, Saint Louis.
- Fish, S.A. and Codd, G.A., 1994, Bioactive compound production by thermophilic and thermotolerant Cyanobacteria, W.J. Microbiol. Technol., 10(3), 338-341.
- Fox, R. D., 1993. Algoculture, The Microalgae *Spirulina* (Cyanophyceae), A study of the Conditions Necessary for Their Growth, These de Doctorat, France.
- Issa A.A., 1999, Antibiotic production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina*, Env. Toxic. and Pharm. 8:33-37
- Khan, N.H., Rahman, M., Kamal, Nur-E., 1988, Antibacterial activity of *Euphorbia thymifolia* Linn. Indian J. Med. Res. 87: 395-397.
- Kreitlow, S., Mundt, S., Lindequist, U., 1999, Cyanobacteria- a potential source of new biologically active substances, J. of Biotech. 70:61-63
- Manoj; G. Venkataraman, L. Srinivas, 1992. Antioxidant Properties of *Spirulina* (*Spirulina platensis*), C.V. and N. Jeeji Bai (Eds) *Spirulina*, ETTA Nat. Symp. MCRC, Madras- India
- Seshadri; C. V., S. Seshagiri, N. Jeeji, Bai et al., 1992. Applications of *Spirulina*, C.V. and N. Jeeji Bai (Eds.) *Spirulina*, ETTA Nat. Symp. MCRC, Madras-India
- Vlachos, V., Critchley, A.T. and von Holy A., 1993, Establishment of a protocol for testing antimicrobial activity in southern African macroalgae. Microbios 88:115-123.