Artvin Çoruh Üniversitesi
Orman Fakültesi Dergisi
ISSN:2146-1880, e-ISSN: 2146-698X
Yıl: 2024, Cilt: 25, Sayı:1, Sayfa:1-5

ofd.artvin.edu.tr

Artvin Coruh University
Journal of Forestry Faculty
ISSN:2146-1880, e-ISSN: 2146-698X
Year: 2024, Vol: 25, Issue:1, Pages:1-5

Lactarius controversus (Pers.) Pers.'in antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi

Determination of antimicrobial effect of Lactarius controversus (Pers.) Pers

Şule İNCİ [1*] **Sevda KIRBAĞ** [1]

[1]Firat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Elazığ

Eser Bilgisi / *Article Info*
Araştırma makalesi / *Research article*
DOI: 10.17474/artvinofd.1335292

Sorumlu yazar / *Corresponding author*
Şule İNCİ
e-mail: sule.inci@hotmail.com

Geliş tarihi / *Received*
31.07.2023
Düzeltme tarihi / *Received in revised form*
05.11.2023
Kabul Tarihi / Accepted
12.11.2023
Elektronik erişim / *Online available*
15.05.2024

Anahtar kelimeler:
Yenilebilir mantarlar
Lactarius controversus
Mikrodilüsyon yöntemi
Antimikrobiyal etki

Keywords:
Edible mushrooms
Lactarius controversus
Microdilution method
Antimicrobial effect

Özet

Söğüt mantarı olarak bilinen *Lactarius controversus* (Pers.) Pers., halk tarafından yenilebilir bir türdür. Dünyadaki birçok insan buruk tadı nedeniyle tüketmeyi tercih etmese de ülkemizde yaygın olarak tüketilmektedir. Bu çalışmada, *L. controversus*'un metanol ve etanol ekstraktlarının bazı mikroorganizmalara (*Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Pseudomonas aeruginosa* DMS50071, *Bacillus megaterium* DSM32, *Staphylococcus aureus* COWAN1, *Candida albicans* FMC17, *Candida glabrata* ATCC 66032 ve *Trichophyton* sp.) karşı antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Disk difüzyon yöntemine göre *L. controversus*'un metanol ve etanol ekstraktlarının kullanılan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal (8.3-25.3 mm) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Mikrodilüsyon yöntemine göre aynı türe ait metanol ve etanol ekstraktlarının minimum inhibitör konsantrasyon değerinin 31.25-250 µg/mL arasında olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda *L. controversus*'un bakteri, maya ve dermatofitlere karşı antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Abstract

Lactarius controversus (Pers.) Pers., known as willow mushroom, is an edible species by the public. Although many people in the world do not prefer to consume it due to its acrid taste, it is widely consumed in our country. In this study, the antimicrobial effects of methanol and ethanol extracts of *L. controversus* against some microorganisms (*Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Pseudomonas aeruginosa* DMS50071, *Bacillus megaterium* DSM32, *Staphylococcus aureus* COWAN1, *Candida albicans* FMC17, *Candida globrata* ATCC 66032 and *Trichophyton* sp.) were investigated. According to the disk diffusion method, it has been determined that methanol and ethanol extracts of *L. controversus* have an antimicrobial effect (8.3-25.3mm) against microorganisms used. According to the microdilution method, it was determined that the minimum inhibitory concentration value of methanol and ethanol extracts of the same species was between 31.25-250 µg/mL. As a result of the study, it may be recommended to use *L. controversus* as an antimicrobial agent against bacteria, yeast, and dermatophytes.

GİRİŞ

Günümüzde hastalıkların artmasıyla birlikte antimikrobiyal direnç küresel bir sorun haline gelmiştir. Özellikle mikroorganizmaların sentetik ve yarı sentetik ilâçlara karşı direnç göstermesiyle birlikte hastalıkların giderek arttığı görülmektedir (Agarwal ve ark. 2023). Bu nedenle patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi oldukça önemlidir. Özellikle COVID-19 salgınından sonra nutrasötiklerden veya fonksiyonel gıdalardan antimikrobiyal aktivite arayışı bilim insanlarının ilgisini çekmektedir (Moussa ve ark. 2022). Doğal ürünler, birçok biyolojik aktiviteye sahip kimyasalları ihtiva etmektedirler ve bu yüzden ilâç keşfi ve geliştirilmesi için en umut verici kaynaklardandır (Niu ve Li 2019, Pancu ve ark. 2021). Bu ürünler içerisinde yer alan fenoller, polifenoller, terpenoidler, uçucu yağlar, alkaloitler, lektinler, polipeptitler ve ayrıca bunların karışımları antimikrobiyal aktiviteden sorumlu bileşenlerdir (Pancu ve ark. 2021).

Mantarlar, farklı etki mekanizmalarına sahip doğal bileşikleri sayesinde bakteriyel dirençle savaşabilecek doğal besinlerdir (Pancu ve ark. 2021). Mantar ekstraktları patojenik mikroorganizmaları inhibe etmektedir. Özellikle istenmeyen yan etkilerin daha az olması ve mikrobiyal dirençle mücadele edebilmesi nedeniyle de sentetik antimikrobiyal bileşiklerin kullanımına göre avantajlıdır (Suleiman ve ark. 2022).

Söğüt mantarı olarak bilinen *L. controversus*, söğüt veya kavak ağaçları altında, yaz sonları veya sonbaharda

çıkmaktadır (Pekşen ve ark. 2007). Bu tür Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya olmak üzere üç kıtaya yayılmıştır (Mayirnao ve ark. 2023). Ülkemiz makrofungus florasında bulunan *L. controversus*, halk pazarlarında satılan yenilebilir bir türdür. Bu tür dünyanın pek çok yerinde buruk tadı nedeniyle tercih edilmese de, ülkemizin Karadeniz Bölgesi'ndeki insanlar tarafından tüketilmektedir (Pekşen ve ark. 2007). Bahsedilen *L. controverus* mantarının tıbbi etkileri hakkında oldukça sınırlı çalışmalar vardır. Yapılan çalışmalarda bu türün antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Novaković ve ark. 2016). Ayrıca bu türün fenolik bileşikler içerdiği (Novaković ve ark. 2016), protein ve mineral elementlerince zengin olduğu da bildirilmiştir (Pekşen ve ark. 2007).

Bu çalışmada *L. controverus* mantarının etanol ve metanol ekstrelerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Toplanması, Tespit edilmesi ve Ekstraksiyon İşlemleri

Çalışmada kullanılan *L. controversus*, Elazığ'ın Sivrice ilçesinden Nisan 2017 tarihinde toplanmıştır. Örnekler üzerinde makroskobik ve mikroskobik çalışmalar gerçekleştirilerek tür teşhisi yapılmıştır (Heilmann-Clausen ve ark. 2000). Kuru hava sterilizatöründe 40 °C'de 10-12 saat süreyle kurutulan mantar örneği karıştırıcıda toz haline getirilip (Babu ve ark. 2014) ve basidiokarplarından 5 g tartılıp ve daha sonra üzerine 150 mL %96 metanol (MetOH) ve etanol (EtOH) çözücüsü ilâve edilerek soxhlet cihazında 7 saat süreyle ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Kalan alkol rotary evaporator kullanılarak uzaklaştırılmış ve hazırlanan ekstraktlar çalışma yapılıncaya kadar +4 ^{o}C'de saklanmıştır (Khan ve ark. 1988).

Antimikrobiyal Aktivite

Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada; bakteri suşları olarak *Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Bacillus megaterium* DSM32, *Staphylococcus aureus* COWAN1, *Pseudomonas aeruginosa* DMS 50071; maya olarak *Candida glabrata*, *Candida albicans* FMC17 ve dermatofitlerden *Trichophyton* sp. mikroorganizmaları kullanılmıştır.

Disk Difüzyon Metodu

Çalışmada *L. controversus* mantarının metanol ve etanol ekstraklarının antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Collins ve Lyne 2004). Bakteri suşları Nutrient Buyyon'a (Difco) inoküle edilip ve 35 ± 1°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Mayalar ve dermatofit fungus sırasıyla Malt Extract Buyyon (Difco) ve Glucose Sabouroud Buyyon (Difco) içine inoküle edilerek 25 ± 1 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Hazırlanan bakteri, maya ve dermatofit fungus kültürleri sırasıyla; Müeller Hinton Agar, Sabouraud Dextrose Agar ve Potato Dextrose Agar'a ve %1 oranında (10^6 bakteri/mL, 10^4 maya/mL, 10^4 dermatofit/mL) inoküle edilip, steril petri kutularına aktarılmıştır. Her biri 100 µL (1000 µg) farklı ekstraktlarla emdirilmiş antimikrobiyal diskler (6 mm çapında), agar ortamına yerleştirilmiştir ve 4 °C'de 1.5-2 saat bırakıldıktan sonra bakteriler, mayalar ve dermatofit funguslar sırasıyla 37 ± 1°C'de 24, 25 ± 1°C'de 48 ve 25 ± 1 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Mayalar için Nistatin (30 µg/disk) ve bakteriler için Streptomisin sülfat (10 µg/disk) standart disk olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda, inhibisyon zonları ölçülmüştür (mm).

Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

Mantar örneğinin metanol ve etanol ekstrelerinin minimum inhibitör konsantrasyon değerleri 96 oyuklu mikroplakalarda mikrodilüsyon brot yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan ekstraklar 1000-7.8125 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlar elde etmek için 96 oyuklu mikroplakalarda Muller Hinton Broth içinde seri dilüsyonları yapılarak seyreltilmiştir. Hazırlanan bakteri, maya ve dermatofit funguslar standart inokulum elde etmek için bulanıklıkları McFarland 0.5 ölçeğine göre ayarlanmıştır. Hazırlanan bu süspansiyonlardan 100 µL alınarak *L. controversus* ekstreleri üzerine eklenmiştir. Bakteri ekili olan 96 oyuklu mikroplakalar 37 ^{o}C'e 24 saat, mantar ve dermatofit fungus ekili olanlar 25 ^{o}C'de 48 saat

inkübasyona bırakıldıktan sonra çoğalmalarını önleyen en düşük konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak belirlenmiştir (EUCAST 2022).

İstatiksel Analiz

Veriler en az üç tekrara dayalı olarak ortalama ± standart sapma (SD) olarak temsil edilmiştir. SPSS paket programı kullanılarak Duncan testiyle tek yönlü varyans analiziyle belirlenmiştir ve $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *L. controversus* mantarının metanol ekstresi *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa S. aureus, B. megaterium, C. albicans, C. glabrata* ve *Trichophyton* sp.'nin gelişimlerini farklı oranlarda engellediği belirlenmiştir (13.3-25.3 mm inhibisyon zonu). Etanol ekstresinin ise aynı mikroorganizmalara karşı 8.3-20.3 mm inhibisyon zonu oluşturduğu görülmüştür (Çizelge 1).

Standart antibiyotiklerden Streptomisin sülfat (10 µg/disk) bakterilere karşı 10.5-20.3mm etki gösterirken, Nistatin (30 µg/disk) dermatofit fungus ve mayalara karşı 12.3-23.3 mm antimikrobiyal etki göstermiştir (Çizelge 1).

L. controversus mantarının metanol ve etanol ekstresinin bakteri, maya ve funguslara karşı antmikrobiyal etkilerinin istatistiksel olarak benzer olduğu (Çizelge 1, $p>0.05$), ancak kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların (Çizelge 1, $p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 1. *Lactarius controversus* mantarının metanol ve etanol ekstraktlarının bazı mikroorganizmalara karşı inhibisyon zonları (mm)

	***L. controversus*-MetOH**	***L. controversus*-EtOH**	**Standart antibiyotik**
Escherichia coli	25.3±0.6^{b}	20.3±0.6^{a}	20.3±0.6^{a}
Klebsiella pneumoniae	25.0±0.6^{b}	18.3±0.6^{a}	19.3±0.6^{a}
Pseudomonas aeruginosa	15.3±0.6^{b}	16.6±0.6^{b}	10.5±0.6^{a}
Bacillus megaterium	18.3±0.6^{b}	14.0±0.0^{a}	20.3±0.6^{c}
Staphylococcus aureus	13.3±0.6^{b}	8.3±0.6^{a}	20.3±0.6^{c}
Candida albicans	25.3±0.6^{b}	13.3±0.6^{a}	21.3±0.6^{b}
Candida glabrata	20.0±0.0^{b}	12.0±0.0^{a}	23.3±0.6^{c}
Trichophyton sp.	21.0±0.0^{b}	12.3±0.6^{a}	12.3±0.6^{a}

$^{a, b, c}$ Her bir satırda aynı harflerle gösterilen değerler birbirinden farklı değildir

L. controversus'un metanol ve etanol ekstrelerinin *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, B. megaterium, S. aureus, C. albicans, C. glabrata* ve *Trichophyton* sp.'ye karşı minimum inhibitor konsantrasyon değerleri Çizelge 2'de verilmiştir.

Metanol ekstresinin kullanılan mikroorganizmalara karşı MİK değerleri 31.25-62.5 µg/mL olarak tespit edilirken etanol ekstresinin MİK değerinin 62.5 ila 250 µg/mL aralığında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. *Lactarius controversus* mantarının metanol ve etanol ekstraktlarının minimum inhibitor konsantrasyon (MİK) değerleri (µg/mL)

	***L. controversus*-MetOH**	***L. controversus*-EtOH**
Escherichia coli	31.25	31.25
Klebsiella pneumoniae	31.25	62.5
Pseudomonas aeruginosa	62.5	62.5
Bacillus megaterium	62.5	125
Staphylococcus aureus	62.5	250
Candida albicans	31.25	125
Candida glabrata	31.25	125
Trichophyton sp.	31.25	125

Mantarın etanol ekstresine göre metanol ekstresinin antimikrobiyal etkisinin daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, metanol ekstresinin düşük konsantrasyonda (31.25-62.5 µg/mL) bile *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, B. megaterium, S. aureus, C. albicans, C. glabrata* ve *Trichophyton* sp.'nin gelişimini engellediği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, bu türün *E. coli, C. albicans, P. aeruginosa, S. enterica*'ya karşı antimikrobiyal etkisinin olmadığı ancak *S. flexneri*'ye karşı 8 mm inhibisyon zonu oluşturduğu bildirilmiştir (Altuner ve Akata 2010). Aynı türün metanol ekstrelerinin *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etkilerinin (12.00-17.50 mm) olduğu rapor edilmiştir (Özen ve ark. 2016). Dulger ve ark. (2002), *L. controversus*'un Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı antimikrobiyal etkisinin olduğunu ancak mayalara karşı olmadığını bildirmişlerdir. Bazı *Lactarius* türlerinin *P. aeruginosa, E. coli, S. aureus*'a karşı MİK değerlerinin 9.38-37.50 mg/mL aralığında olduğu tespit edilmiştir (Stanković ve ark. 2022). *L. piperatus*, *L. quietus* ve *L. vellereus* türlerinin metanol ve etanol ekstraklarının *S. aureus*'a karşı MİK değerleri 12.5-25 mg/mL aralığında olduğu rapor edilmiştir (Kostić ve ark. 2023). *L. delicious*'un etanol ekstresi *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı sırasıyla 7.94 mm ve 7.12 mm inhibisyon zonu belirlenmiştir (Avcı ve Avci 2019). *L. sanguifluus*'un metanol ekstresinin *C. albicans* ve *Trichophyton rubrum*'un MİK değerlerinin sırasıyla 21.33 mg/ml ve 4.00 mg/mL olduğu bildirilmiştir (Erbiai ve ark. 2021). Bu çalışmada *L. controversus*'un antimikrobiyal sonuçları literatürdeki diğer sonuçlarla kıyaslandığında farklılıkların olduğu görülmektedir. Antimikrobiyal sonuçlardaki farklılık; mantarın türüne, toplandığı yere, içerdiği bileşenlere, ekstraksiyonda kullanılan çözücüye, patojen mikroorganizma türüne bağlı olarak değişebilmektedir (Dulger ve ark. 2002, Altuner ve Akata 2010, Özen ve ark. 2016, Avcı ve Avci 2019, Erbiai ve ark. 2021, Stanković ve ark. 2022, Kostić ve ark. 2023).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, *L. controversus*'un metanol ekstresi *E. coli* (25.3mm), *K. pneumoniae* (25.0mm) ve *C. albicans*'a (25.3mm) karşı en yüksek antimikrobiyal etkiyi göstermiştir. Ayrıca metanol ekstresi düşük konsantrasyonlarda bile etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu türün fenol bileşikleri içerdiği araştırmalarla belirlenmiş olup, bu bileşenler sayesinde mikroorganizmaların gelişmeleri engellenebilmektedir. Bu nedenle. *L. controversus* mantarının kimyasal içeriklerinin daha detaylı araştırılması ve biyoaktivite çalışmalarına literatürde daha fazla yer verilmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada destek ve katkılarından dolayı Bitlis Eren Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet AKYÜZ'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Agarwal A, Gupta V, Yadav AN, Sain D, Rahi RK, Bera SP, Neelam D (2023) Aspects of mushrooms and theır extracts as natural antımıcrobıal agents: microbiology. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 12(6):e9191-e9191.

Altuner EM, Akata I (2010) Antimicrobial activity of some macrofungi extracts. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 14(1):45-49.

Avcı E, Avci GA (2019) Antimicrobial and antioxidant activities of medicinally important Lactarius deliciosus. International Journal of Medical Science and Dental Research, 2(6):49-55.

Babu DR, Pandey M, Rao GN (2014) Antioxidant and electrochemical properties of cultivated Pleurotus spp. and their sporeless/low sporing mutants. Journal of food science and technology, 51:3317-3324.

Collins CM, Lyne PM (2004) Microbiological methods. In: Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Flkinham III JO (ed) Mycological methods, 8 ed. London, p.140.

Dulger B, Yilmaz F, Gucin F (2002) Antimicrobial activity of some Lactarius species. Pharmaceutical Biology, 40:304-306.

Erbiai EH, Bouchra B, da Silva LP, Lamrani Z, Pinto E, da Silva JCE, Maouni A (2021) Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of Lactarius sanguifluus, a wild edible mushroom from northern Morocco. Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration, 6:1-12.

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (2022) EUCAST reading guide for broth microdilution. Version 4.0.

Heilmann-Clausen J, Verbeken A, Vesterholt J (2000) The Genus Lactarius. In: Petersen LJH, Elborne SA (ed) Fungi of Northern Europe 2, Denmark.

Khan NH, Kamal MSA, Rahman M (1988) Antibacterial activity of Euphorbia thymifolia Linn. Indian Journal of Medicinal Research, 87:395–397.

Kostić M, Ivanov M, Fernandes Â, Calhelha RC, Glamočlija J, Barros L, Sokoviç M, Ćirić A (2023) A Comparative study of Lactarius mushrooms: chemical characterization, antibacterial, antibiofilm, antioxidant and cytotoxic activity. Journal of Fungi, 9(1):70.

Mayirnao HS, Gupta S, Thokchom SD, Sharma K, Mehmood T, Kaur S, Sharma YP, Kapoor R (2023) Nutritional assessment of Lactarius drassinus and L. controversus from the cold desert region of the Northwest Himalayas for their potential as food supplements. Journal of Fungi, 9(7):763.

Moussa AY, Fayez S, Xiao H, Xu B (2022) New insights into antimicrobial and antibiofilm effects of edible mushrooms. Food Research International, 111982.

Niu G, Li W (2019) Next-generation drug discovery to combat antimicrobial resistance. Trends in Biochemical Sciences, 44(11):961-972.

Novaković AR, Karaman MA, Milovanović IL, Belović MM, Rašeta MJ, Radusin TI, Ilić NM (2016) Edible mycorrhizal species Lactarius controversus Pers. 1800 as a source of antioxidant and cytotoxic agents. Hemijska Industrija, 70(2):113-122.

Özen T, Darcan C, Kaygusuz Ö, Türkekul İ (2016) The Chemical content, antioxidant and antimicrobial assays of Lactarius controversus and Lactarius musteus: two edible wild mushrooms from Giresun province of Turkey. Annals of Food Processing and Preservation, 1(1):1001.

Pancu DF, Scurtu A, Macasoi IG, Marti D, Mioc M, Soica C, Coricovac D, Horhat D, Poenaru M, Dehelean C (2021) Antibiotics: conventional therapy and natural compounds with antibacterial activity a pharmaco-toxicological screening. Antibiotics, 10(4):401.

Pekşen A, Kibar B, Yakupoğlu G (2007) Yenilebilir bazı Lactarius türlerinin morfolojik özelliklerinin, protein ve mineral içeriklerinin belirlenmesi. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 22(3):301-305.

Stanković M, Mitić V, Stankov Jovanović V, Dimitrijević M, Nikolić J, Stojanović G (2022) Selected fungi of the genus Lactarius screening of antioxidant capacity, antimicrobial activity, and genotoxicity. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 85(17):699-714.

Suleiman WB, Shehata RM, Younis AM (2022) In vitro assessment of multipotential therapeutic importance of Hericium erinaceus mushroom extracts using different solvents. Bioresources and Bioprocessing, 9(1):1-13.