

## FARMASÖTİK ÖNEMİ OLAN BAZI DROGLARDA MİKOLOJİK ANALİZLER

### MYCOLOGICAL ANALYSES OF SOME OF THE PHARMACEUTICALLY IMPORTANT CRUDE HERBS

Oğuz ÖZYARAL\*, Ö. TARKAN\*\*, Adile ÇEVİKBAŞ\*\*  
Candan Bozok JOHANSSON\*\*\*

**Özet:** Bu çalışmamızda tıbbi önemi bulunan ve infüzyon halinde geniş kullanım alanı bulunan *Folium Salviae trilobae* (Anadolu adaçayı yaprağı), *Flos Tiliae* (Ihlamur çiçeği) ve *Folium Menthae piperitae* (Nane yaprağı)'nın mikolojik florası araştırılmıştır. Kurutulmuş ham droglardaki mikolojik flora, aynı droglardan hazırlanan infüzyonları üzerinde yapılan mikolojik analiz sonuçları ile karşılaştırılmış ve flora kaybı izlenmiştir. Mikolojik analizleri yapılan droglardan 27 ayrı türe ait toplam 122 adet küf mantarı izole edilmiş bunların 81 adedinin % 33.6'lık bir kayıpla infüzyonlarda canlı kaldıkları saptanmıştır.

Hazırlanan infüzyonlarda orjinal drogdan gelen ve major depo küfü olarak bilinen *penicillium* türlerinin, *A.glaucus* grubundan *A.chevalieri* ve *A.repens* ile *A.candidus*'un ve *A.flavus* grubundan *A.flavus*'un tamamının canlı kaldıkları saptanmıştır.

**Summary:** In this study fungal flora of *Folium Salviae trilobae* (Anatolian sage leaf), *Flos tiliae* (linden flower) and *Folium menthae piperitae* (Mint) which are medically important herbs and used for infusions, were investigated.

The fungal flora of crude herbs was compared with that of the infusions prepared from the same herbs and the inhibitory effect of infusion process on the mold flora was recorded.

Totally 122 mould strains distributed in 27 species were isolated, Eighty one strains (33.6%) survived in infusions.

All the major storage fungi namely *Penicillium* spp.; *Aspergillus chevalieri*, *A.repens* from *A.glaucus* group; *A.flavus* from *A.flavus* group and *A.candidus* were found alive in infusions crude herbs.

\* Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa, İstanbul.

\*\* Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa, İstanbul.

\*\*\* Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa, İstanbul.

## G İ R İ Ş

Doğal kaynaklardan elde edilen ve hiçbir işlem görmeden kullanılan bitkisel kaynaklı hammaddeler çok geniş ve çeşitli bir mikrop florası içerirler. Bu flora topaktan, özellikle gübreden, sudan, lağım sularından, hayvan atık ve artıklarından gelen mikroorganizmalar doğal florayı hızla zenginleştirirler. Ayrıca bu drogların toplanmaları, hazırlanmaları ve diğer işlemler sırasında da kullanılan alet, ambalaj materyali ve çalışan personelin deri ve solunum yolu floralarından gelebilecek mikroorganizmalar yeni kontaminasyonlara neden olurlar.

Ham maddelerin, özellikle higroskopik olanların depolama koşulları önemlidir. Astarsız kağıt torbalar, delikli naylon veya tekstil çuvallar ürünün oksijenle temasını arttırır ve nemi kolayca içeri geçirirler. Böylece maddelerin su aktiviteleri küflerin gelişebilecekleri uygun bir düzeye gelir. Bazı depo küfleri sıfırın altındaki derecelerde dahi üreyebilmektedir. Bunların bazıları da uygun koşullar bulunduğunda insan sağlığı için çok zararlı olan mikotoksinlerini oluştururlar (1, 2, 3).

İnfüzyon, drogların farmasötik amaçla kullanılmasında en çok uygulanan yöntemlerden biridir (4).

Bu çalışmamızda tıbbi değeri olan ve infüzyonu hazırlanan üç drog üzerinde, mikolojik analizler yapılmıştır. Kurutularak hazırlanan ve belli sürelerde depolarda bekleyen ve genel olarak açıkta satışa sunulan bu droglarda mikolojik floranın zenginliğini görmek ve dolayısıyla hazırlanan infüzyonlara bu floradan ne oranda bir geçiş olduğunu saptamak amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

İstanbul'da Mısır Çarşısı ve Çemberlitaş baharatçılarında belirli depo ve üreticiden gelen 10 adet *Folium Salviae trilobae* (Anadolu adaçayı yaprağı), 8 adet *Flos Tiliae* (Ihlamur çiçeği) ve 9 adet *Folium Menthae piperitae* (Nane yaprağı) olmak üzere toplam 27 örnek toplanmıştır. Örnekler steril cam kavanoz veya steril naylon torbalara TSE'nin bildirdiği şekilde alınmış ve analizleri yapılmıştır (5-7).

Kurutulmuş droglar ile bu droglardan infüzyon hazırlanması ve infüzyonların mikolojik analizleri literatürün bildirdiği şekilde yapılmıştır (4, 8-11).

Besiyerleri: Örneklerden ve örneklerden hazırlanan infüzyonlardan küf izolasyonu ve tanımı için yulaf unlu agar, mısır unlu agar, Sabouraud dekstroz agar ile şeker konsantrasyonu artırılmış yulaf unlu agar ve mısır unlu agar besiyeri, ayrıca % 0.5 Rose Bengal ilavesi yapılmış bir seri mısır unlu agar besiyeri kullanılmıştır (8-10).

Ozmofilik küflerin yakalanabilmesi için mısır unlu agar besiyerine 50 g/L NaCl ilave edilmiştir (10).

Yukarıda adı geçen tüm besiyerlerine bakteri çoğalmasını engellemek amacıyla antibiyotik ilave edilmiştir (11).

Kurutulmuş drogda mikolojik analizler için her bir örnek aseptik şartlarda 5 g. tartılıp içerisinde 45 ml peptonlu su bulunan steril balonlarda 37 °C'lik çalkalayıcı etüvde 10-15' dakika süreyle bekletilmiş ve yüzeyel kontaminasyonun sıvı ortama geçmesi sağlanmıştır.

## B U L G U L A R

Bu çalışmamızda toplam 27 adet depoya ait olan 10 adet adaçayı, 8 adet ihlamur, 9 adet nane örneği üzerinde yapılan mikolojik analizler sonucunda kurutulmuş droglardan toplam 122 adet küf süşunun ayırımı yapılmış ve 27 adet farklı tür tanımlanmıştır. Orijinal drogun florası saptandıktan sonra drogun infüzyonu hazırlanmış ve infüzyonlara doğal floradan ne kadarının geçtiği saptanmıştır, Tablo 1'de ham drogdan ve drogların

Tablo 1

### İnfüzyonluk Droglardan Ayırımı Yapılan Küf Süşları, İnfüzyon İşlemi Sonrası Kayıp ve Florada Canlı Kalma Kapasitesi

Tanıları Yapılan Mantar Süşları	Ayırımı Yapılan Süşların Kaynağı		Flora	
	Ham Drog	Drog İnfüzyonu	% Kayıp	% Canlı
<i>Aureobasidium pullulans</i>	16	14	12.50	87.50
<i>Aspergillus candidus</i>	3	3	0.00	100
<i>A.chevalieri</i>	1	1	0.00	100
<i>A.flavus</i>	5	4	20.00	80
<i>A.fumigatus</i>	1	1	0.00	100
<i>A.niger</i>	12	8	33.33	66.67
<i>A.parasiticus</i>	9	6	33.33	66.67
<i>A.phoenicus</i>	8	6	25.00	75
<i>A.repens (A.glaucus)</i>	6	6	0.00	100
<i>A.versicolor</i>	2	2	0.00	100
<i>Chrysonilia sp.</i>	2	1	50.00	50
<i>Cladosporium cladasporides</i>	2	1	50.00	50
<i>Cla.sphaerospermum</i>	2	—	100.00	0
<i>Eurotium ochrasalmoneum (A.glaucus)</i>	1	—	100.00	0
<i>Moniliella acetabutens</i>	1	1	0.00	100
<i>Mucor plumbeus</i>	11	1	90.91	9.09
<i>Penicillium chrysogenum</i>	5	5	0.00	100
<i>P.frequentans</i>	2	2	0.00	100
<i>P.griseofulvum</i>	1	1	0.00	100
<i>P.paraherquei</i>	1	1	0.00	100
<i>P.verrucosum var.cyclopium</i>	1	1	0.00	100
<i>P.verrucosum var.melanochlorum</i>	1	1	0.00	100
<i>P.verrucosum var.verrucosum</i>	2	2	0.00	100
<i>Rhizopus oryzae</i>	4	2	50.00	50
<i>R.stolonifer</i>	10	7	30.00	70
<i>Thricoderma harzianum</i>	4	2	50.00	50
<i>T.viride</i>	9	2	77.78	22.22
<b>Toplam</b>	<b>122</b>	<b>81</b>	<b>33.61</b>	<b>66.39</b>

infüzyonlarından izole edilen küf suşları görülmektedir. Ham drogdan ayırımı yapılan suş sayısı 122 iken, drog infüzyonu hazırlandıktan sonra bu sayı 81'e düşmüştür. İnfüzyondaki doğal flora kaybı % 33.6 olarak saptanmıştır. Mikolojik analizi yapılan adaçayı örneklerinden izole edilenn *Auerobasidium pullulans*, *cladosporium*, *penicillium* türleri ile *Moniliella acetoabutens*, ıhlamur örneklerinden ayırımı yapılan *Auerobasidium pullulans*, *aspergillus*, *penicillium* türleri ile nane'den ayırımı yapılan *penicillium*'lar bu droglardan hazırlanan infüzyonlarda canlı kalmışlardır. Tablo 2'de ham drogdan ayırımı yapılan küf suşu sayısı gruplar halinde bildirilmiş ve infüzyonluk çözeltilerdeki yüzde (%) azalma oranı bildirilmiştir. Ayrıca Tablo 2'de *penicillium* grubu küf mantarlarının drogların infüzyonlarında hiç kaybolmadıkları, *aeurobasidium* türlerinin adaçayı ve ıhlamur infüzyonunda canlı kaldıkları, *cladosporium* türlerinin adaçayı infüzyonunda, *aspergillus* türlerinin ise ıhlamur infüzyonunda hiç bir kayba uğramadıkları görülmektedir. Bu çalışmamızda 3 adaçayı ve 2 ıhlamur infüzyonunda flora canlılığını aynen korumuştur.

Tablo 2  
Ham Droglardan Ayırımı Yapılan Küf Gruplarının Sayısı ve Bu Grupların İnfüzyonluk Çözeltilerinde % Azalma Oranı

Tanımları Yapılan Küf Suşları	Adaçayı		Ihlamur		Nane		Toplam	
	Ham Drog	İnf.	Ham Drog	İnf.	Ham Drog	İnf.	Ham Drog	İnf.
Aspergillus grubu	18	12	13	13*	17	12	48	37
Azalma (%)		(33.33)		(0.00)		(29.41)		(22.92)
Cladosporium türleri	1	1*	2	-	1	-	4	1
Azalma (%)		(0.00)		(100.00)		(100.00)		(25.00)
Auerobasidium Spp.	4	4*	4	4*	8	6	16	14
Azalma (%)		(0.00)		(0.00)		(25.00)		(12.50)
Mucor/Rhizopus spp.	6	3	8	3	11	4	25	10
Azalma (%)		(50.00)		(62.50)		(63.64)		(60.00)
Penicillium grubu	6	6*	6	6*	1	1*	13	13*
Azalma (%)		(0.00)		(0.00)		(0.00)		(0.00)
Trichoderma spp.	4	2	3	-	6	2	13	4
Azalma (%)		(50.00)		(100.00)		(66.67)		(69.23)
Diğer türler	1	1*	-	-	2	1	3	2
Azalma (%)		(0.00)				(50.00)		(33.33)

\* Flora kaybı yoktur.

## TARTIŞMA

Taze toplanan drog çok kısa sürede bozulur, bu nedenle kurutup saklamak en uygun yöntemdir. Ayrıca kurutma esnasında bitkisel materyal ağırlığında % 75 oranında bir

kayba uğrar, bu da drogun taşınmasını ve depolanmasını kolaylaştırır. Bu esnada küflenmeyi önlemek ve kurutmayı hızlandırmak için bitkisel malzeme sık sık altüst edilir. Ülkemizde drogların büyük bir kısmı güneşte veya gölgede olmak üzere açık havada kurutulmaktadır. Her iki tip kurutma sürecinin hızlı olması ve üründe rutubetli kısımların kalmaması drogun mikroorganizma içeriği ve niteliği açısından büyük önem taşır (4).

Yesair ve William (12) ile Julseth ve Deibel'in (13) çalışmaları çarşıda satılan bazı baharat ve tıbbi otlardaki kontaminasyonun önemini ortaya koymuştur. 1982 yılında Schwab ve arkadaşları (14) kekik dahil olmak üzere orijinal kaynaklı on ayrı örnek üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar örneklerinde  $1.4 \times 10^3$  -  $8.2 \times 10^5$  kob\*/ml total bakteri,  $< 20$  kob/ml koliform bakteri,  $3-2.3 \times 10^3$  kob/ml E.coli,  $< 290$  kob/ml maya ve küf bulunduğunu bildirmişlerdir (14). Görgün ve ark. (15) çalışmalarında, ıhlamur örneklerinde  $5 \times 10^4$  -  $3.9 \times 10^5$  kob/ml total bakteri ve  $15 - 1.1 \times 10^3$  kob/ml koliform grubu bakteri saptamışlardır.

F.D.A. (Food and Drug Administration) bütün baharat ve tıbbi otlar için küflü tane veya parçacıkların total ürün ağırlığının % 5'i kadar olabileceğini bildirmiştir (16). Bugün yaptığımız çalışmaların sonuçları göstermektedir ki bu oran artık kabul edilemez bir düzeydir. Samson ve ark. ile Özyaral ve Johansson'un çalışmalarının sonuçlarında, küf mantarı kirliliğinin besin maddelerinde ve farmasötik ürünlerde hızla arttığı ve verilen bu yüzdenin çok kısa bir sürede aşıldığı ve ürünlerin kullanılamaz hale geldiği saptanmıştır (2, 9, 17).

Bu çalışmamızda baskın florada birinci sırayı aspergillus grubu, daha sonra sırasıyla mucor ve rhizopus cinsi suşlar, Auerobasium pullulans, penicillium, trichoderma türleri ve cladosporium'lar ile son sırayı karışık bir grup işgal etmektedir.

Major depo küfü olarak bilinen aspergillus'lardan özellikle A.glaucus grubu suşlar ile A.candidus ve A.flavus grubu suşlar ve penicillium'lar bu droglardan sıklıkla izole edilmişlerdir. Su aktivitesi 0.68 ve üzerindeki depolarda bu küflerin canlı kaldığı ve nem içeriği 8.0'in üzerindeki ürünlerde rahatça geliştikleri bilinmektedir (1, 2, 18). Daha önce yaptığımız bir ön çalışmada 9 ıhlamur örneğinin 5 tanesinden A.glaucus grubunun bir üyesi olan A.repens (Eurotium herbariorum) izole edilmiştir (9, 19). Tanımlamada kullandığımız kaynaklara ve Samson'a (9) göre, E.herbariorum özellikle depolanmış baharat ve kurutulmuş bitkilerden izole edilmektedir. Ön çalışmamızda E.herbariorum izole edilmiş olan örneklerin 3 tanesi aynı, diğer 2 tanesi ise ayrı ayrı depolardan baharatçılara gelmiştir (15). Bu çalışmamızda örneklerin geli ve depolanmaları konusunda edinilen bilgilere göre bu drogların ana depoları 4 adet kadardır ve örneklerin florasından anlaşılacağı gibi floralar arasında önemli bir fark görülmemektedir. Bu da bize örneklerin kaynak depolarının şartlarının hemen hemen aynı olduğu fikrini vermektedir.

Ayırımı yapılan suşların süspansiyonlarında  $25 \times 10^4$  kob/ml mantar sporu bulunduğu gözlenmiştir. Bu miktar insan vücuduna girdiğinde sindirim sisteminde

\* Kob: koloni oluşturan birim (cfu).

hazımsızlık nedeni olabilir. Raper ve Fennel (19), E.herbariorum'un hazımsızlık nedeni olduğunu bildirmişlerdir. Ayırımı ve tanımlaması yapılan toplam 122 adet suşun 81 adedi infüzyonda canlı kalmıştır. İnfüzyon örneklerinde başlangıçtaki doğal flora göre mikroorganizma sayısında % 33.6 azalma saptanmıştır. Bu durumda vücuda girecek küf mantarı sporu miktarı oldukça yüksek görülmektedir. Örneklerden izole edilen major depo küfü olan 13 penicillium türü, drogların infüzyonlarında hiç bir kayba uğramadan % 100 oranında canlı kalmıştır.

Aspergillus'larda bu azalma oranı ise % 23 olmasına rağmen tanısı yapılan aspergillus'lardan A.candidus, A.chevalieri (A.glaucus gr.), A.fumigatus, A.repens (A.glaucus gr.), A.versicolor suşları infüzyonlarda % 100 oranında canlı kalmışlardır. Hazırlanan infüzyonlarda en büyük kayba % 69.23'lük bir oranla trichoderma'lar ile % 60'lık oranla da mucor ve rizopus türleri uğramıştır. Toprak kaynaklı cladosporium'ların bu kaybı ise % 25 civarındadır.

Ham drog ve drog infüzyonlarına ait mikolojik bulgular T-testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Sonuç olarak ham drog infüzyonundaki flora kaybının ham drogun florasına göre kaybı istatistiksel olarak incelendiğinde p değeri < 0.01 sapmayla anlamlı bulunmuştur.

Birçok taze ve nemli besin maddesi üzerinde bakterilerin rekabetinden dolayı mantarlar kolaylıkla üreyemezler. Fakat şartlar değişip suyunu kaybeden düşük su aktivitesine sahip olan ve pF'sı 4.5'dan az olan ürünlerle bu ürünlerin düşük ısılarda saklanmaları küflerin üremeye başlamasına neden olabilmektedir. Bilindiği gibi bazı depo küfleri sıfırın altındaki derecelerde hızlı olmasa da yaşamlarını devam ettirebilmektedirler. Birçok küfün düşük limitlerdeki nem içeriğinde üreyebildiği gösterilmiş ve şu ana kadar su aktivitesi 0.65'in altındaki şartlarda depo küflerinin ürediği görülmemiştir (1, 2).

İzole ettiğimiz bu küf kontaminantlarının, drogları özellikle kurutma, depolama ve ambalajlama ve uzun bekletme süreleri sonunda istila ederek çeşitli toksinler de oluşturabileceklerini düşünürsek, böyle drogların kullanımı sağlığı tehdit edici gözükmemektedir.

Bu nedenle bu tür ürünlerin depolama koşulları standardize edilmeli ve ürünler tüketiciye ulaşmaya kadar bu koruma zinciri aynı özenle devam ettirilmelidir.

#### KAYNAKLAR

1. Christensen CM: Storage Fungi. In Beuchat LR (ed), Food and Beverage Mycology. AVI Publishing Comp, Westport, Connecticut, pp. 173-190, 1978.
2. Özyaral O, Johansson CB: "Besin ve ilaç endüstrisini etkileyen depo küfleri". FABAD Ferm Bil Derg, 16: 23-30, 1991.
3. Davis ND, Diener UL: Mycotoxins. In Beuchat LR (ed), Food and Beverage Mycology. AVI Publishing Comp., Westport, Connecticut, pp. 397-444, 1978.

## DROGLARDA MİKOLOJİK ANALİZLER

4. Baytop T: Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul Üniversitesi Yayınları No: 3255, Eczacılık Fakültesi No: 40, İstanbul, s. 520, 1984.
5. TSE, "Türk Standartları, Ihlamur", TS 3223/Nisan 1978, UDK 582.795 1. Baskı (18.7.1978), Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 1978.
6. TES, "Türk Standartları, Kuru Nane", TS 3498/Ekim 1980, UDC 664.8:633.822, 1. Baskı, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 1981.
7. TES, "Türk Standartları, Adaçayı", TS 4281/Haziran 1984, UDK 582.949, 1. Baskı, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 1985.
8. Ellis MB: Dematiaceous, hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew Survey, pp. 608, 1980.
9. Samson RA, Hoestra ES, van Oorschot CAN: Introduction to food-borne fungi. Baarn, Netherlands, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, p. 248, 1981.
10. Pitt JI, Hocking AD: Fungi and food spoilage. Academic Press, Sydney, Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montreal, Tokyo, p. 413, 1985.
11. Gams W, Vander Aa HA, Vander Plaats-Niterink AJ, Samson RA, Stalper JA: CBS Course of Mycology. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Drukkerij "ERLA", Amsterdam-Zuid, The Netherlands, p. 109, 1980.
12. Yesair J, Williams OB: Spice contamination and its control. Food Res, 7, 118-126, 1942.
13. Julseth RM, Deibel RH: Microbial profile of selected spices and herbs at import. J Milk Food Technol, 37: 414-419, 1974.
14. Schwab AH, Harpestad AD, Swartzentruber A, Lanier MJ, Wentz BA, Duran AP, Barnard RJ, Read RB: Microbiological quality of some spices and herbs in retail markets. Appl. Environ. Microbiol. 44: 627-630, 1982.
15. Görgün G, Özyaral O, Johansson CB: Bazı tıbbi bitkiler ve baharat üzerinde yapılan mikrobiyolojik analizler. I. Tıp Bilimleri Öğrenci Kongresinde sunulmuştur. İstanbul, 7.5.1985.
16. FDA (Food and Drug Administration), Irradiation in the production, processing and handling of food, Final rule. Federal Register (48) 129, 30613-30614, July 5, 1983.
17. Özyaral O, Johansson CB, Yemni E, Çevikbaş A: Systematic analysis and statistical evaluation of fungal strain isolated from miscellaneous sources. ECCO, European Culture Collections Organization, 12<sup>th</sup> international meeting, p. 9, Programme and Abstract book, İstanbul, 1993.
18. Cory JE: Relationships of water activity to fungal growth. In Beuchat LR (ed), Food and Beverage Mycology. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, pp. 45-82, 1978.
19. Raper KB, Fennel DI: The genus *Aspergillus*. Robert E Krieger Publishing Co Inc. New York, pp. 147-196, 1977.