



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AĞIZ MİKROBİYOTASINDA BULUNAN
CANLI FAKAT KÜLTÜR EDİLMİYEN
BAKTERİLERİN ÜRETİLMESİNDE
QUORUM SENSING İNHİBİTÖRLERİNİN
KULLANILMASI**

Enis Fuat TÜFEKÇİ

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

TRABZON-2017



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AĞIZ MİKROBİYOTASINDA BULUNAN
CANLI FAKAT KÜLTÜR EDİLMİYEN
BAKTERİLERİN ÜRETİLMESİNDE
QUORUM SENSING İNHİBİTÖRLERİNİN
KULLANILMASI**

Enis Fuat TÜFEKÇİ

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

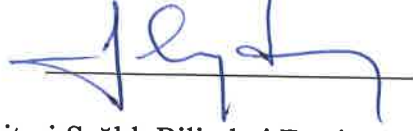
TRABZON-2017

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Faruk AYDIN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Enis Fuat TÜFEKÇİ'nin hazırladığı "Ağız Mikrobiyotasında Bulunan Canlı Fakat Kültür Edilmeyen Bakterilerin Üretilmesinde Quorum Sensing İnhibitörlerinin Kullanılması" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ



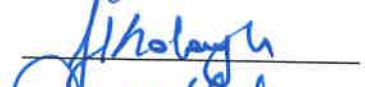
Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU



Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ



Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI



Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK



Tarih: / /2017

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

15/08/2017

Enis Fuat TÜFEKÇİ

İthaf

Yetişmemde emeği geçen tüm herkese

TEŞEKKÜR

Bilimsel ve hayat yolunda engin tecrübelerinden yaralandığım, iş disiplini ve sanatı başta olmak üzere birçok konuda kendisini örnek aldığım sayın danışman hocam Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a minnet ve saygılarımı sunarım.

Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Faruk AYDIN hocama ve öğretim üyesi hocalarım Prof. Dr. İlknur TOSUN, Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA, Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU, Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK ve Yrd. Doç. Dr. Esra ÖZKAYA'ya bilimsel destekleri ve paylaştıkları deneyimlerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Çalışma için örnekleri veren tüm gönüllü bireylere, örnekleri alan başta Uzm. Dt. Saliha AKÇAY'a ve KTÜ Diş Hekimliği Oral Diagnoz ve Radyoloji AD'nın öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine teşekkür ederim. Destekleri ve sağladıkları olanaklar için Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ersan KALAY'a, tüm öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN'a, tüm öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine teşekkür ederim.

Eğitimim süresince bilimsel ve manevi desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Ahmet KALKAN, Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU, Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ ve Yrd. Doç. Dr. Bayram TORAMAN hocalarıma ve çalışmada sağladığı suş ve bilimsel desteği için Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Anabilim Dalımızın uzmanlık ve lisansüstü eğitim programındaki Uzm. Dr. Erhan KONGUR, Uzm. Dr. Rukiye AKYOL, Uzm. Dr. Bünyamin KASAP, Arş. Gör. Dr. Şükran ÖNDER, Arş. Gör. Ahu REİS, Arş. Gör. Gülşen ULUÇAM ATAY, Arş. Gör. Merve CORA, Arş. Gör. İnci DURUKAN, Doktora öğrencileri Mujib ABDURRAHMAN, Sana TABBOUCHE ve Jaleel SAMANJE arkadaşlarıma destekleri ve yardımları için teşekkür ederim.

Her türlü desteklerinden ve yardımlarından dolayı Prof. Dr. Birgül KURAL hocama, Yrd. Doç. Dr. Selim DEMİR, Dr. Ömer Faruk KALKAN, Dr. Akın BODUR, Arş. Gör. İdris ER, Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN, Arş. Gör. Kübra AKBULUT ÇAKIROĞLU, Arş. Gör. Şeniz DOĞRAMACI ve doktora öğrencisi Dilek KOCABAŞ'a teşekkür ederim.

Çalışmanın gerçekleşmesinde sağladığı olanaklar ve destekleri için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Maddi, manevi destekleri ile hayatımın her aşamasında arkamda duran ve varlıkları ile yaşama tutunmamı sağlayan, büyük fedakarlıklar göstererek bu günlere gelmemi sağlayan annem, babam ve kardeşime teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenmiştir. Proje numarası: TDK-2015-5332.

Enis Fuat TÜFEKÇİ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İç Kapak Sayfası	
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiv
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xvi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ ve AMAÇ	4
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Quorum Sensing	6
4.1.1. QS Sinyal Molekülleri	7
4.1.1.1. AHL Sinyal Molekülleri	7
4.1.1.2. AI-2 Sinyal Molekülleri	8
4.1.1.3. Otoindükleyici Peptitler	9
4.1.1.4. Siklik Dipeptidler	9
4.1.1.5. Bradyoksetin	10
4.1.1.6. Diğer Sinyal Molekülleri	10
4.1.2. QS Sinyal Moleküllerinin Sentezi	11
4.1.2.1. AHL Sentezi	11
4.1.2.2. AI-2 Sentezi	12
4.1.2.3. AIP Sentezi	12
4.1.2.4. Diğer Sinyal Moleküllerinin Sentezi	12
4.1.3. QS Sinyal Mekanizmaları	12
4.1.3.1. LuxR Sistemi	12

4.1.3.2. LuxP/Q Sistemi	12
4.1.3.3. Oligopeptit Sistemi	13
4.1.4. Bakterilerde QS İnhibisyonu	13
4.1.4.1. Önemi	13
4.1.4.2. Sinyal Molekül Üretiminin Önlenmesi	14
4.1.4.3. Sinyal Moleküllerinin Yıkımı	14
4.1.4.4 Sinyal Molekül Alımının Önlenmesi	14
4.1.5. QS İnhibitörleri	15
4.1.6. QS İnhibisyonunun Test Edilmesinde Kullanılan Biyoindikatör Suşlar	17
4.1.6.1. <i>Chromobacterium violaceum</i>	17
4.1.6.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
4.2. Ağız Mikrobiyotası	18
4.2.1. Ağız Boşluğunun Normal Mikrobiyotası	18
4.2.2. Ağız Mikrobiyotasının Kültür Edilemeyen Bakterileri	19
4.3. Kültür Edilemeyen Bakterilere Genel Bakış	20
4.3.1. Sınıflandırılması	20
4.3.1.1. Henüz Kültür Edilemeyen Bakteriler	21
4.3.1.2. Dormant Bakteriler	21
4.3.2. Kültür Edilemeyen Bakterilerin Üretilmemesi Nedenleri	22
4.3.3. Kültür Edilemeyen Bakterilerin Kültürü İçin Uygulanan Yöntemler	22
5. GEREÇ ve YÖNTEM	25
5.1. Gereç	25
5.1.1. Toprak Örnekleri	25
5.1.2. Çalışma Grubu	25
5.1.3. Ağız Boşluğu Örnekleri	26
5.1.4. QS İnhibitörleri	26
5.1.5. Bakteri Suşları	26
5.1.6. Kimyasallar	27
5.1.7. Besiyerleri	27
5.1.8. Sarf Malzemeler	27
5.1.9. Cihazlar	28

5.2. Yöntem	29
5.2.1. QS İnhibitörlerinin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	29
5.2.2. Besiyerlerinin Hazırlanması	30
5.2.2.1. Ticari Besiyerlerinin Hazırlanması	30
5.2.2.2. Diğer Besiyerlerinin Hazırlanması	31
5.2.3. Tampon, Çözelti ve Ayıraçların Hazırlanması	31
5.2.3.1. Potasyum Fosfat Tamponu	31
5.2.3.2. PBS Tamponu	31
5.2.3.3. Transport Sıvısı-Glisero1 Tamponu	32
5.2.3.4 Lizis Tamponu	32
5.2.3.5. TE Tamponu	32
5.2.3.6. Peptonlu Su (%0.1) Çözeltisi	32
5.2.3.7. Oksidaz Test Ayıracı	32
5.2.3.8. Katalaz Test Ayıracı	32
5.2.4. QS İnhibitörlerinin Kullanım Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	32
5.2.5. QS İnhibitör Kombinasyonlarının Hazırlanması	33
5.2.6. QS İnhibisyonunun Biyoindikatör Suşlarda Gösterilmesi	34
5.2.6.1. Viyolasin İnhibisyonu	34
5.2.6.2. Piyosiyanin İnhibisyonu	35
5.2.7. QS İnhibitörlü ve İnhibitörsüz Besiyerlerinin Hazırlanması	36
5.2.8. Ağız Boşluğuna Ait Örneklerin Alınması ve İşlenmesi	36
5.2.9. Kültürlerin Yapılması	37
5.2.10. Toprak Örneklerinin Alınması ve Kültürlerinin Yapılması	38
5.2.11. Bakteri İzolasyonu ve Canlı Hücre Sayısının Tespiti	39
5.2.12. Standart Bakteriyolojik Yöntemler İle Gruplandırma	39
5.2.12.1. Gram Reaksiyonu	39
5.2.12.2. Katalaz Testi	40
5.2.12.3. Oksidaz Testi	40
5.2.12.4. Mitis Salivarius Agar Besiyerinde Alt Kültürlerin Yapılması	40
5.2.12.5. Hemoliz Aktivitesinin Belirlenmesi	40
5.2.13. Moleküler Tanımlama	41

	x
5.2.13.1. Kromozomal DNA İzolasyonu	41
5.2.13.2. 16S rRNA Dizi Analizinin Yapılması	42
5.2.13.3. Dizilerin Değerlendirilmesi	43
5.2.13.4. Filogenetik Analiz	43
5.2.14. İstatistiksel Analiz	43
6. BULGULAR	44
6.1. QS İnhibitörlerinin Kullanılan Konsantrasyonları	44
6.2. Biyoindikatör Suşlarda Pigment İnhibisyonu	44
6.3. Bakteri İzolasyonu ve Canlı Hücre Sayısı	49
6.4. Toprak Örneklerinden Bakteri İzolasyonu	62
6.5. Standart Bakteriyolojik Yöntemler İle Gruplandırma	64
6.6. 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları	65
6.7. Filogenetik Analiz	68
7. TARTIŞMA	70
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	85
9. KAYNAKLAR	88
10. EKLER	97
11. ETİK KURUL ONAYI	104
12. ÖZGEÇMİŞ	105

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Bazı bakterilerin QS sisteminde kullandıkları sinyal molekülleri ve fonksiyonları	11
Tablo 2. Dormant duruma girdiği bilinen bazı patojenler	21
Tablo 3. Çalışmaya dahil edilen bireyler	26
Tablo 4. Çalışmada kullanılan QS inhibitörleri, hazırlanan stok konsantrasyonları ve çözücüler	29
Tablo 5. QS inhibitörlerinin gruplar içerisindeki dağılımı	33
Tablo 6. Toprak örneklerinden yapılan ön çalışma için QS inhibitörlerinden grupların hazırlanması	34
Tablo 7. QS inhibitörleri ve kullanılan konsantrasyonları	44
Tablo 8. QS inhibitörlü ve kontrol besiyerlerinde gözlenen farklı morfolojideki bakteri sayılarının bireyler ve besiyerleri içerisindeki dağılımı	55
Tablo 9. QS inhibitörü içeren besiyerlerinde gözlenen bakterilerin standart bakteriyolojik yöntemlere göre gruplandırılması	64
Tablo 10. HOMD'un veritabanında bulunan taksonlar ile ≥ 98.5 oranında homoloji gösteren suşlar ve benzerlik durumları	66
Tablo 11. HOMD'un veritabanında bulunan taksonlar ile < 98.5 oranında homoloji gösteren suşların NCBI'a göre eşleştikleri taksonlar ve benzerlik durumları	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	AHL sinyal molekülünün yapısı	8
Şekil 2.	AI-2 sinyal molekülünün yapısı	8
Şekil 3.	AIP sinyal molekülünün yapısı	9
Şekil 4.	Siklik dipeptit (L-Prolin-L-Tirozin) sinyal molekülünün yapısı	9
Şekil 5.	Bradyoksetin sinyal molekülünün önerilen yapısı	10
Şekil 6.	Diffüz olabilen sinyal molekülünün yapısı	10
Şekil 7.	<i>C. violaceum</i> 'da viyolasin sentezi ve düzenlenmesi	17
Şekil 8.	<i>C. violaceum</i> 'da viyolasin üretimi inhibisyonunun kantitatif olarak gösterilmesi	45
Şekil 9.	<i>P. aeruginosa</i> 'da pyocyanin üretimi inhibisyonunun kantitatif olarak gösterilmesi	46
Şekil 10.	Viyolasin inhibisyonu yapan grupların <i>C. violaceum</i> 'un üreme eğrisi üzerine etkileri	47
Şekil 11.	Pyocyanin inhibisyonu yapan grup 4'ün <i>P. aeruginosa</i> 'nın üreme eğrisi üzerine etkisi	47
Şekil 12.	Grup 1'in 16 kat sulandırımının <i>C. violaceum</i> 'da viyolasin üretimi üzerine etkisi	48
Şekil 13.	Grup 1'in 16 kat sulandırımının <i>C. violaceum</i> 'un üreme eğrisi üzerine etkisi	48
Şekil 14.	QS inhibitörlü ve kontrol BHIA besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları	49
Şekil 15.	QS inhibitörlü ve kontrol TPSA besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları	49
Şekil 16.	QS inhibitörlü ve kontrol R2A besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları	50
Şekil 17.	QS inhibitörlü ve kontrol BHIA besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları	50
Şekil 18.	QS inhibitörlü ve kontrol TPSA besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları	51

Şekil 19.	QS inhibitörlü ve kontrol R2A besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları	51
Şekil 20.	Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol BHIA besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları	52
Şekil 21.	Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol TPSA besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları	52
Şekil 22.	Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol R2A besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları	53
Şekil 23.	Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol BHIA besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları	53
Şekil 24.	Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol TPSA besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları	54
Şekil 25.	Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol R2A besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları	54
Şekil 26.	Sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde izole olan suşlar ve bu suşların 16S rRNA dizi analizine göre eşleştikleri taksonların filogenetik ağaçtaki konumları	68

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Ağız mikrobiyotasının in vivo kültürü için tasarlanan “minitrapp” sistemi	24
Resim 2. <i>C. violaceum</i> ’da viyolasin üretimi inhibisyonunun kalitatif olarak gösterilmesi	45
Resim 3. <i>P. aeruginosa</i> ’da piyosiyenin üretimi inhibisyonunun kalitatif olarak gösterilmesi	46
Resim 4. OM1-1-48 kodlu suşun grup 4 inhibitörünü içeren BHIA besiyerindeki görüntüsü	56
Resim 5. OM1-2-11 kodlu suşun grup 2 inhibitörünü içeren TPSA besiyerindeki görüntüsü	56
Resim 6. OM1-3-32 kodlu suşun grup 3 inhibitörünü içeren R2A besiyerindeki görüntüsü ü	57
Resim 7. OM2-1-14 kodlu suşun grup 1 inhibitörünü içeren BHIA besiyerindeki görüntüsü	57
Resim 8. OM2-1-43 kodlu suşun grup 1 inhibitörü ile ön zenginleştirme sonrası yine grup 1 kombinasyonunu içeren BHIA besiyerindeki görüntüsü	58
Resim 9. OM3-2-25 kodlu suşun grup 2 inhibitörü ile ön zenginleştirme sonrası yine grup 2 kombinasyonunu içeren R2A besiyerindeki görüntüsü	58
Resim 10. OM3-2-34 kodlu suşun grup 2 inhibitörünü içeren TPSA besiyerindeki görüntüsü	59
Resim 11. OM4-1-47 kodlu suşun grup 4 inhibitörü ile ön zenginleştirme sonrası yine grup 4 kombinasyonunu içeren BHIA besiyerindeki görüntüsü	59
Resim 12. OM5-2-31 kodlu suşun grup 4 inhibitörünü içeren TPSA besiyerindeki görüntüsü	60
Resim 13. OM6-2-41 kodlu suşun grup 1 inhibitörünü içeren TPSA besiyerindeki görüntüsü	60

Resim 14. OM6-2-42 kodlu suşun grup 1 inhibitörünü içeren TPSA besiyerindeki görüntüsü	61
Resim 15. OM6-3-31 (mavi ok) ve OM6-3-14 (kırmızı ok) kodlu suşların grup 5 inhibitörünü içeren R2A besiyerindeki görüntüsü	61
Resim 16. Ön zenginleştirme sonrası ABC inhibitörünü içeren ve içermeyen SEA besiyerinde izole olan kolonilerin görüntüsü	62
Resim 17. Ön zenginleştirme sonrası ACE inhibitörünü içeren ve içermeyen SEA besiyerinde izole olan kolonilerin görüntüsü	63
Resim 18. Ön zenginleştirme sonrası BCE inhibitörünü içeren ve içermeyen R2A besiyerinde izole olan kolonilerin görüntüsü	63
Resim 19. Ön zenginleştirme sonrası CDE inhibitörünü içeren ve içermeyen R2A besiyerinde izole olan kolonilerin görüntüsü	64

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

4-NPO	4- nitro-piridin- <i>N</i> -oksit
AHL	N-açıl homoserin lakton
AI-2	Otoindükleyici-2
AIA	Actinomyces Isolation Agar
AIP	Otoindükleyici peptit
ark.	Arkadaşları
ATCC	American Type Culture Collection
atm	Atmosfer
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
bp	Baz çifti
dak	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
GABA	γ -aminobütirik asit
HCl	Hidrojen Klorür
HOMD	Human Oral Microbiome Database
HOT	Human Oral Takson
LB	Luria Bertani
log	Logaritma
MIK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QS	Quorum Sensing
QSI+	QS İnhibitörlü
QSI-	QS İnhibitörsüz; kontrol besiyeri
R2A	Reasoner's 2A
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Revolutions Per Minute

RTF	Reduced Transfer Fluid
SAM	S-adenosilmetiyonin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEA	Soil Ekstrakt Agar
sp	Species (Tür)
TE	Tris-EDTA
TPSA	Tamponlanmış Peptonlu Su Agar
vb.	Ve Benzeri

Formüller

(NH₄)₂SO₄	Amonyum Sülfat
C₂H₃NaO₂	Sodyum Asetat
CO₂	Karbondioksit
K₂HPO₄	Dipotasyum Hidrojen Fosfat
KCl	Potasyum Klorür
KH₂PO₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
MgSO₄	Magnezyum Sülfat
Na₂CO₃	Sodyum Karbonat
Na₂HPO₄	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit

Singeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
M	Molarite
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
N	Normalite



1. ÖZET

Ağız Mikrobiyotasında Bulunan Canlı Fakat Kültür Edilmeyen Bakterilerin Üretilmesinde Quorum Sensing İnhibitörlerinin Kullanılması

Quorum sensing (QS), bakterilerin çeşitli sinyal moleküllerini kullanarak hem kendi türleri arasında hem de farklı türler arasında iletişim kurması olayıdır. İnsanların ağız boşluğunda bulunan 700'e yakın bakteri türünün yaklaşık 220 tanesi moleküler teknikler ile gösterilmesine rağmen henüz kültür edilememiştir. Bunların kültür edilememesinde bakterilerin doğal ortamlarında QS mekanizması ile popülasyon yoğunluklarını kontrol altında tutmaları ve laboratuvar koşullarında da bu kontrolü devam ettiriyor olmaları neden olarak düşünülmektedir. Bu çalışmada ağız mikrobiyotasında bulunan canlı fakat kültür edilmeyen bakterilerin QS sinyal moleküllerini QS inhibitörü olduğu bilinen maddeler ile keserek popülasyon yoğunluklarını kontrol etme yeteneklerinin ortadan kaldırılması ve kültür edilmeleri amaçlandı. Çalışmaya dahil edilen QS inhibitörlerinin kombinasyonu ile beş ana grup oluşturuldu. Grupların QS inhibitör etkileri biyoindikatör suşlara karşı test edildi. Sağlıklı altı bireyden alınan ağız boşluğu örneklerinden QS inhibitörlü ve inhibitörsüz (kontrol) agar besiyerlerine ekimler yapıldı. Kültürler 35 gün inkübe edildi ve periyodik olarak incelendi. Sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde üreyen suşlar potansiyel ilk defa kültürü gerçekleşmiş suşlar olarak değerlendirildi. Sadece inhibitörlü besiyerlerinde izole olan 121 suş inhibitörlü ve kontrol besiyerlerinde subkültür edildi. İçlerinden seçilen 28 suşın tanımlanmak üzere 16S rRNA dizilemesi yapıldı. 16S rRNA dizi analizlerine göre bu suşların *Actinobacteria*, *Firmicutes* ve *Proteobacteria* şubelerine ait taksonlar ile homoloji gösterdikleri tespit edildi. Üç suşın kültür edilmiş fakat adlandırılmamış *Streptococcus* türleri ile homoloji gösterdikleri, bunlardan birisinin de kültür statüsünün gen bankasında kayıp olarak geçtiği görüldü. Diğer 25 suşın resmi olarak adlandırıldığı ve daha önce kültür edilmiş oldukları tespit edildi. Ancak sonuçlar, QS inhibitörlerinin ağız mikrobiyotasının popülasyon yoğunluğunu değiştirdiğini gösterdi. QS inhibitörlü ve kontrol besiyerlerinin birlikte kullanıldığında tek başına kontrol besiyerine göre izole olan bakteri çeşitliliğinde artışa olanak sağladığını gösterdi. Sonuçlar, bu yöntemin herhangi bir ekosistemden ve farklı vücut bölgelerinden yapılacak bakteri izolasyonu çalışmalarında bakteri tür çeşitliliğini artırmak adına uygulanabilir olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: 16S ribozomal RNA, ağız boşluğu, mikrobiyota, popülasyon yoğunluğu, quorum sensing



2. SUMMARY

Cultivation of Viable but Non-Culturable Bacteria Present in the Oral Microbiota Using Quorum Sensing Inhibitors

Quorum sensing (QS) is a phenomenon by which bacteria communicate between intra- and interspecies. In the human oral cavity, nearly 700 species are found. Although approximately 220 species were identified using molecular techniques, they have not yet been cultured. This is thought to be caused by the fact that they cannot be cultured because of bacterial QS mechanism which controls their population density in their natural environment, and they also continue this process under laboratory conditions. In this study, it was aimed to cultivate viable but non-culturable bacteria in oral microbiota by interrupting their QS signal molecules, which are capable of controlling their population densities, with known QS inhibitor substances. Five groups of QS inhibitors were formed and tested on the bioindicator strains. Oral cavity samples from six healthy individuals were seeded on agar media with and without QS inhibitors. The cultures were incubated up to 35 days and examined periodically for growth. The strains grown only in media containing QS inhibitors were evaluated as potential cultivated strains for the first time. Among the strains which appeared only on the QS inhibitors containing medium, 121 strains were picked and subcultured on media without inhibitors. These strains were then grouped by standard bacteriological methods, 28 representative strains were further identified by 16S rRNA sequence analysis. According to the 16S rRNA sequence analysis, 28 strains were found to be homologous with taxa belonging to phyla of *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. Three strains showed homology with unnamed and cultured *Streptococcus* species. One of these was found to show high homology with *Streptococcus* species with a *culture lost* status according to the gene bank. The other 25 strains were found to be officially named and have been cultured before. However, the results showed that QS inhibitors used in this study altered the population density of oral microbiota. The co-cultures with QS inhibitors allow to isolate more variety of bacteria compared to cultures on control media. The results show that this method is applicable to increase diverse species of bacteria from any ecosystems, and from different regions of human body.

Key Words: 16S ribosomal RNA, microbiota, oral cavity, population density, quorum sensing

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Bakteriler hücre yoğunluğuna bağlı olarak birtakım spesifik gen ekspresyonunun düzenlenmesi adına birbirleriyle haberleşirler. Bu haberleşme otoindükleyici olarak bilinen sinyal molekülleri ile gerçekleşir. Bu olaya quorum sensing (QS) denir. Bu sinyal molekülleri hedef hücrede reseptör proteinlerine bağlanırlar ve ilgili genlerin ekspresyonunu düzenlerler. Bunun sonucunda bakterilerde virülans faktörleri, biyoluminesan üretimi, biyofilm oluşumu, swarming hareketi, sporulasyon, konjugasyon ve popülasyon yoğunluğunu kontrol etme gibi fizyolojik ve fenotipik olaylar düzenlenir (1-3). Kullanılan sinyal molekülü bakteri grubuna göre değişmektedir. Bakterilerde QS ile ilgili birçok sinyal molekülü tanımlanmıştır. Gram negatif bakterilerin kullandıkları N-açıl homoserin lakton (AHL), gram pozitif bakterilerin kullandıkları otoindükleyici peptidler (AIP) ve hem gram negatif hem de gram pozitif bakteriler tarafından kullanılan ve türler arası iletişimi sağlayan otoindükleyici-2 (AI-2) sinyal molekülleri bilinen ve en çok çalışılmış sinyal molekülleridir (3-5).

Ağız boşluğu içerdiği diş, dişeti olukları, yapışık dişeti, dil, yanaklar, dudaklar, sert ve yumuşak damak yapıları ile eşsiz bir mikroçevreye ve mikrobiyotaya sahiptir (6, 7). Ağız boşluğunda 15 farklı şubeden toplamda 700'e yakın farklı prokaryot türü bulunur. Bunların yaklaşık 220 kadarının varlığı moleküler teknikler ile gösterilmiş ve takson basamağında yer edinmiş fakat kültür edilememiştir (8). Bu bakterilerin kültür edilememesinde kültürleri için gerekli esansiyel maddelerin bilinmemesi, kültür koşullarının optimize edilememesi, ko-kültür gereksinimleri gibi birçok faktör rol oynayabilir. Kültür edilmeyen bu bakterilerin ağız ekosisteminde oynadıkları rolün gösterilmesi, varsa patojen etkilerinin açıklanması ve potansiyel biyoaktif madde üretimleri yönünden araştırılmaları için kültürlerinin yapılıp, karakterize edilmeleri önem arz eder (9-12).

Mikroorganizmalar içinde bulundukları ekosisteme uyum sağlamışlardır ve bu çevreye göre gen ekspresyonunu düzenlerler. Örneğin; besin maddeleri homojen olarak yayılmış bir ortamda (okyanus gibi) bakteriler yüksek popülasyon yoğunluğuna ulaşmak yerine besin maddeleri gibi ortamda homojen dağılarak belli bir popülasyon yoğunluğunda sabit kalırlar. Bu kontrol mekanizmasının QS ile düzenlenmesi olasıdır.

Bu tip bakteriler içinde bulundukları bu koşullardan ayrılıp laboratuvar koşullarında kültür edilmeye çalışılırsa yüksek oranda başarısız olunur (1). Kültür edilebilirliği %1 olan çevresel örnekler için bu öngöründen hareketle, ağız mikrobiyotası içinde bu nedenin rol oynayabileceği aşıkardır. Hücre yoğunluğunu QS mekanizması ile bazal seviyede tutmaya çalışan bakterilerin, doğal ortamlarından alınarak sinyallerinin kesilmesi sonucu laboratuvar koşullarında popülasyon kontrol mekanizmalarının değiştirilebileceği ve bu sayede kültür edilemeyen bazı bakterilerin kültür edilebileceği öngörüldü.

Bu tez çalışmasında ağız mikrobiyotasında bulunan canlı fakat kültür edilmeyen bakterilerin QS sinyal moleküllerini QS inhibitörü olduğu bilinen maddeler ile keserek popülasyon yoğunluklarını kontrol etme yeteneklerinin ortadan kaldırılması ve kültür edilmeleri amaçlandı.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Quorum Sensing

QS, hücre yoğunluğuna bağlı olarak diffuz olabilen sinyal moleküllerinin bir reseptör proteine bağlanarak kompleks oluşturması ve bu kompleksin hedef hücrede gen ekspresyonunu artırması veya azaltması durumudur (2-4). Bu durum bakteri popülasyonunun kendine ait fenotipik ve fizyolojik davranışlarını ortaya çıkarması ile sonuçlanır (3). Bu davranışlar biyofilm oluşumu, toksin sentezi, ekzopolisakkarit üretimi, hareketlilik, pigment üretimi, ökaryotik konakta simbiyotik veya patojenik davranışların sergilenmesi, popülasyon yoğunluğunu kontrol etme şeklinde sıralanabilir (2, 3).

QS kavramı ilk olarak bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri*'de tanımlanmıştır (2, 3). Bu bakteri QS mekanizması ile biyoluminesan üretmektedir. Harvard Üniversitesi'nden Kenneth H. Nealson ve John W. Hastings 1970 yılında *V. fischeri* kültürünün yüksek yoğunluğa ulaşınca kadar biyoluminesan üretmediğini ancak bunun hücreler arası bir haberleşme sistemi ile gerçekleşebileceği hipotezini ortaya koymuşlardır. Bu olay aynı bakterinin farklı kültürlerine ait süpernatantların birbirlerine aktarılmasıyla biyoluminesan üretimi gerçekleştiği için bu haberleşme sistemlerine otoindükleyici ismi verilmiş ve otoindükleyicilerin hedef hücrede biyoluminesan üretiminden sorumlu gen ekspresyonunu aktive ettiği düşünülmüştür. Daha sonra bu alanda yapılan çalışmalarda *V. fischeri*'deki otoindükleyici sinyal molekülünün açıl homoserin lakton (AHL) olduğu tanımlanmıştır (3, 13).

V. fischeri, deniz ortamında serbest olarak bulunan veya çeşitli deniz canlıları ile simbiyotik ilişki içerisinde yaşayan bir bakteri türüdür. İçerisinde bulunduğu simbiyotik ilişkiye örnek olarak mürekkep balıkları ile olan birlikteliği verilebilir. Bakteriler mürekkep balıklarının üzerine tip IV fimbriaları ile tutunarak, bölünüp çoğalırlar ve mürekkep balıklarının ışık organı işlevini üstlenirler. Bu sayede mürekkep balıkları suyun altında ışığın yarattığı gölge ile nokturnal avcılardan korunurlar. Bunun yanında, bakterilerde mürekkep balıklarından yaşamaları ve üremeleri için gerekli besin maddelerini karşılarlar. *V. fischeri*'de biyoluminesan üretimi sadece simbiyotik ilişki varlığında gerçekleşir. Tek başına serbest yaşadığı durumlarda biyoluminesan üretimi gerçekleşmez. Çünkü bakterilerin serbest yaşam döneminde sentezlediği AHL molekülü

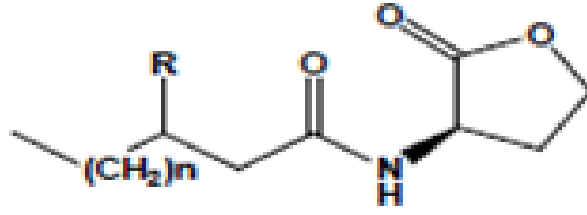
düşük seviyededir ve sentezlenen AHL'de ortama diffüz olarak kaybolur. Fakat mürekkep balığının üzerindeki kapalı alanlara girip simbiyotik ilişki yaşadığı zaman sentezlenip diffüz olan AHL molekülü ortamda birikir. AHL'ler diğer bakterilerde AHL reseptörü olan LuxR ile birleşir ve LuxR yapısı aktifleşerek DNA üzerinde QS ile ilişkili gen bölgesinde biyoluminesan üretimi için gerekli lüsiferaz enzimi ve gerekli proteinlerin sentez ve salınımını artırır. Ayrıca, AHL sentez geni LuxR için hedef bölgedir. Böylece AHL-LuxR kompleksi daha çok AHL sentezini ve salınımı artırır. Bu pozitif feedback sistemi QS mekanizmasını daha da güçlendirir. *V. fischeri*'deki bu sistem benzer olarak birçok gram negatif bakteride bulunmaktadır. QS sisteminde AHL dışında otoindükleyici-2, siklik dipeptidler gibi otoindükleyici sinyal molekülleri vardır (3).

4.1.1. QS Sinyal Molekülleri

QS sinyal molekülleri küçük yapıda organik veya aminoasit dizisinden oluşmuş kısa peptit yapısında bileşiklerdir (4). Hücreden hücreye pasif difüzyon veya aktif transport mekanizması ile geçerler (3). Bazı bakterilerin kullandıkları sinyal molekülleri ve fonksiyonları Tablo 1'de listelenmiştir.

4.1.1.1. AHL Sinyal Molekülleri

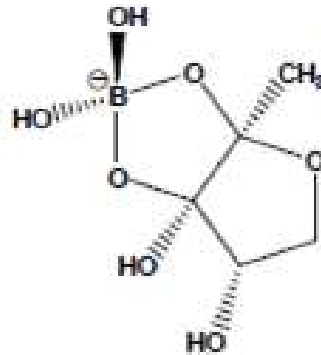
AHL sinyal molekülleri gram negatif bakterilerde en fazla kullanılan QS sinyal molekülüdür. Homoserin lakton halkasına çeşitli uzunlukta açıl yan zincirlerinin bağlanmasıyla oluşurlar (Şekil 1). Açıl yan zincirlerinin uzunluğuna göre kısa veya uzun AHL molekülleri olarak adlandırılırlar. Kısa AHL zincirleri yapısında 4 ile 8 karbon atomu bulundururken, uzun AHL zincirleri 10 ile 18 karbon atomu bulundurur. AHL zincirleri uzunluğu, doygunluğu ve üçüncü karbon atomuna bağlı okzo- ve hidroksil yapılarının varlığına göre çeşitlilik gösterir. Bu durum bakterilerde türler arası QS haberleşme ağının çeşitliliğini oluşturur. Bununla birlikte aynı sinyal molekülü farklı türlerde farklı fenotipik davranışların ortaya çıkmasına neden olabilir. Örneğin, 3-okzo-C₆-AHL sinyal molekülü *V. fischeri*'de biyoluminesan üretiminden sorumlu iken *Erwinia stewartii*'de ekzopolisakkarit üretiminden sorumludur (3, 4).



Şekil 1. AHL sinyal molekülünün yapısı (R=H veya OH ve n=(0–18) (5)

4.1.1.2. AI-2 Sinyal Molekülleri

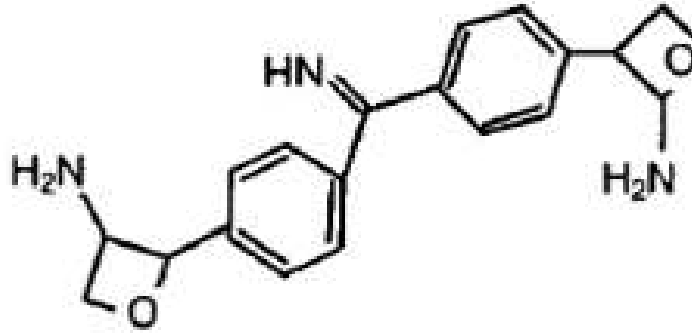
AI-2 sinyal molekülleri ilk olarak *Vibrio harveyi*'de tanımlanmıştır. Daha sonra *Salmonella* sp, *Erwinia* sp, *Escherichia* sp türlerinde de tanımlanmıştır. AI-2 sinyal molekülleri farklı türler arası haberleşmeyi de sağlar. *V. harveyi*'de biyoluminesan üretimi, *Escherichia coli* O157:H7 tip III fimbria sekresyonu, *Shigella flexneri*'de virülans faktörlerinin sentezi gibi QS sistemine bağlı fenotipik davranışların düzenlenmesinden sorumludur. Ayrıca, AI-2'nin birden çok bakteri türünü içeren dış biyofilmlerinin oluşumundan da sorumlu olduğu bilinmektedir. *V. harveyi* AI-2 molekülü birbirine yapışık iki tane beş üyeli halka yapısı ve bu yapıya diester bağı ile bağlı boron atomu içerir (Şekil 2). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'da ise boron atomu içermeyen (2*R*,4*S*)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroksitetrahydrofuran yapısında olduğu görülmüştür. İki bakteri türünde de aynı öncül maddeden (dihidroksil-2,3-pentan) farklı AI-2 türevlerinin sentezlendiği görülmüş, yine de etki mekanizmalarının türler arasında aynı olduğu ve türev farklılığının türler arası QS sistemini olumsuz etkilemediği gösterilmiştir (3).



Şekil 2. AI-2 sinyal molekülünün yapısı (5)

4.1.1.5. Bradyoksetin

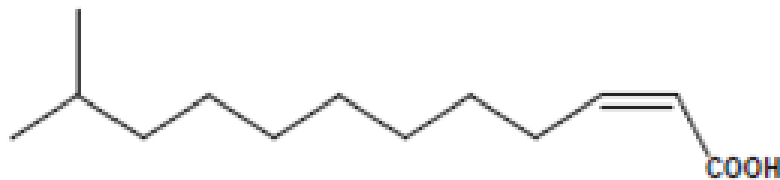
Baklagiller ile simbiyotik ilişki içerisinde bulunan ve azot bakterisi olan *Bradyrhizobium japonicum* türünde hücre yoğunluğuna bağlı *nod* geninin düzenlenmesinden sorumlu sinyal molekülüdür (Şekil 5). Bakteri yüksek hücre yoğunluğuna ulaştığı zaman bradyoksetin sinyal molekülleri *nod* geninin ekspresyonunu azaltır. Böylece bakteriler baklagiller üzerine patojenik etkisini göstermezler ve nodül yapılarını oluşturmazlar. Bradyoksetin, bakteride siderefor benzeri görev üstlenerek ortamdan hücre içine demir alımını sağlar. Eğer ortamda demir eksikse bradyoksetin üretiminde artış olur ve bu artış *nod* geni ekspresyonunu azaltır (3, 14). Bradyoksetin benzeri sinyal molekülleri *Alphaproteobacteria* sınıfına ait başka türlerde de bulunmaktadır (3).



Şekil 5. Bradyoksetin sinyal molekülünün önerilen yapısı (5)

4.1.1.6. Diğer Sinyal Molekülleri

Bahsedilen sinyal molekülleri dışında *E. coli*'de otoindükleyici-3 (AI-3) ve *Xanthomonas campestris*'de diffüz olabilen sinyal faktörü (DSF) gibi (Şekil 6) QS sinyal molekülleri vardır (3).



Şekil 6. Diffüz olabilen sinyal molekülünün yapısı (5)

Tablo 1. Bazı bakterilerin QS sisteminde kullandıkları sinyal molekülleri ve fonksiyonları

Organizma	QS Molekülü	Fenotip	Referans
<i>C. violaceum</i> CV026	C6-AHL	Viyolasin	2
<i>C. violaceum</i> VIR07	C12-AHL	Viyolasin	15
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	3-oxo-C12-AHL	Proteaz, elastaz, ekzotoksin	16
	C4-AHL	Piyosyanin, rhamnolipid	16
<i>Aeromonas hydrophila</i>	C4-AHL	Ekzoproteaz	17
<i>V. fischeri</i>	3-oxo-C6-AHL	Biyolüminesan	18
<i>Burkholderia cepacia</i>	C8-AHL	Proteaz, siderefor	19
<i>E. coli</i>	AI-2	Motilite, biyofilm oluşumu	20, 21
<i>Helicobacter pylori</i>	AI-2	Motilite	22
<i>Streptococcus anginosus</i>	AI-2	Antibiyotiklere dirençlilik	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	AI-2, AIP	Biyofilm oluşumu	24

4.1.2. QS Sinyal Moleküllerinin Sentezi

4.1.2.1. AHL Sentezi

QS mekanizmasının ilk kez tanımlandığı *V. fischeri* üzerinde yapılan çalışmalarda LuxI enzimi ile AHL sentezinin gerçekleştiği gösterilmiştir. AHL sentezinden sorumlu *luxI* geninin *V. fischeri* dışında *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Erwinia*, *Burkholderia* gibi bakterilerde homoloğu bulunmaktadır ve hepsi benzer çalışma mekanizmasına sahiptir. LuxI enzimi S-adenozilmetiyoninin (SAM) amino grubu ile yağ-açıl zincirleri arasında amid bağı kataliz eder, ayrıca açıl-SAM yapısından AHL oluşumunu tetikler. Açıl yan zincir uzunluğu bakteri türleri arasında değişiklik göstermektedir. *V. harveyi* AHL sinyal molekülleri ile biyolüminesan pigmentini üretmektedir. *V. harveyi*'de biyolüminesan üretimi *V. fischeri*'deki LuxI ile homolog olmayan LuxM enzimi ile katalizlenir. Bu da bakteri türleri arasında AHL sentezinde farklı mekanizmaların rol aldığını göstermektedir. Bunun yanında *V. fischeri*'de LuxI'a benzemeyen fakat LuxM homoloğu olan AinS, *Pseudomonas fluorescens*'de 3-OH-C_{14:1}AHL, C₁₀-AHL, C₆-AHL sentezinden sorumlu HdtS tipleri bulunmaktadır (3, 4).

4.1.2.2. AI-2 sentezi

AI-2 sentezi *V. harveyi*'de LuxS enziminin S-ribosilhomosistein'i L-homosistein ve 4,5-dihidroksi-2,3-pentanedion bileşenlerine ayrıştırması ile başlar. Bu aşama gram pozitif ve negatif bakterilerde aynıdır (3).

4.1.2.3. AIP Sentezi

Gram pozitif bakteriler QS sinyal molekülü olarak kullandıkları peptidleri sentezledikten sonra hücre içinde birtakım işlemlerden geçirirler ve peptidleri lakton, tiyolakton, lantionin veya izoprenil grupları ile bileşik oluşturarak olgunlaştırır. Sinyal moleküllerinin olgunlaşması aşamasında peptidlere eklenen bileşikler türler arası sinyal molekül özgünlüğünü oluşturur (25, 26). Bu mekanizma en iyi *S. aureus*'da tanımlanmıştır. Otoindükleyici peptit *agrD* geni ile sentezlenir, ardından AgrB proteini sayesinde tiyolakton halkası bağlanıp olgunlaştırılır ve hücre dışına salınır (27).

4.1.2.4. Diğer Sinyal Moleküllerinin Sentezi

Siklik dipeptidler, uç sıcaklık ve pH değerlerinde lineer dipeptidlerin enzimatik olmayan yolla halkalaşması sonucu oluşurlar. AI-3 sinyali LuxS enzim aracılığıyla, DSF ise *X. campestris*'de *rpjF* ve *rpjB* genlerine bağlı olarak sentezlenmektedir (3).

4.1.3. QS Sinyal Mekanizmaları

4.1.3.1. LuxR Sistemi

LuxR proteini ve homologları AHL tipi sinyal molekülleri için reseptör proteinidir. Sinyal molekülleri bu reseptöre bağlandıktan sonra oluşan kompleks QS ile ilgili genlerin transkripsiyon düzenleyicisi görevini üstlenir. Bununla birlikte pozitif geri bildirim sistemi ile *luxI* genine pozitif geri bildirim etkisi oluşturarak AHL sentezini artırır. LuxR proteini *V. fischeri*'de bulunur ve 3-oxo-C₆-AHL sinyal molekülünün reseptörüdür. Diğer gram negatif bakterilerde LuxR homologu olan reseptör proteinler vardır (3, 4).

4.1.3.2. LuxP/Q Sistemi

LuxP proteini bakteride periplazmik bölgede bulunur ve AI-2 sinyal molekülünü bağlar. Bu bağlanma hücre membranına bağlı ve histidin kinaz görevi üstlenen LuxQ proteinini aktifleştirir (3). LuxQ reseptörünün aktifleşmesi ile sinyal molekülü hücre

içine fosforilasyon aracılığıyla aktarılır. Eğer AI-2 ortamda düşük yoğunlukta ise LuxQ proteini kinaz görevi görerek LuxU proteinini fosforile eder. Bu da LuxO reseptör proteininin fosforile olmasını sağlar. LuxO proteini fosforile olduğu zaman QS ile ilgili genin transkripsiyonunu baskılayan represör proteini görevini üstlenir. AI-2'nin ortamda yüksek yoğunlukta bulunması LuxQ proteininin fosfataz aktivitesi göstermesine neden olarak LuxU, dolayısı ile LuxO proteinlerinin defosforile olmasını sağlar. Defosforile olan LuxO proteini represör proteini görevini yürütemez, sonuç olarak transkripsiyon faktörü olan LuxR'nin (AHL sistemindeki LuxR'den farklı) düzenlediği genlerin ekspresyonu gerçekleşir (13, 28).

4.1.3.3. Oligopeptid Sistemi

Otoindükleyici peptidlerin görev aldığı QS sistemidir. Sentezlendikten sonra modifiye edilen ve olgunlaşan otoindükleyici peptidler aktif taşıma sistemi ile hücre dışına salınır. Salınan ve ortamda belli bir yoğunluğa ulaşan sinyal molekülleri komşu hücrelerin sitoplazmik membran ile ilişkili iki bileşenli histidin kinaz reseptörleri tarafından algılanır. Sinyal-reseptör etkileşimi hücrede ilgili genlerin ekspresyonundan sorumlu transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek aktifleştirir (5, 26).

4.1.4. Bakterilerde QS İnhibisyonu

Bakterilerde QS mekanizması birçok farklı yol ile inhibe olsada inhibisyon mekanizmaları temel olarak üç ana gruba ayrılır. Bunlar; sinyal molekül üretiminin önlenmesi, sinyal moleküllerinin yıkımı ve sinyal molekül alımının önlenmesi şeklinde gruplandırılabilir (25, 29, 30).

4.1.4.1. Önemi

Bakteriler QS mekanizmasını kullanarak çeşitli fenotipik ve fizyolojik davranışlarını kontrol ederler. Son zamanlarda literatürde bakterilerin QS mekanizmaları ve inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalarda büyük bir artış görülmektedir. Bu artışın en önemli nedenlerinden birisi bakteriler arası antibiyotik direncinin yaygınlaşması ve enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmasıdır. Çünkü *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Erwinia* sp., *Agrobacterium tumefaciens* gibi patojenler başta olmak üzere birçok bakteri QS mekanizması ile patojeniteden sorumlu virülans faktörlerinin sentezini düzenlerler.

Bu nedenle bakterilerde QS inhibisyonu enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede alternatif bir tedavi stratejisi olarak görülmekte ve QS inhibitörleri üzerine yapılan araştırmalar günümüzde giderek önem kazanmaktadır. Ayrıca, QS inhibitörleri antibiyotikler gibi bakteriler üzerinde bir baskı oluşturmadıkları için bu mekanizmaya karşı bakteriler tarafından direnç gelişmeyeceği düşünülmektedir (25, 29, 31). QS inhibisyonu yukarıda anlatılan nedenlerden dolayı medikal bir önem taşır. Bu tez çalışmasında QS inhibitörleri, ağız mikrobiyotasındaki bakterilerin haberleşme ağını keserek daha önce kültür edilmemiş bakterilerin kültür edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

4.1.4.2. Sinyal Molekül Üretiminin Önlenmesi

Burada QS sinyal molekül basamaklarında görev alan enzim veya öncül maddeler hedef alınır. Öncül madde analogları, orijinallerini taklit ederek hedef enzime bağlanır ve sinyal molekül üretimi için gerekli gerçek moleküller reaksiyona giremez. Örneğin, L/D-S-adenozilhomosistein ve sinefungin SAM analoglarıdır ve AHL sentetazın substrat görevini üstlenerek sentez basamağını inhibe ederler. Bromin furanonlar ise AI-2 sentezinde görevli LuxS enzimine kovalent bağ ile bağlanarak enzim işlevine engel olurlar (28, 29).

4.1.4.3. Sinyal Moleküllerinin Yıkımı

Sinyal moleküllerinin ortama salındıktan sonra enzimatik olarak yıkımlanması esasına dayanan bir mekanizmadır. Çeşitli enzimler sinyal molekülünün farklı yapılarını hedef alarak etkilerini gösterirler. Örneğin AHL tipi sinyal moleküllerini yıkımlayan laktonaz, açilaz, oksidoredüktaz, paraoksonaz enzimleri gibi (27, 29).

4.1.4.4. Sinyal Molekül Alımının Önlenmesi

Bu mekanizma sinyal moleküllerinin hedef reseptöre bağlanmasının engellenmesi dolayısıyla QS ile ilgili genlerin eksprese olamaması esasına dayanmaktadır. Sinyal molekül analogları, bazı doğal inhibitörler, yapısal olarak sinyal molekülleri ile ilgisi olmayan reseptör antagonistleri buna örnek olarak verilebilir. Örneğin, 4-nitro-piridin-*N*-oksit (4-NPO), p-benzokinon, 2,4,5-tribromoimidazol, halojenik furanonlar gibi maddelerin AHL reseptörüne bağlanması, sinnamaldehidin AI-2 sinyal molekülünde LuxR proteinine bağlanması gibi (28, 29).

4.1.5. QS İnhibitörleri

İnhibitörler, belli bir bakteri popülasyonuna özgü olmayabilir, neticesinde bir inhibitör farklı QS sistemi ile düzenlenen fenotipik davranışları engelleyebilir. Bunun yanında inhibitörler, bir popülasyonda QS inhibisyonu gerçekleştirirken farklı popülasyonlarda QS sistemini destekleyici özellikler gösterebilirler (3). Bu tez çalışmasında kullanılan QS inhibitörlerinden;

2,4,5-tribromoimidazol, 4-NPO, indol ve p-benzokinon maddeleri Rasmussen ve ark. (32) tarafından AHL sinyal molekülleri ile yapısal olarak ilgisi olmayan reseptör antagonistleri olarak tanımlanmıştır. Epigallokateşin gallat (EGCG), ellagik asit ve tannik asit gibi polifenolik bileşiklerin etki mekanizmaları tam olarak anlaşılmassa da AHL sinyal molekülleri için reseptör antagonisti etkisine sahip oldukları düşünülmektedir (29, 33). Sikloheksanon, bir AHL analoğu olup *P. aeruginosa*'da LasR reseptör antagonisti etkisi gösterirken, RhII reseptör proteini için agonist etki gösterir (30).

Açılaz I enzimi, AHL sinyal molekülünde lakton halkası ile açıl yan zincirlerini ayırarak etkisini gösterir. Doğada birçok prokaryot hücresinde bulunan bu enzim, en aktif olarak domuz böbreğinde bulunur (34). Aminoaçılaz enzimi de AHL molekülünü hidrolize ederek etkisini gösterir (35). γ -aminobütirik asit (GABA) protein olmayan bir aminoasittir ve doğal olarak bazı bitkiler tarafından fitopatojenlere karşı korunmak amacıyla sentezlenir. GABA, *A. tumefaciens*'de AHL sinyal molekülünü yıkımlayan laktonaz enzimini kodlayan genin ekspresyonunu artırmaktadır (36, 37).

Siklolösin, AHL sentezinin yapı taşı olan SAM sentez inhibitörüdür ve AHL sentezini önleyerek inhibitör etkisini gösterir (38). S-adenozilhomosistein, AHL sentezinde kullanılan SAM'ın yapısal analogudur. Onun yerine geçerek AHL sentezini inhibe eder (39).

P-kumarik asit bitkiler tarafından üretilen fenilpropanoid yapısında bir maddedir. Fotosentetik bir bakteri olan *Rhodopseudomonas palustris* türünün kullandığı cumaroyl-AHL sinyal molekülünün öncül maddesidir. Fakat milimolar konsantrasyonlarda kullanıldığında bazı gram negatif bakterilerde AHL sinyal mekanizması üzerine inhibitör etki göstermektedir (40). Sinnamaldehit de, fenilpropanoid yapısında olup, AI-2 sinyal sisteminde LuxR reseptör proteinine antagonist etki gösterir (41, 42).

Salisilik asit, nonsteroidal antiinflamatuvur ilaçtır ve *P. aeruginosa*'da AHL inhibisyonu yapar (43). Ksilitol doğada meyve ve sebzelerde bolca bulunan beş karbonlu bir şeker alkolüdür ve özellikle diabetik hastalarında tatlandırıcı olarak kullanılır. *C. violaceum* CV026 suşunda viyolasin inhibisyonuna neden olmaktadır (44). Sarımsak ekstraktı *P. aeruginosa*'da QS sistemini keserek biyofilm oluşumunu inhibe etmektedir (45). Kafein bir alkoloid olup doğal olarak kahvede, çayda ve kismende kakaoda bulunur. *P. aeruginosa*'da AHL sinyal molekülünü inhibe etmektedir (46). Vanilin, vanilya meyvesinde glikozit halinde bulunan hoş kokulu bir maddedir. *A. hydrophila* ve *C. violaceum* CV026 suşlarında AHL sinyal moleküllerini inhibe etmektedir (47, 48).

5-azasitidin, doğal pirimidin nükleozit sitidin molekülüdür, DNA ve RNA metabolizmasını bozar ve QS inhibitör etkisini AI-2 sentezini engelleyerek gösterir (49). Flavonoid grubundan olan apigenin, naringenin, kuersetin ve kamferol ile furokumarin bileşeni olan ve greyfurt suyundan izole edilen bergamottin LuxM ile sentezlenen AHL ve AI-2 sinyal moleküllerine karşı antagonist etki gösterirler (50, 51). Fenotiyazin organik bir bileşik olup *V. harveyi*'de AHL ve AI-2 sinyal moleküllerini inhibe ederek biyoluminesan üretimini baskılar (52).

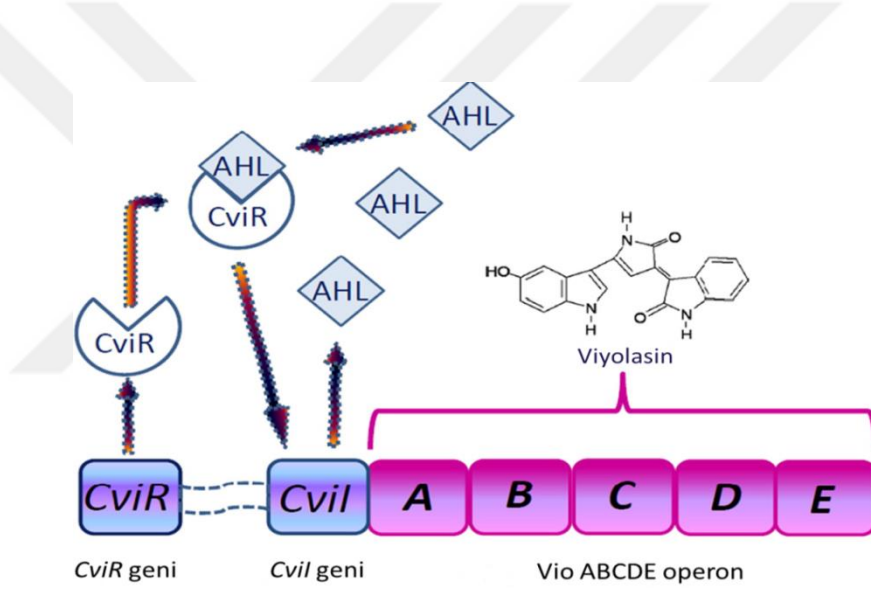
Farnesol, *Candida albicans* tarafından sentezlenen ve *Candida* türleri arasında iletişimden sorumlu sesquiterpen yapısında bir sinyal moleküldür. Bu molekül *Pseudomonas* türlerinde virülans faktörlerinin sentezinde görev alan PQS sinyal moleküllerinin sentezini önlemektedir (53).

Hamamelitannin, adi cadı fındığı bitkisinden elde edilmiş polifenol yapısı gösteren bir bileşiktir. *S. aureus*'ta oligopeptit sinyal sistemi üzerine inhibitör etki göstermektedir (54, 55).

4.1.6. QS İnhibisyonunun Test Edilmesinde Kullanılan Biyoindikatör Suşlar

4.1.6.1. *Chromobacterium violaceum*

C. violaceum doğada yaygın olarak bulunan *Gammaproteobacteria* sınıfına dahil gram negatif bir bakteri türüdür. QS mekanizması ile antibakteriyel özellik gösteren ve suda çözünmeyen viyolasin adında mavi-mor renkte pigment oluşturur (15). Bu türde QS mekanizması LuxI/R mekanizmasının homoloğu olan CviI/R sistemi ile gerçekleşir. CviI S-adenozilmetiyonin ve yağ asitlerinden AHL moleküllerini sentezler. Sentezlenen AHL'ler hücre dışında belli bir yoğunluğa ulaştığı zaman CviR reseptör proteinine bağlanır ve viyolasin sentezinden sorumlu vioABCDE operonunun transkripsiyonunu uyarır (Şekil 7) (56).



Şekil 7. *C. violaceum*'da viyolasin sentezi ve düzenlenmesi (56)

Bu türün viyolasin sentezinde kullandığı AHL molekül yapısı alt suşlarına göre değişiklik gösterir. Örneğin *C. violaceum* ATCC 12472 suşu için viyolasin üretiminde uzun zincirli (C10-C16) AHL molekülleri rol oynarken ATCC 31532 suşu için kısa zincirli (C4-C8) AHL molekülleri rol oynar (15, 56).

4.1.6.2. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa insanlarda fırsatçı enfeksiyonlara yol açan *Gammaproteobacteria* sınıfına dahil gram negatif bir bakteri türüdür. Bu türler QS mekanizması ile virülans faktörlerinin sentezi ve düzenlenmesini sağlar. QS mekanizması LuxI/R mekanizmasının homoloğu olan LasI/R ve RhII/R sistemleri ile gerçekleşir. Ayrıca bu iki sinyal molekülü dışında *Pseudomonas* kinolon sistemi (PQS) vardır. LasI/R sisteminde *lasI* geni 3-oxo-C12-AHL tipi sinyal molekülünün sentezinde görev alır. Çevrede belli bir konsantrasyona ulaşan AHL molekülü LasR reseptörüne bağlanır ve proteaz, elastaz, ekzotoksin gibi virülans faktörlerinden sorumlu genlerin ekspresyonunu artırır. RhII/R sisteminde *rhII* geni C4-AHL sinyal molekülünü sentezler ve bu sinyal molekülü piyosyanin, elastaz, siderefor ve rhamnolipid sentezinde sorumlu genlerin ekspresyonunu artırır (16, 57).

4.2. Ağız Mikrobiyotası

Ağız boşluğu içerdiği diş, dişeti olukları, yapışık dişeti, dil, yanaklar, dudaklar, sert ve yumuşak damak yapıları ile eşsiz bir mikroçevreye sahiptir. Bu çevre tonsiller, farinks, özefagus, östaki borusu, orta kulak, soluk borusu, akciğerler ve sinüsler ile de ilişkilidir. Ağız boşluğunun kendisine has yapısı ve gerek gıda alımı gerekse solunum faaliyetlerinin gerçekleştiği bir bölge olmasından dolayı özgün bir mikrobiyotaya sahiptir (6, 7).

4.2.1. Ağız Boşluğunun Normal Mikrobiyotası

Vücudumuzu mikroorganizmalar ile birlikte paylaşıyoruz. Özellikle lumenli organlarda ve dış dünya ile bağlantılı anatomik bölgelerimizde kolonize olmuş mikroorganizma toplulukları vardır. Bu mikroorganizma topluluğu flora olarak adlandırılır. Ancak, “flora” kelimesi bitkiler ile ilişkili olduğundan son zamanlarda mikroorganizmalar için “biyota” ifadesi literatüre girerek mikrobiyota terimi kullanılmaya başlanmıştır (58). Ağız mikrobiyotasının çoğunluğunu kommensal bakteriler oluşturur. Bu kommensal bakteriler değişen çevresel koşullar ve ağız hijyeninin yetersiz olduğu durumlarda patojen hale geçebilirler (59-61).

Ağız boşluğunda bulunan bakteri türlerinin yoğunluğu ağız boşluğunu oluşturan bölgelere göre değişiklik gösterir (7). İnsan ağız mikrobiyomu veritabanına (Human Oral Microbiome Database, HOMD) göre ağız boşluğunda yaklaşık 700 kadar

prokaryot türün bulunduğu ileri sürülmektedir (8), fakat bu sayının 1200'e ulaşabileceği tahmin edilmektedir (62). Türlerin 400'ü periodontal ceplerde, diğerleri ağız boşluğunun diğer bölgelerinde bulunmaktadır. Bireyler arası mikrobiyota profili değişiklik gösterebilir ağız boşluğunda bulunan türlerin 100-200 kadarı hemen hemen her bireyde ortaktır (63).

HOMD verilerine göre ağız boşluğunda 15 farklı şubeden prokaryot yer almaktadır. Bu şubeler *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gracilibacteria* (GN02), *Proteobacteria*, *Saccharibacteria* (TM7), *Spirochaetes*, SR1, *Synergistetes*, WPS-2'den oluşmaktadır. Bunlar arasında *Euryarchaeota* şubesi arkea olup, kalanlar bakteri alanında bulunur. Bakteriler içerisinde *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* ve *Fusobacteria* şubelerine ait taksonlar daha fazla oranda bulunur (7, 61, 64, 65). Ağız boşluğunu oluşturan bölgelerin tümü ele alındığında *Streptococcus* ve *Veillonella* cinslerine ait türlerin mikrobiyotada baskın oldukları görülmektedir (63).

4.2.2. Ağız Mikrobiyotasının Kültür Edilemeyen Bakterileri

Ağız boşluğunu oluşturan yaklaşık 700 türün %68'i kültür edilebilmektedir. Bu rakam kültür edilebilirliği %1 olan doğal ortamlar ile karşılaştırıldığında (toprak, sediment ve su) oldukça yüksektir (9, 63). Bu bakterilerin kültür edilmeleri ekolojideki rollerinin (patojenite gibi) ortaya konulabilmesi açısından önemlidir (10, 66). Bu bakterilerin laboratuvar koşullarında kültür edilememelerinin birçok nedeni vardır. Örneğin, kültür besiyerinde bakterilerin üremeleri için gerekli besin maddelerinin yetersizliği, ortamda bulunan inhibitör bakteriler gibi. Bu bakterilerin kültür edilebilmelerinde en etkili yöntemin doğal ortamı taklit eden kültür yöntemleri olduğu kabul edilmektedir (9).

Ağız boşluğunun her bölgesinde bulunan mikrobiyotada kültür edilebilirlik oranı tüm popülasyonun hemen hemen yarısıdır (9). Kültür edilemeyen mikrobiyotanın ağız bölgelerindeki dağılımının yüzdesine bakıldığında dil, sert damak ve supragingival plak, %50; yumuşak damak ve tonsiller, %40; subgingival plak, %35; yanak epitel ve yapışık diş eti (maksillar anterior vestibular), %30 şeklindedir (10).

HOMD verilerine göre ağız boşluğunda bulunan yaklaşık 700 türün 220 tanesi henüz kültür edilememiştir. Ağız boşluğunda moleküler teknikler ile belirlenen fakat kültür edilemeyen taksonların, şubelerinde bulunan tüm taksonlar içerisindeki yüzde oranlarına bakıldığında SR1, *Chlorobi*, GN02 ve WPS-2, %100; TM7, %95; *Spirochaetes*, %70; *Fusobacteria*, %50; *Bacteroidetes*, %39; *Chloroflexi* ve *Synergistetes*, %33; *Firmicutes*, %27; *Proteobacteria*, %25; *Actinobacteria*, %14 şeklindedir. *Chlamydiae* ve *Euryarchaeota* şubelerinde ise kültür edilmemiş takson yoktur (7, 8).

Ağız boşluğunda SR1 ve GN02 şubelerinden 5, *Chlorobi*'den 3 ve WPS-2 'den 1 tane takson bulunmaktadır ve bu taksonların hiçbiri kültür edilmemiştir. *Chlamydiae* ve *Euryarchaeota* şubelerinden ise birer tane takson vardır ve bu taksonlar kültür edilmiştir (8).

4.3. Kültür Edilemeyen Bakterilere Genel Bakış

Yeryüzündeki mikroorganizmaların yaklaşık %1'inin *in vitro* koşullarda kültür edildiği düşünülürse kalanların kültür edilmeleri durumunda ekosistemlerinde oynadıkları rolün ne olduğu, varsa patojen etkisinin açıklanması ve potansiyel biyoaktif madde üretimleri yönünden araştırılmaları büyük önem arz eder (9, 67). Günümüzde, yeryüzünde bulunan 31 bakteri şubesinin henüz kültür edilmiş bir taksonu yoktur (67).

Mikroorganizmalar temelde iki fizyolojik durumda bulunurlar. Ya canlıdırlar ya da ölü, fakat canlı olanlar da her zaman üreme aktivasyonu göstermeyebilirler veya üretilmeleri için gerekli şartlar oluşturulamadığından kültür edilemezler. Kültür edilemeyen bakteri terimi ilk olarak çevresel örneklerden yapılan kültürlerde agar besiyerinde sayılan koloni sayıları ile direkt mikroskop sayımları arasındaki tutarsızlıktan doğmuştur (11).

4.3.1. Sınıflandırılması

Kültür edilemeyen bakteriler henüz kültür edilmeyen ve dormant bakteriler olarak iki ana gruba ayrılır (11).

4.3.1.1. Henüz Kültür Edilmeyen Bakteriler

Henüz kültür edilmeyen bakterilerin daha önce kültürü yapılmış bir taksonu yoktur. Bu bakteriler moleküler teknikler ile tanımlanarak taksonomik basamakta yer edinmişlerdir. Kültür edilmeleri için uygun koşullar oluşturulmadıkça ve/veya üremelerini inhibe eden koşullar ortadan kaldırılmadıkça kültür edilmeleri olanaksızdır (11, 12). *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* şubelerinde çok sayıda henüz kültür edilmemiş bakteri taksonları bulunmaktadır (11).

4.3.1.2. Dormant Bakteriler

Dormant bakteriler normalde kültürleri yapılan ve bilinen suşlardır. Fakat çevre şartlarındaki bazı olumsuzluklara (besin maddelerindeki yetersizlik, sıcaklık, oksijen miktarı ve pH değişiklikleri, yüksek ozmotik basınç gibi) karşı bir savunma mekanizması geliştirirler. Bu savunma mekanizmasında bakteriler enerji kaybını en aza indirirler ve üreme faaliyetlerini durdurarak dormant hale geçerler. Dormant durumdaki bakterilerin fenotiplerinde de birtakım değişiklikler ortaya çıkar. Örneğin hücre duvarı kalınlaşır, hücre duvarı ve hücre membranının kimyasal kompozisyonu değişir. Burada amaç bakterinin hayatta kalma şansını artırmaktır. Bu bakterilerin tekrar kültürlerinin yapılması için olumsuz koşulların giderilmesi ve resüsitasyon mekanizmalarını devreye sokacak uyarımların yapılması gerekir (11, 68). Patojen bakterilerin bu forma geçişi özellikle halk sağlığı açısından önem arz eder. Çünkü bu bakteriler resüsite olduktan sonra virülans faktörlerini sergilemeye devam ederler. Dormant duruma girdiği bilinen patojen bakterilerin bazıları Tablo 2’de listelenmiştir (68).

Tablo 2. Dormant duruma girdiği bilinen bazı patojenler (68)

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Burkholderia capecia</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>

4.3.2. Kùltür Edilemeyen Bakterilerin Üretilmemesi Nedenleri

Kùltür edilemeyen bakterilerin üretilmemesinde birçok faktör rol oynayabilir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir (9-12):

- Bakterilerin doğal ortamlarında üremeleri için esansiyel besin maddeleri ve kimyasalların kùltür ortamına yansıtılamaması,
- Karışık kùltürlerde başka bakteriler tarafından salınan toksin benzeri metabolik artıkların diğer türlerin üremesini engellemesi,
- Uygun olmayan kùltür koşulları ve çeşitli stres faktörlerinin bakterilerin dormant döneme girmesine neden olması,
- Bakterinin üremesi için ekosistemindeki diğer bakterilere ihtiyaç duyması (ko-kùltür),
- Besin maddeleri yönünden zengin besiyerlerinde yapılan kùltürler (kùltür besiyerinin zengin içeriği ile hızlı üreyen mikroorganizmaların yavaş üreyenleri maskeleymesi),
- Kùltürlerin inkübasyon koşullarının yeterince uzun tutulmaması,
- Bakteriler arası birtakım üreme faktörleri ve sinyal moleküllerinin *in vitro* ortamlarda yetersiz kalması.

4.3.3. Kùltür Edilemeyen Bakterilerin Kùltürü İçin Uygulanan Yöntemler

Kùltür edilemeyen bakterilerin kùltürü için günümüzde çeşitli teknikler uygulanmaktadır. Bu tekniklere besiyerlerinin modifiye edilmesi, kùltür için uygun fiziksel ve kimyasal koşulların sağlanması, kùltür ortamına üremeyi artırıcı bazı moleküllerin ilave edilmesi örnek olarak verilebilir. Çevresel örneklerden kùltür edilebilirliği artırmak adına çeşitli yöntemler uygulanmış olmasına rağmen günümüzde bir örnekte bulunan tüm bakterilerin kùltür edilmesini sağlayan geçerli bir yöntem halen mevcut değildir.

Bakterileri doğal ortamlarında kùltür etme modeli kùltür edilemeyen bakterilerin üretilmelerinde başarı gösteren en önemli yöntemlerden birisidir. Bu yöntem için diffüzyon çemberleri kullanılır. Diffüzyon çemberleri agar besiyeri ve besiyerini çevreleyen, ortamdan içeri besin maddelerinin geçişini sağlayan fakat bakteri giriş çıkışına izin vermeyen yarı geçirgen bir membran yapısından oluşur. Diffüzyon çemberi ile deniz ortamından daha önce kùltür edilmemiş taksonlar kùltür edilmiştir. Bu

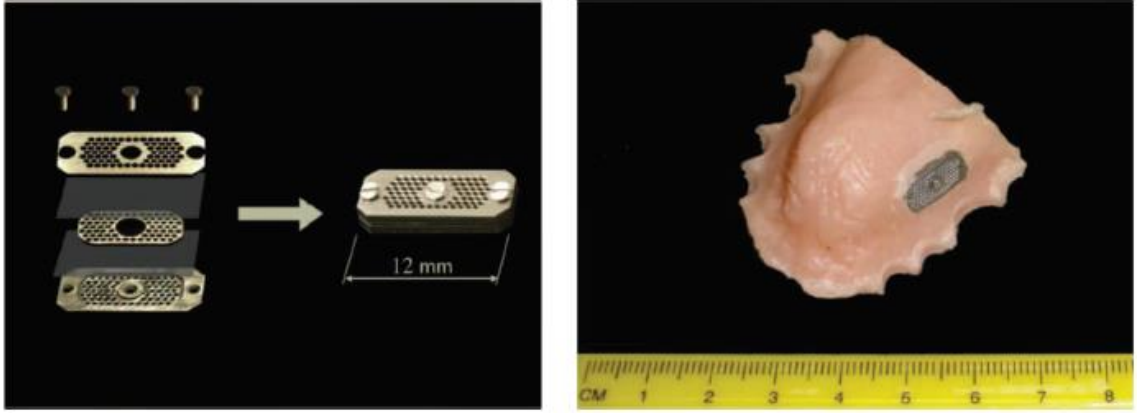
sistemin ağız boşluğuna uyarlanması adına “minitrap” denilen modifiye bir diffüzyon çemberi tasarlanmıştır (Resim 1). Bu aparat bireyin damak yüzeyine yerleştirilmekte ve ağız boşluğundaki bakteriler “minitrap” içerisindeki agar besiyerlerine çekildikten sonra membran kapatılmaktadır. Bu yöntemle ağız boşluğundan 30 yeni türün kültür edildiği bilinmektedir (9, 11, 66).

Besiyerlerine üreme faktörleri veya sinyal moleküllerinin katılması ile daha önce kültür edilmemiş bakterilerin üretildiği veya kültür kalitesinde artış sağlandığı bilinmektedir. Besiyerine LQPEV (5 aminoasitlik peptit) ilave edilmesi ile daha önce kültür edilmemiş *Psychrobacter* sp. MSC33 suşu üretilmiştir (9, 11). Hemin ve menadione ilaveli besiyerlerinde ağız boşluğunda bulunan koyu pigmentli bakterilerin izolasyonu, pyridoksal ve L-sistein ile *Abiotrophia* ve *Granulicatella* türlerinin izolasyonu ve N-asetil muramik asit ile *Tannerella forsythia* izolasyonunun optimal şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir (10).

Kültür edilemeyen bakterilerin üretilmesinde etkili olan bir diğer yöntemde besin içeriği yönünden zengin olmayan besiyerlerinin kullanılmasıdır. Seçici olmayan zenginleştirilmiş besiyerlerinde hızlı üreyen bakterilerin metabolik artıklarından dolayı yavaş üreyenler olumsuz etkilenebilmektedirler. Ayrıca, popülasyondaki dominant türler bu tür besiyerlerinde hızlı üreyerek popülasyonda daha az sayıda bulunan türleri maskeleyebilirler. Bu olumsuzluğun engellenmesi ve daha önce kültür edilmemiş bakterilerin kültürü için besin içeriği düşük besiyerlerinin kullanılması gerekir (9, 10).

Ko-kültür yöntemi ile daha önce kültür edilmemiş bakterilerin kültür edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Ko-kültürde kullanılan bakterilerin kullanılma amacı hedef bakterinin üremesi için gerekli üreme faktörleri veya sinyal moleküllerini sağlamasıdır. Örneğin, *Fusobacterium nucleatum* ko-kültürü ile *Fretibacterium fastidiosum* kültür edilmiştir (9, 10).

İnkübasyon süresinin uzun tutulması daha önce kültür edilmemiş bakterilerin kültür edilebilirliğinde önemli bir faktördür. Özellikle yavaş üreyen mikroorganizmaların koloni oluşturmaları için gerekli zamanın sağlanması gerekir. Ağız boşluğunda bulunan TM7 şubesine ait suşların besin içeriği düşük besiyerlerinde 50 günü geçen inkübasyon sürelerinin sonunda kültür edildiği rapor edilmektedir (9, 10).



Resim 1. Ağız mikrobiyotasının in vivo kültürü için tasarlanan “minitraps” sistemi. Soldaki resimde aparatın yapısı; sağdaki resimde bireye uygulanmak üzere damağa implante edilmiş halini göstermektedir (9)

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Toprak Örnekleri

Bu tez çalışmasına temel teşkil etmek ve tezin hipotezini test etmek amacıyla toprak mikrobiyotası üzerinde bir ön çalışma gerçekleştirildi. Üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından 2014-2016 yılları arasında desteklenen 11542 kodlu “Canlı Fakat Kültür Edilemeyen Bakterilerin Üretilmelerinde Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama) İnhibitörlerinin Kullanılması” adlı bu proje için toprak örnekleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Kanuni Kampüsü 40°59'38"K, 39°46'17"D koordinatları olan ormanlık alandan alındı.

5.1.2. Çalışma Grubu

Ağız boşluğunda bulunan daha önce kültür edilmemiş bakterilerin izolasyonu için sağlıklı ve herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan, erişkin 3 kadın ve 3 erkek bireye ait örnekler kullanıldı. Bireyler KTÜ Diş Hekimliği Fakültesi Oral Diagnoz ve Radyoloji Anabilim Dalına gönüllü olarak çalışmaya katılmayı kabul etmiş kişiler arasından seçildi. Örnek alınacak bireylerden çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarını beyan eden "Onam Formu" alındıktan sonra ağız boşluğuna ait örnekler (tükürük, sürüntü örnekleri ve sert doku örnekleri) uzman bir diş hekimi tarafından alındı. Örneklerin alındığı bireylerin seçiminde aşağıda yazılı özellikler dikkate alındı:

- a. Sigara ve alkol kullanmamış olması,
- b. Son altı ay içerisinde herhangi bir nedenle sistemik bir antibiyotik kullanmamış olması,
- c. Kemoterapi ve/veya ışın tedavisi almamış olması,
- d. Gebe olmaması,
- e. Diyabet, böbrek yetmezliği gibi metabolik bir hastalığın olmaması,
- f. 18-60 yaş aralığında olması,
- g. Halitosiz durumunun olmaması,
- h. Periodontal rahatsızlığının olmaması ve periodontal cep derinliğinin 3 mm'den az olması.

Çalışma grubuna dahil edilen bireylerin kodu, cinsiyeti ve doğum tarihleri Tablo 3'de belirtilmiştir.

Tablo 3. Çalışmaya dahil edilen bireyler

Birey kodu	Cinsiyeti	Doğum Tarihi
OM1	Kadın	17.06.1991
OM2	Kadın	27.05.1988
OM3	Kadın	29.01.1986
OM4	Erkek	11.01.1987
OM5	Erkek	02.10.1993
OM6	Erkek	15.08.1995

5.1.3. Ağız Boşluğu Örnekleri

Bakteri izolasyonu için her bir bireyden yumuşak doku örnekleri (dil dorsumu, tüm sert damak yüzeyi, bukkal mukoza, yapışık dişeti, tonsilla palatina ve boğaz), sert doku örnekleri (iki molar diş, iki premolar diş ve iki kesici dişten olmak üzere subgingival ve supragingival plak örnekleri) ve tükürük örnekleri alındı.

5.1.4. QS İnhibitörleri

Çalışmada QS inhibitörleri olarak EGCG, 2,4,5-tribromoimidazol, 5-azasitidin, açılaz I, apigenin, bergamottin, sinnamaldehit, sikloheksanon, siklolösün, E,E-farnesol, D-aminoaçılaz, ellagik asit, GABA, hamamelitannin, kamferol, kafein, naringenin, p-kumarik asit, fenotiyazin, kuersetin, salisilik asit, tannik asit, ksilitol (Sigma-Aldrich, Almanya), kurkumin, indol, vanilin (Merck, Almanya), 4-NPO, p-benzokinon (ABCR, Almanya) ve S-adenozilhomosistein (Cayman Chemical, ABD) kullanıldı. Doğal QS inhibitörü olarak laboratuvarında hazırlanmış sarımsak ekstraktı kullanıldı.

5.1.5. Bakteri Suşları

QS inhibisyonunun test edilmesinde biyoindikatör suş olarak *C. violaceum* ATCC 12472 ve *P. aeruginosa* PAO1 kullanıldı.

5.1.6. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan sıvı ve katı kimyasallar: Agar (Acumedia, ABD), agaroz, EDTA (Quantum, Yeni Zelanda), gliserol, hidroklorik asit (HCl), sodyum klorür (NaCl) (Riedel de Haen, Almanya), DL-ditiyotritol, dimetilsülfoksit (DMSO), hemin ($C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$), müsin tip III, potasyum klorür (KCl), sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma-Aldrich, ABD), metanol (Chromanorm, Fransa), at serumu, fosfat tampon solüsyonu (PBS, Dulbecco's A) (Oxoid, İngiltere), amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$, disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), L-arjinin, magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), N, N, N',N'-tetra-metil-p-fenilen diamin dihidroklorid, dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), %30'luk hidrojen peroksit, izoamil alkol, pankreatik pepton, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), sodyum karbonat (Na_2CO_3), sodyum hidroksit (NaOH), maya ekstraktı, sükröz, toluen, üre (Merck, Almanya), proteaz pepton No:3 (Becton Dickinson, ABD), kloroform, tris (Amresco, ABD), K vitamini (Konakion®, Roche, Almanya), lizozim (AppliChem, Almanya), RNaz A (Biomatik, Kanada), primerler (27F: 5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3'; 517F: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'; 534R: 5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'; 784F: 5'-AGGATTAGATACCCT-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Macrogen, Güney Kore), PCR master miksi (5x HOT FIREPol® Blend Master Mix), 100 bp DNA marker (Solis BioDyne, Estonya), Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, 5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems, ABD) şeklindedir. Bakterilerin gram reaksiyonlarının belirlenmesinde Gram boyama seti (GBL, Türkiye) kullanıldı.

5.1.7. Besiyerleri

Brain heart infusion broth (BHIB), Soil ekstrakt agar (SEA) (Himedia, Hindistan), R2A (Reasoner's 2A) agar, Luria Bertani (LB) broth (Lab M, İngiltere), Actinomyces isolation agar (AIA), Mitis salivarius agar (Sigma-Aldrich, Almanya) ve hazır %5 koyun kanlı agar (OR-BAK, Türkiye) kullanıldı.

5.1.8. Sarf Malzemeler

Mikrosantrifüj tüpleri (1.5 ve 2 mL), otomatik mikropipet uçları (10, 200 ve 1000 µL), 96 kuyucuklu düztabanlı mikrolept (Greiner Bio-One GmbH, Almanya), erlenmayer (500 ve 1000 mL), falkon tüpleri (15 ve 50 mL), deney tüpleri, lam, mavi

kapaklı cam şişeler (100, 250, 500, 1000 mL), mezür (100, 250, 500, 1000 mL), parafilm, PCR tüpleri, pipetman, plastik petri kapları (90 mm çaplı), test tüp standı (Isolab, Almanya), otomatik mikropipet (20 µL, 200 µL, 1000 µL) (Gilson, ABD), sekiz kanallı otomatik pipet (5-50, 30-300 µL) (Brand Transferpette, Almanya), selüloz asetat filtre (0.22 µM por çaplı) (Sartorius AG, Almanya), serolojik pipetler (5, 10, 25 mL) (Sarstedt, Almanya), pamuklu eküvyon (LP Italiana, İtalya), 1 mm çaplı cam boncuklar (Marienfeld, Almanya), pyrex kültür tüpleri ve eldiven kullanıldı.

5.1.9. Cihazlar

Soğutmalı santrifüj cihazı (Eppendorf, Almanya), mikrosantrifüj (Sigma 1-15, İngiltere), VersaMax ELISA mikrolept okuyucu (Molecular Devices, ABD), çalkalamalı etüv (N-Biotek, Güney Kore), 37°C'lik etüv (Mettler M 421, Almanya), 37°C'lik karbondioksitli etüv (Thermo Scientific, ABD), sınıf II biyogüvenlik kabini (Powtech, Türkiye), su banyosu (FG Bode & Co., Almanya), 4°C buzdolabı (Kleo, Türkiye), -20°C derin dondurucu (Arçelik, Türkiye), -80°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific U570 premium, ABD), pastör fırını (Nüve FN 500, Türkiye), vorteks, stereo mikroskop (Isolab, Almanya), distile su cihazı (Kros A.Ş. Krosclinic, Türkiye), dikey model otoklav (Kermanlar, Türkiye), pH metre (Hanna HI 121, Romanya), manyetik karıştırıcı (yellow^{line} MSC basic C, ABD), mikrodalga fırın (Vestel MW-23, Çin), buz makinesi (Hoshizaki, Japonya), hassas terazi (EMB 200-3, Kern & Sohn GmbH, Almanya), PCR cihazı (Techne TC-512, İngiltere), elektroforez sistemi (RunOneTM güç kaynağı ve Embi Tec RunOneTM elektroforez tankı, ABD) elektroforez tankı (OWL Scientific Easy-CastTM mini jel elektroforez sistemi model B1A, ABD), dijital güç kaynağı (Owl Separation Systems-Lighting VoltTM Power Supply model OSP-300, ABD), UV illuminatör (Cleaver Scientific, MUV21-254/312, İngiltere), ışık mikroskobu (Olympus CX31, Japonya) ve otomatik DNA dizi analizi (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, ABD) cihazları kullanıldı.

5.2. Yöntem

5.2.1. QS İnhibitörlerinin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

QS inhibitörlerinin stok solüsyonlarının hazırlanmasında ve kullanılan çözücülerde üretici firmaların önerileri dikkate alındı. Stokların hazırlanmasında distile su, DMSO, etanol, metanol ve potasyum fosfat tamponu kullanıldı. Sarımsak ekstraktı Rasmussen ve ark. (32) tarif ettiği şekilde hazırlandı. Bunun için kabuğu ve filizinden arındırılmış sarımsaktan 25 g tartıldı ve 50 mL tolue ile bir gece oda sıcaklığında karıştırılarak ekstrakte edildi. İşlem sonrası ekstrakt gazlı bezden süzülerek başka bir temiz şişeye aktarıldı. Ekstrakt üzerine 25 mL steril distile su ilave edildi ve 24 saat süresince oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda şişede oluşan iki fazdan su fazı dikkatlice alındı, 0.22 µm por çapındaki filtre ile steril edildi ve saf sarımsak ekstraktı (1 g/mL) olarak kullanıldı. Tüm stoklar kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

Çalışmada kullanılan QS inhibitörlerinin listesi, hazırlanan stok konsantrasyonları ve çözücüler Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan QS inhibitörleri, hazırlanan stok konsantrasyonları ve çözücüler

QS İnhibitörü	Stok Konsantrasyonu	Çözücü
2,4,5-tribromoimidazol	10 mg/mL	Metanol
4-NPO	25 mg/mL	Distile su
5-azasitidin	10 mg/mL	Distile su
Açılaz I	1 mg/mL	Potasyum Fosfat Tamponu
Apigenin	2 mg/mL	DMSO
Bergamottin	5 mg/mL	DMSO
D-aminoaçılaz	500 µg/mL	Potasyum Fosfat Tamponu
E,E-farnesol	10 mg/mL	Etanol
EGCG	2 mg/mL	DMSO
Ellagik asit	40 mg/mL	DMSO
Fenotiyazin	10 mg/mL	Etanol
GABA	40 mg/mL	Distile su
Hamamelitannin	2 mg/mL	DMSO
İndol	10 mg/mL	Metanol

Tablo 4. (Devam) Çalışmada kullanılan QS inhibitörlerinin listesi, hazırlanan stok konsantrasyonları ve çözücüler

QS İnhibitörü	Stok Konsantrasyonu	Çözücü
Kafein	20 mg/mL	Distile su
Kamferol	5 mg/mL	Etanol
Ksilitol	50 mg/mL	Distile su
Kuersetin	10 mg/mL	DMSO
Kurkumin	10 mg/mL	DMSO
Naringenin	5 mg/mL	DMSO
P-benzokinon	10 mg/mL	Distile su
P-kumarik asit	30 mg/mL	Etanol
S-adenozilhomosistein	1 mg/mL	DMSO
Salisilik asit	10 mg/mL	Etanol
Sarımsak Ekstraktı	1 gr/mL	Distile su
Siklohekzanon	100 mg/mL	Distile su
Siklolösün	20 mg/mL	Distile su
Sinnamaldehit	10 mg/mL	Etanol
Tannik asit	100 mg/mL	Distile su
Vanilin	10 mg/mL	Distile su

5.2.2. Besiyerlerinin Hazırlanması

5.2.2.1. Ticari Besiyerlerinin Hazırlanması

Tüm ticari besiyerleri üretici firmaların önerileri doğrultusunda distile su içinde hazırlandı ve pH değeri konsantre 6 N HCl veya 5 N NaOH ile istenen aralığa getirildi. Sıvı besiyerlerine agar ilavesi ile agar besiyerleri hazırlandı. Besiyerleri 121°C’de, 1.2 atm basınç altında 20 dak süre ile otoklav edildi. Otoklav sonrası su banyosunda 50°C sıcaklığa kadar soğutulan besiyerleri steril petri plaklarına döküldü. Agar besiyerleri katılaştıktan sonra, sıvı besiyerleri ise otoklav sonrası 4°C’de muhafaza edildi.

5.2.2.2. Diğer Besiyerlerinin Hazırlanması

Tamponlanmış Peptonlu Su Agar

Pepton, 10 g/L; NaCl, 5 g/L; KH_2PO_4 , 1.5 g/L; Na_2HPO_4 , 3.5 g/L ve agar distile su içerisinde çözüldükten sonra pH:7.3'e ayarlandı (69). Otoklav ile steril edildikten sonra petri plaklarına döküldü. Besiyerleri donduktan sonra buzdolabına kaldırıldı.

Nutrient Agar

Pepton, 5 g/L; maya ekstraktı, 5 g/L; NaCl, 5 g/L ve agar distile su içerisinde çözüldükten sonra pH:6.8'e ayarlandı. Otoklav ile steril edildikten sonra petri plaklarına döküldü. Besiyerleri donduktan sonra buzdolabına kaldırıldı.

Modifiye SHI Broth

Proteaz pepton No:3, 10 g/L; pepton, 5 g/L; maya ekstraktı, 5 g/L; KCl, 2.5 g/L; hemin, 5 mg/mL stoktan 1 mL/L; üre, 0.06 g/L; L-arjinin, 0.17 g/L; müsin tip III, 2.5 g/L; sükroz, 5 g/L distile su ile karıştırıldıktan sonra pH:7.2'e ayarlandı ve otoklav ile steril edildi. Besiyeri 50°C'e kadar soğutulduktan sonra at serumu, 50 mL/L ve K vitamini, 10 mg/mL stoktan 100 µL/L ilave edildi (70). Besiyeri kullanılıncaya kadar 4°C'de muhafaza edildi.

5.2.3. Tampon, Çözelti ve Ayıraçların Hazırlanması

5.2.3.1. Potasyum Fosfat Tamponu

1 M K_2HPO_4 solüsyonundan 71.7 mL, 1 M KH_2PO_4 solüsyonundan 28.3 mL alınarak başka bir tüpte birleştirildi ve pH:7.2 olarak ölçüldü. Solüsyon otoklavda steril edildikten sonra kullanıldı.

5.2.3.2. PBS Tamponu

PBS tamponu, üretici firmaların önerileri doğrultusunda hazırlandı. Bir tablet, 100 mL distile su içinde çözüldü, pH:7.2 olarak ölçüldü ve otoklav ile steril edildikten sonra kullanıldı.

5.2.3.3. Transport Sıvısı-Glisierol Tamponu

K₂HPO₄, 0.45 g/L; KH₂PO₄, 0.45 g/L; NaCl, 0.9 g/L; (NH₄)₂SO₄, 0.9 g/L; MgSO₄, 0.18 g/L; EDTA, 0.38 g/L; Na₂CO₃, 0.4 g/L; DL-ditiotreitol, 0.2 g/L ve gliserol (son konsantrasyonu %10 olacak şekilde) distile su içinde hazırlandı, otoklav ile steril edildikten sonra kullanıldı (71).

5.2.3.4. Lizis Tamponu

DNA izolasyonunda kullanmak üzere Tris pH:7.5, sodyum asetat, EDTA ve SDS son konsantrasyonları sırasıyla 40 mM, 20 mM, 1 mM ve %1 olacak şekilde steril distile su içerisinde hazırlandı (72).

5.2.3.5. TE Tamponu

DNA izolasyonunda kullanmak üzere 1 M Tris (pH:8.0) ve 0.5 M EDTA (pH:8.0) stok solüsyonlarından son konsantrasyonları sırasıyla 10 mM ve 1 mM olacak şekilde steril distile su içerisinde hazırlandı.

5.2.3.6. Peptonlu Su (%0.1) Çözeltisi

Pepton, 1 g/L ve NaCl, 8.5 g/L distile su içerisinde çözüldükten sonra pH:7.2'e ayarlandı ve otoklav ile steril edildi.

5.2.3.7. Oksidaz Test Ayıracı

N, N, N', N'-tetra-metil-p-fenilen diamin dihidroklorid son konsantrasyonu %1 olacak şekilde steril distile su içerisinde çözüldü, filtre ile steril edildi ve -20°C'de muhafaza edildi.

5.2.3.8. Katalaz Test Ayıracı

Hidrojen peroksidin %30'luk ana stoğundan steril distile su ile %3'lük sulandırımı hazırlandı. Hazırlanan ayıraç koyu bir şişe içerisinde 4°C'de muhafaza edildi.

5.2.4. QS İnhibitörlerinin Kullanım Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

QS inhibitörlerinin ağız mikrobiyotasının üremesini baskılamayan maksimum konsantrasyonda kullanılması hedeflendi. İnhibitörlerin kullanılacak konsantrasyonlarının belirlenmesinde literatürlerde çeşitli bakteriler üzerine QS mekanizması ile düzenlenen fenotipik ve fizyolojik davranışların bloke edilmesi amacıyla yapılmış çalışmalarda kullanılan konsantrasyonları, inhibitörlerin

envanterimizdeki mevcut miktarları ve en önemlisi gereçler kısmında ki çalışma grubunda yazılı şartlara uyan üç kişiye ait tükürük mikrobiyotasına karşı üremeyi baskılamayan konsantrasyonları dikkate alındı. İnhibitörlerin, tükürük mikrobiyotasına karşı üremeyi baskılamayan konsantrasyonlarının tespiti 96 kuyucuklu düz tabanlı pleytte, modifiye SHI sıvı besiyeri ile gerçekleşti. Pleytin tüm kuyucuklarına 150 µL besiyeri konuldu. Her bir inhibitör için her satırın ilk kuyucuğuna 150 µL madde konuldu ve sekiz kanallı otomatik pipet ile inhibitörlerin ½ seri dilüsyonları yapıldı. Son olarak kuyucuklara 50 µL tükürük örneği konuldu. Her bir madde için kuyucuklardan biri sterilite (bakteri içermeyen) kontrolü, diğeri üreme (madde içermeyen) kontrolü olarak kullanıldı. Pleyt, %5 CO₂'li ortamda 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda pleyt OD_{600nm}'de mikropleyt okuyucusunda okutuldu. Üreme kontrol kuyucuğundaki absorbans değeri ile aynı veya yakın absorbans değeri veren inhibitör kuyucuklarındaki konsantrasyonlar not edildi ve ileri çalışmalarda kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesinde yol gösterdi.

5.2.5. QS İnhibitör Kombinasyonlarının Hazırlanması

Ağız boşluğundan bakteri izolasyonu için besiyerlerine katılmak üzere her kombinasyonda altı inhibitör madde olacak şekilde beş grup oluşturuldu. Bunlar grup 1, grup 2, grup 3, grup 4 ve grup 5 olarak adlandırıldı (Tablo 5). Gruplar oluşturulurken inhibitörlerin bakterilerde inhibe ettikleri sinyal molekülleri, çözücüler ve kullanım konsantrasyonları gibi faktörler göz önüne alındı.

Tablo 5. QS inhibitörlerinin gruplar içerisindeki dağılımı

Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
Apigenin	EGCG	Naringenin	Kuersetin	Bergamottin
5-azasitidin	Sinnamaldehit	Kamferol	Hamamelitannin	4-NPO
Ellagik asit	GABA	Kurkumin	Sikloheksanon	Sarımsak Ekstraktı
Vanilin	P-kumarik asit	Ksilitol	S-adenozilhomosistein	Siklölösün
Açılaz I	D-aminoaçılaz	Salisilik asit	P-benzokinon	2,4,5-tribromoimidazol
Fenotiyazin	Kafein	Tannik asit	İndol	E,E-farnesol

Toprak örneklerinden yapılan ön çalışmada her grupta sayıları dört ile beş arasında değişen sayıda inhibitör içeren ve A, B, C, D, E harfleriyle ifade edilen beş grup oluşturuldu. Besiyerlerine katılmak üzere bu gruplardan ABC, ABD, ABE, ACD, ACE, ADE, BCD, BCE, BDE ve CDE kombinasyonları oluşturuldu (Tablo 6).

Tablo 6. Toprak örneklerinden yapılan ön çalışma için QS inhibitörlerinden grupların hazırlanması

A	B	C	D	E
Ksilitol	Vanilin	Tannik asit	S-adenozilhomosistein	Kafein
E,E-farnesol	Salisilik asit	Kuersetin	Sarımsak ekstraktı	Açılaz I
4-NPO	Apigenin	2,4,5-tribromoimidazol	Kurkumin	İndol
Naringenin	P-benzokinon	GABA	Sinnamaldehit	EGCG
Ellagik asit	Siklolösün		5-azasitidin	P-kumarik asit

5.2.6. QS İnhibisyonunun Biyoindikatör Suşlarda Gösterilmesi

Grupların bakterilerde QS mekanizmasını inhibe edip etmedikleri *C. violaceum* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı test edildi. Bu suşların QS mekanizmasını kullanarak sırasıyla viyolasin ve piyosiyenin pigmentlerini ürettikleri bilinmektedir. Gruplar bakteriler üzerine uygulandıktan sonra bakterilerden ölçülen pigment miktarları kontrol (hiçbir madde uygulanmayan) ile kalitatif ve kantitatif olarak karşılaştırıldı.

5.2.6.1. Viyolasin İnhibisyonu

Hazırlanan grupların *C. violaceum* suşunda QS mekanizması ile üretilen viyolasin pigment üretimi üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaçla *C. violaceum* suşunun nutrient agar besiyerindeki taze kültüründen bir koloni alındı ve 5 mL LB sıvı besiyerinde 37°C’de, 220 rpm’de yaklaşık 9 saat kültür edildi. Ardından sıvı kültür taze LB’de 1:100 oranında sulandırıldı ve 4’er mL hacminde kültür tüplerine aktarıldı. Pigment inhibisyonunun kontrolü olarak vanilin, pigment üretim kontrolü olarak ise diğer gruplara konulan inhibitör hacmi kadar steril distile su konuldu. Grupları oluşturan maddeler kültür üzerine eklendikten sonra hacim LB ile 5 mL’e tamamlandı. Kültürler 37°C’de, 220 rpm’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kültürlerden 1 mL alındı ve santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pelet üzerine 1 mL DMSO ilave edildi ve 30 s en yüksek hızda vortekslenerek pigmentin DMSO’a geçişi sağlandı. Ardından

tüpler tekrar santrifüj edildikten sonra süpernatandan 0.2'şer mL alındı ve düz tabanlı 96 kuyucuklu mikropleytin üç kuyucuğuna aktarıldı. Pigmentlerin absorban değerlerini ölçmek için pleyt OD_{585nm}'de mikropleyt okuyucusunda okutuldu. Grupların *C. violaceum*'un üremesi üzerine olumsuz etki gösterip göstermediği üreme eğrisi grafiği oluşturularak tespit edildi. Bu amaçla inkübasyon başlangıcından itibaren her üç saatte bir kültürlerden 10 µL alındı ve seri sulandırılmaları yapıldıktan sonra nutrient agar besiyerine ekildi. Her grup için ölçülen pigment miktarı ve üreme grafikleri kontrol ile karşılaştırıldı (46, 73).

5.2.6.2. Piyosiyanin İnhibisyonu

Hazırlanan grupların *P. aeruginosa* suşunda QS mekanizması ile üretilen piyosiyanin pigmenti üretimi üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla *P. aeruginosa* suşunun nutrient agar besiyerindeki taze kültüründen bir koloni alındı ve 5 mL LB sıvı besiyerinde 37°C'de, 220 rpm'de yaklaşık 9 saat kültür edildi. Ardından sıvı kültür taze LB'de 1:100 oranında sulandırıldı ve 4'er mL hacminde kültür tüplerine aktarıldı. Grupları oluşturan maddeler kültür tüplerine ilave edildikten sonra hacim LB ile 5 mL'e tamamlandı. Pigment inhibisyonunun kontrolü olarak indol, pigment üretim kontrolü olarak ise diğer gruplara konulan inhibitör hacmi kadar steril distile su konuldu. Kültürler 37°C'de, 220 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kültürlerden 1.5 mL alındı ve santrifüj edildi. Süpernatan temiz bir tüpe alındı ve üzerine 0.9 mL kloroform ilave edildi. Karışım 30 s en yüksek hızda vortekslenerek piyosiyanin pigmenti ekstrakte edildi. Ekstraksiyondan sonra tüpler oda sıcaklığında 5 dak bekletildikten sonra kloroform tabakası başka bir temiz tüpe aktarıldı ve üzerine 0.3 mL 0.2 N HCl ilave edildi. Tüp aynı şekilde vortekslendikten sonra santrifüj edildi. Açık pembeden koyu kırmızı renge kadar değişen üst tabakadan 0.2 mL alındı ve düz tabanlı 96 kuyucuklu mikropleytin kuyucuklarına aktarıldı. Pigmentlerin absorbans değerlerini ölçmek için pleyt OD_{520nm}'de mikropleyt okuyucusunda okutuldu. Grupların *P. aeruginosa*'nın üremesi üzerine olumsuz etki gösterip göstermediği üreme eğrisi grafiği oluşturularak tespit edildi. Bu amaçla inkübasyon başlangıcından itibaren her üç saatte bir kültürlerden 10 µL alındı ve seri sulandırılmaları yapıldıktan sonra nutrient agar besiyerine ekildi. Her grup için ölçülen pigment miktarı ve üreme grafikleri kontrol ile karşılaştırıldı (73-76).

5.2.7. QS İnhibitörlü ve İnhibitörsüz Besiyerlerinin Hazırlanması

Ağız boşluğuna ait örneklerin QS inhibitörlü ve inhibitörsüz (kontrol) besiyerlerinde kültürü için BHIA, R2A agar ve tamponlanmış peptonlu su agar (TPSA) besiyerleri hazırlandı. Yöntem olarak çift katlı agar yöntemi kullanıldı. Besiyerleri otoklavlandıktan sonra 90 mm çaplı petri kutularına alt kat için %1.5 konsantrasyonunda agar içeren besiyerlerinden 20 mL, üst kat için donmuş alt kat üzerine inhibitörlü ve kontrol için %0.9 konsantrasyonunda agar içeren besiyerlerinden 5 mL olacak şekilde dağıtıldı. Üst kat için agar besiyeri dökülmeden önce 50°C'e soğutuldu ve ardından inhibitörler ilave edildi. İşlem tüm besiyerleri ve inhibitör grupları için tekrarlandı. İnhibitör bulunmayan (kontrol) besiyerleri için maddesiz üst kat agar besiyeri döküldü. Besiyerleri kullanılıncaya kadar 4°C'de muhafaza edildi ve hazırlandıktan sonra 2 hafta içerisinde tüketildi.

Örneklerin ön zenginleştirme işlemi 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerinde agar besiyerlerinde kullanılan konsantrasyonlarda inhibitör içeren ve içermeyen 1 mL hacmindeki %0.1'lik peptonlu su içerisinde gerçekleşti.

Toprak örnekleri için ayrı hazırlanan QS inhibitör kombinasyonlarından 0.1'er mL alınarak SEA, R2A ve AIA besiyerleri üzerine aktarıldı ve baget yardımıyla yayıldı. Besiyerleri biyogüvenlik kabini içinde kurutulduktan sonra toprak bakterilerinin izolasyonu için kullanıldı.

5.2.8. Ağız Boşluğuna Ait Örneklerin Alınması ve İşlenmesi

Yumuşak ve sert doku örnekleri 1 mL transport sıvısı-gliserol tamponu bulunan 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine, tükürük örnekleri ise 50 mL'lik falkon tüplere alındı. Yumuşak doku örnekleri için bahsi geçen bölgelerde pamuklu eküvyon 20 s süre ile gezdirildi, ardından pamuklu kısım eküvyon çubuğundan kırılarak tampon bulunan mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Gag refleksinden dolayı boğaz örneği en sona bırakıldı. Her yumuşak doku bölgesi için işlem tekrarlandı ve örnekler ayrı tüplere alındı. Sert doku örnekleri için bahsi geçen bölgeler steril küret yardımı ile kazınarak tek bir tüpte toplandı. Küret, tampon bulunan tüpe 4-5 s daldırıldıktan sonra çekildi. Tükürük örneği için bireylerden 3-5 mL uyarılmamış tükürük örneği alındı. Bireyin en az 1 dak boyunca tükürüğünü ağzında biriktirmesi, sonrasında falkon tüpüne aktarması sağlandı (64, 77). Örneklerin alındığı kişilerin örnek alımından 12 saat önce diş

fırçalama, iki saat öncesinden de yeme, içme gibi durumları yapmamış olmasına dikkat edildi (61). Örnekler bireylerden KTÜ Diş Hekimliği Fakültesi Oral Diagnoz ve Radyoloji Anabilim Dalında uzman bir Diş Hekimi tarafından alındı ve işlenmek üzere kısa sürede laboratuvara getirildi.

Laboratuvara gelindiğinde örnekleri içeren mikrosantrifüj tüpleri maksimum hızda yaklaşık 1 dak vortekslendi, yumuşak doku örnekleri için tüplerdeki eküvyon uzaklaştırıldı. Her bir tüpten 0.5 mL başka bir tüpe aktarılarak stoklanmak üzere -80°C 'ye kaldırıldı. Kalan 0.5 mL hacimler 10000 rpm'de 5 dak çöktürüldü, süpernatantlar atıldı. Tüm örneklerdeki peletler birleştirilmek üzere 1 mL hacmindeki transport sıvısı-glisero1 tamponu ile resüspanse edildi ve steril bir deney tüpüne aktarıldı. Tükürük örneği içeren 50 mL'lik falkon tüpler ise 1500 rpm'de 5 dak çöktürüldü. Süpernatandan 1 mL alındı ve 1 mL hacminde yumuşak-sert doku kombinasyonu içeren deney tüpü üzerine ilave edildi. Kalan tükürükten 1 mL alınarak son konsantrasyonu %15 olacak şekilde gliserol ilavesi ile -80°C 'de stoklandı. Ayrıca yumuşak, sert doku ve tükürük kombinasyonunu içeren deney tüpünden 1 mL alınarak gliserol ilavesi ile stoklandı. Deney tüpünde kalan hacimden 0.5 mL alındı ve 4.5 mL PBS solüsyonuna aktarılarak 10^{-1} dilüsyonu hazırlandı. Bu hacimler ile 10^{-5} 'e kadar seri dilüsyonlar hazırlandı.

Ön zenginleştirme için örnek kombinasyonundan 10 μL alındı ve 990 μL inhibitörlü ve inhibitörsüz %0.1'lik peptonlu su içeren tüplere aktarıldı. Tüpler 37°C 'de %5 CO_2 'li ortamda 24 saat inkübasyonda bırakıldı. Süre sonunda kültürden 0.5 mL alındı ve stoklandı. Kalan 0.5 mL'den ise yukarıda anlatıldığı gibi fakat 10^{-4} 'e kadar seri dilüsyonlar hazırlandı.

5.2.9. Kültürlerin Yapılması

Her bir bireye ait örnekler birbirinden bağımsız farklı zamanlarda çalışıldı. Örneklerin işlenmesinden sonra hazırlanan 10^{-3} - 10^{-5} ve ön zenginleştirmeden sonra hazırlanan 10^{-2} - 10^{-4} dilüsyonlardan 0.1'er mL alınarak inhibitörlü ve kontrol besiyerlerine yayma ekim yapıldı. Ön zenginleştirme sonrası hangi inhibitör grubunun ön zenginleştirme işlemi yapıldı ise yine o grubu içeren besiyerine ekimler yapıldı. Yani grup 1 ön zenginleştirme sonrası o örnekten yine grup 1 inhibitörleri içeren besiyerlerine, maddesiz ön zenginleştirme sonrası o örnekten yine madde içermeyen

besiyerlerine ekimler yapıldı. Kùltürler yaklaşık 35 gün süre ile 37°C’de %5 CO₂’li ortamda inkübasyona bırakıldı.

5.2.10. Toprak Örneklerinin Alınması ve Kùltürlerinin Yapılması

Toprak örnekleri ağaç köküne yakın 20-25 cm derinlikten aseptik şartlarda alındı. Alınan toprak örneğinden 250 g tartılarak steril 2 L’lik beher içerisine aktarıldı. Örnek üzerine 250 mL steril distile su ilave edildi ve magnetik karıştırıcıda 3 saat karıştırılarak toprak içeriğı ekstrakte edildi. Süre sonunda ekstrakt gazlı bezden süzülerek 50 mL’lik falkon tüplerine aktarıldı.

Toprak mikrobiyotasını QS inhibitörleri ile muamele etmek ve sinyal iletişimini sıvı besiyerinde kesmek için ön zenginleştirme kùltür işlemi uygulandı. Bunun için 96 kuyucuklu pleytin tüm kuyucuklarına 50 µL hacminde 2x konsantrasyonunda %0.1’lik peptonlu su konuldu. Her bir kombinasyon için ilk kuyucuğa 50 µL toprak ekstraktı konuldu ve 24 kuyucuk için ½ seri dilüsyon yapıldı. Ardından her kombinasyon için ayrılan 24 kuyucuğa 50 µL 2x konsantrasyonundaki QS inhibitör grubundan ilave edildi. Ön zenginleştirme işlemi her madde kombinasyonu ve QS inhibitörü içermeyen kontrol grubu için gerçekleşti. Pleytler 12 gün süresince oda sıcaklığında inkübe edildi. Ön zenginleştirme sonrası her bir kombinasyona ait olan 24 kuyucuktaki kùltürler ayrı ayrı 1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüplerinde birleştirildi. Birleştirilmiş kùltürlerden mikrosantrifüj tüpler içerisinde 10⁻⁷’e kadar seri sulandırımalar hazırlandı. Geri kalan kùltür ise son konsantrasyonu %15 gliserol olacak şekilde -80°C’de stoklandı. Hazırlanan 10⁻⁶ ve 10⁻⁷ sulandırmalardan 50’şer µL alınarak QS inhibitörü içeren ve içermeyen AIA, R2A ve SEA besiyerlerine yayma ekim yöntemi ile ekildi. Her kombinasyona ait ön zenginleştirme sonrası yine aynı kombinasyonu içeren agar besiyerlerine ve kontrol olarak hiçbir kombinasyon içermeyen agar besiyerlerine ekimler yapıldı. Besiyerleri 28°C’de inkübe edildi ve günlük olarak koloni sayısı ve QS inhibitörü içeren besiyerlerinde var olup kontrol besiyerlerinde bulunmayan farklı morfolojiye sahip koloni varlığı yönünden incelendi.

5.2.11. Bakteri İzolasyonu ve Canlı Hücre Sayısının Tespiti

Ağız boşluğuna ait örneklerin kültürleri bakteri izolasyonu yönünden değerlendirilirken besiyeri ve bireyler kendi içerisinde değerlendirildi. Kùltürler değerlendirilirken öncelikle kontrol besiyerlerinde izole olan bakteri profili belirlendi. Kontrol besiyerinde izole olan her koloninin varlığı inhibitör içeren besiyerlerinde de arandı. Sonra kùltürler, inhibitör içeren besiyerlerinde bulunan fakat kontrol besiyerlerinde bulunmayan kolonilerin varlığı yönünden araştırıldı. Kùltürler çıplak gözle ve stereo mikroskop altında değerlendirildi. Tüm izole olan koloniler fenotipik özelliklerine göre tanımlandı ve adlandırıldı. Adlandırma, birey (OM1, OM2 gibi)-besiyeri (1, BHIA; 2, TPSA; 3, R2A)-suş numarası (1, 2 gibi) şeklinde bir kodlama ile yapıldı. Örneğin; OM3-2-34 [OM3, birey kodu (O: oral, M: mikrobiyota, 3: üçüncü birey); 2, TPSA besiyerinde; 34, suş numarası].

Sadece inhibitörlü besiyerlerinde gözlenen suşlarının, gözlendikleri besiyerlerinde subkùltürleri yapıldı. Saflaştırılan kùltürler ileride kullanılmak üzere -80°C’de stoklandı.

Örnekteki canlı hücre sayısının hesaplanmasında “ $N = C/V \cdot \Delta$ ” formülü kullanıldı (N: cfu/mL, C: Sayılan koloni sayısı V: Besiyerine inoküle edilen miktar (mL cinsinden), Δ : Dilüsyon sayısı).

5.2.12. Standart Bakteriyolojik Yöntemler İle Gruplandırma

İnhibitör içeren besiyerlerinde üreyen fakat kontrol besiyerlerinde üremeyen suşlar potansiyel daha önce kùltür edilmemiş suşlar olarak değerlendirildi. Suşlar gram reaksiyonu, hücre şekli, katalaz, oksidaz reaksiyonları, hemoliz özellikleri ve Mitis salivarius agar üzerindeki koloni konfigürasyonlarına göre gruplandırıldı. Bu şekilde izole edilen bakterilerin fenotipik olarak tanımlanması ve benzerlilik oranının ortaya konulması hedeflendi.

5.2.12.1. Gram Reaksiyonu

Gram boyama üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleşti. Bunun için temiz bir lam üzerine bir damla distile su damlatıldı. Steril kürdan yardımı ile kùltürden tek koloni alınarak önce lamın kenarında ezildi ve sonra distile su ile süspanse edildi. Lam, biyogüvenlik kabini içinde kurutuldu. Ardından ateşten üç defa geçirilerek fikse

edildikten sonra sırası ile kristal viyole ile bir dakika, lügol solüsyonu ile bir dakika, denatüre alkol ile 30 s ve fuksin boyası ile 30 s olacak şekilde boyandı. Lam kuruduktan sonra ışık mikroskopunda 100x büyütme objektifi, immersiye yağı kullanılarak incelendi. Pembe renkli boyanan bakteriler gram negatif, mavi-mor renkte boyanan bakteriler gram pozitif olarak değerlendirildi.

5.2.12.2. Katalaz Testi

Temiz bir lam üzerine bir damla %3'lik hidrojen peroksit damlatıldı. Katı besiyerinde üremiş kolonilerden steril kürdan yardımı ile tek koloni alınarak önce lamin üzerinde ezildi, sonra hidrojen peroksit ile karıştırıldı. Karışımdan sonra kabarcıkların görülmesi veya çıkması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

5.2.12.3. Oksidaz Testi

Kurutma kağıdı yardımı ile izole kolonilerden küçük bir parça alındı ve üzerine %1'lik kovaks ayırıcı damlatıldı. Otuz saniye içinde koloninin mavi-mor renge dönüşmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

5.2.12.4. Mitis Salivarius Agar Besiyerinde Alt Kültürlerin Yapılması

Katalaz reaksiyonu negatif, gram pozitif kok yapısında olan suşlar, streptokoklar için seçici ve ayırt edici bir besiyeri olan Mitis Salivarius agar besiyerine pasajlandı. Kültürler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda üç gün süre ile inkübe edildi. Kültürler günlük olarak çıplak gözle ve stereo mikroskop altında incelenerek fenotipik özellikleri not edildi. Besiyeri içerisinde bulunan potasyum tellurit *Enterococcus* türlerinin siyah koloni oluşturmaya, trypan mavisinin *Streptococcus* türlerince absorbe olup mavi renkte koloniler oluşturmaya, *Streptococcus salivarius* besiyerindeki sükrözü metabolize ederek “gum-drop” olarak adlandırılan damla şeklinde iri ve gösterişli koloniler oluşturmaya neden olmaktadır.

5.2.12.5. Hemoliz Aktivitesinin Belirlenmesi

Sadece inhibitörlü besiyerlerinde gözlenen suşlar %5 koyun kanlı agara pasajlanarak 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda üç gün süre ile inkübe edildi. Kültürler günlük olarak negatoskop üzerinde incelenerek hemoliz özellikleri belirlendi. Bakterilerin %5 koyun kanlı agarda eritrositleri parçalama özelliklerine göre; tam

hemoliz oluşturması durumunda beta (β), kısmi hemoliz oluşturması durumunda alfa (α) ve hiç hemoliz oluşturmaması durumunda gama (γ) hemolitik olarak değerlendirildi.

5.2.13. Moleküler Tanımlama

Sadece inhibitörlü besiyerlerinde gözlenen suşlardan 28 tanesinin kısmi 16S rRNA dizilemesi yapılarak tanımlanmaları amaçlandı. Bunun için suşların kromozomal DNA izolasyonu, 16S rRNA gen bölgelerinin PCR ile oğaltılması, PCR rnlerinin saflaştırılması ve DNA dizi analizi işlemleri gerçekleşti.

5.2.13.1. Kromozomal DNA İzolasyonu

Sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde gözlenen ve -80°C 'de saklanan suşlar %5 koyun kanlı agarda canlandırıldı. Canlandırma sonrası iyi izole olmuş 15-20 koloni pamuklu eküvyon ile toplanarak 1 mL PBS bulunan tüplerde süspanse edildi. Tüpler 12000 rpm'de 5 dak santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve peletler DNA izolasyonu yapıncaya kadar -20°C 'e tutuldu. DNA izolasyonu yapılacağı zaman pelet -20°C 'den çıkartıldı ve 200 μL lizis tamponu ile resüspanse edildi. Aktinomiset grubuna ait bakteriler için pelet üzerine tampon hacmini geçmeyecek şekilde cam boncuklar katıldı. Lizis tamponu ilavesinden sonra tüpler maksimum hızda 1-2 dak süre ile vorteks edildi. Ardından tampon zerine 10 μL lizozim (10 mg/mL) ilave edildikten sonra tüpler 37°C 'de 30 dak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra lizat zerine 10 μL RNaz A, 10 mg/mL ilave edildi ve 56°C 'de 30 dak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda lizat zerine 70 μL 5 M NaCl konuldu, tüpler el ile yavaşça karıştırıldı ve 12000 rpm'de 10 dak santrifüj edildi. Temiz lizat, steril başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine eşit miktarda kloroform/izoamil alkol (24/1) karışımından ilave edildikten sonra tp yavaşça ve en az 50 kez alt st edilerek karıştırıldı. Ardından, 12000 rpm'de 5 dak süre santrifüj edildi ve lizat başka bir steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu lizat hacminin iki katı kadar miktarda -20°C 'de bekletilmiş %96'lık etanol ilave edildi ve tüpler -20°C 'de 30 dak bekletildi. Süre sonunda tüpler 12000 rpm'de 5 dak santrifüj edilerek presipite edildi. Süpernatant atıldıktan sonra presipitat 50-100 μL hacmindeki -20°C 'de bekletilmiş %70 etanol ile iki kez yıkandı. İki yıkama arasında 12000 rpm'de 1 dak santrifügasyon işlemi oldu. Son santrifüjden sonra süpernatant atıldı, etanol kalıntısı kalmaması için pelet pastör fırınında kurutulduktan sonra 50-100 μL TE tamponu ile çözüldü ve kullanılıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi (72).

5.2.13.2. 16S rRNA Dizi Analizinin Yapılması

İzole edilen bakterilerin 16S rRNA gen bölgelerinin çoğaltılması için *E. coli* 16S rRNA'sında sırasıyla 8-27 ve 1492-1508 pozisyonlarına karşılık gelen ve 10 µM konsantrasyonundaki universal 27F ve 1492R primer çiftleri kullanıldı. Mikrosantrifüj tüpüne toplam hacim 380 µL olacak şekilde sırası ile 276 µL steril su, 80 µL hazır master miks, 12 µL 27F, ve 12 µL 1492R ilave edildi, ardından tüp yavaşça karıştırıldıktan sonra 38 µL hacminde PCR tüplerine dağıtıldı. Tüplere son olarak 2 µL kalıp DNA ilave edildi. PCR işlemi termal döngü cihazında başlangıç denatürasyonu 94°C'de iki dakika, her biri kendi içinde 94°C'de 45 s denatürasyon, 55°C'de bir dakika primer bağlanması ve 72°C'de bir dakika uzama basamaklarından oluşan toplam 35 döngüde gerçekleştirildi. Son olarak 72°C'de 10 dak ilave bir uzama basamağı yer aldı. Elde edilen PCR ürünleri %1.2 agaroz içeren jelde yürütüldü ve yaklaşık 1500 bp büyüklüğündeki DNA fragmenti 100 bp DNA marker kullanılarak belirlendi. PCR ürünleri dizi analizi öncesinde PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen, ABD) ile saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen temizlenmiş ürünler %1.2 agaroz içeren jelde yürütüldü ve incelendi.

Dizi analizi için 27F, 517F, 534R, 784F ve 1492R primerleri kullanıldı. Bir reaksiyon için PCR tüpüne 1 µL Big Dye reaksiyon karışımı, 1.5 µL sekanslama tamponu, 0.5 µL primer, 100 bp DNA marker ile bant kalınlığı kıyaslanmış ve reaksiyona ilave edilmesi hesaplanmış saflaştırılmış PCR ürünü ilave edildi. Reaksiyon hacminin 10 µL'e tamamlanması için kalan hacim kadar steril distile su eklendi. Diğer primerler için işlem başka bir PCR tüpünde tekrarlandı. PCR işlemi termal döngü cihazında başlangıç denatürasyonu 96°C'de iki dakika, her biri kendi içinde 96°C'de 15 s denatürasyon, 50°C'de 15 s primer bağlanması ve 60°C'de iki dakika uzama basamaklarından oluşan toplam 25 döngüde gerçekleştirildi. Dizi analizi otomatize DNA sekans cihazı ile yapıldı.

5.2.13.3. Dizilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen diziler gen bankası (www.homd.org) ile 16S rRNA BLAST programı kullanılarak karşılaştırıldı ve homolojileri belirlendi. Çıkan listede en yüksek skorda homoloji gösteren takson ile benzerlik yüzdesi karşılaştırıldı. Benzerlik oranı ≥ 98.5 ise dizilerin eşleşen takson ile identik olduğu kanısına varıldı ve o taksonun sayfasından suşun adlandırılma ve kültür edilme durumlarına bakıldı (8). HOMD’da bulunan taksonlar ile < 98.5 oranında eşleşme gösteren diziler ve toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin dizileri başka bir gen bankasının (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) nükleotit BLAST (blastn) programında karşılaştırıldı ve homolojileri belirlendi.

5.2.13.4. Filogenetik Analiz

Filogenetik ağaç MEGA6 programında (<http://www.megasoftware.net/>) (78) Neighbor-joining istatistiksel yöntemi (79) ve “Maximum Composite Likelihood” modeli kullanılarak oluşturuldu.

5.2.14. İstatistiksel Analiz

İnhibitör grupların *C. violaceum* ve *P. aeruginosa*’da sırasıyla viyolasin ve piyosiyanın pigment üretimleri ve üreme üzerine etkileri birbirinden bağımsız en az üç deney ile tekrarlandı. QS inhibitör grupları ile kontrol kültürleri arasında pigment üretimi, izole olan canlı hücre sayısı gibi parametrelerde anlamlı bir farkın olup olmadığı IBM-SPSS 23. Paket programında (IBM, Armonk, NY, ABD) Mann-Whitney *U* testi ile belirlendi ve $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması şeklinde ifade edildi.

6. BULGULAR

6.1. QS İnhibitörlerinin Kullanılan Konsantrasyonları

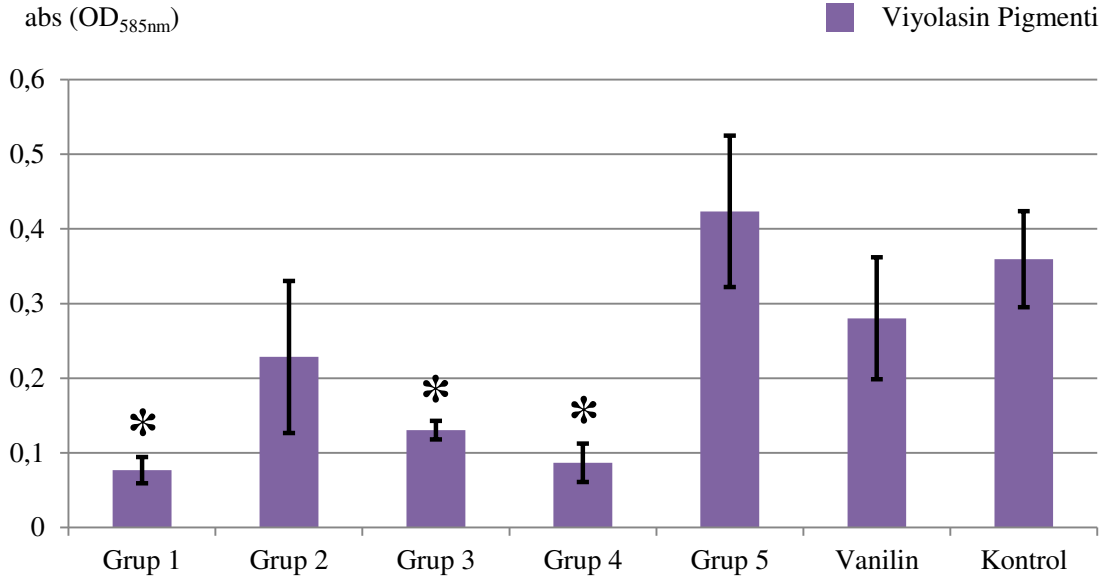
QS inhibitörlerinin tükürük mikrobiyotası üzerine üreme-gelişmeyi baskılamayan konsantrasyonları referans alınarak çalışmada kullanılan konsantrasyonları belirlendi (Tablo 7).

Tablo 7. QS inhibitörleri ve kullanılan konsantrasyonları (µg/mL)

QS İnhibitörü	Konsantrasyon (µg/mL)	QS İnhibitörü	Konsantrasyon (µg/mL)
2,4,5-tribromoimidazol	4	Kafein	100
4-NPO	5	Ksilitol	500
5-azasitidin	3	Kuersetin	25
Açılaz I	1	Kurkumin	5
Apigenin	2	Naringenin	40
Bergamottin	2	P-benzokinon	2
D-aminoaçılaz	1	P-kumarik asit	25
EGCG	2	S-adenozilhomosistein	1
Ellagik asit	20	Salisilik asit	9
E,E-farnesol	15	Sarımsak Ekstraktı	2000
Fenotiyazin	40	Sinamaldehit	10
GABA	60	Sikloheksanon	100
Hamamelitannin	2	Siklolösün	100
İndol	117	Tannik asit	10
Kamferol	3	Vanilin	100

6.2. Biyoindikatör Suşlarda Pigment İnhibisyonu

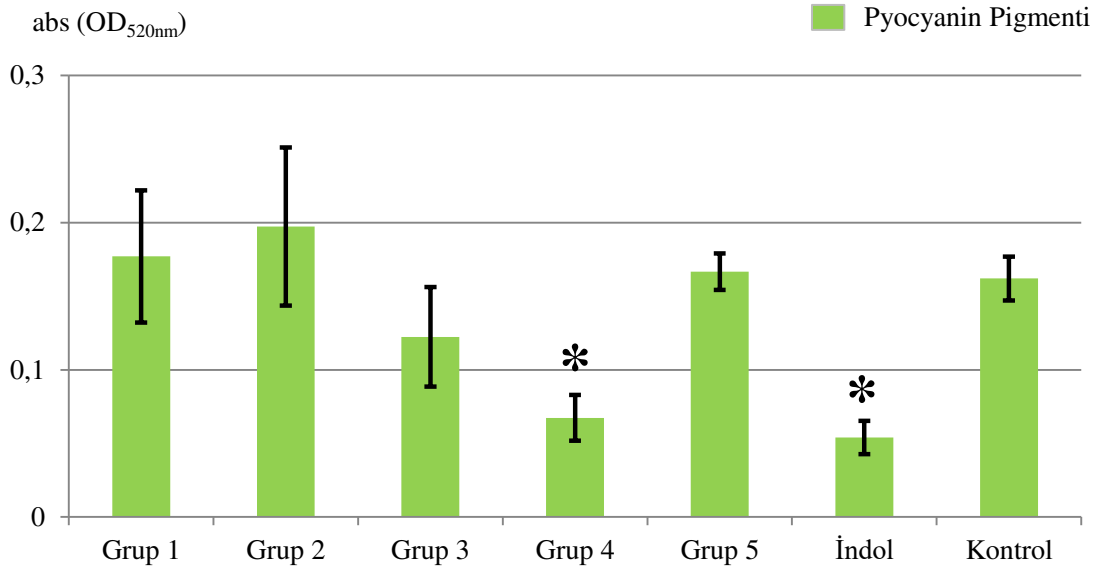
Oluşturulan grupların bakterilerde QS mekanizmasını inhibe edip etmedikleri biyoindikatör suşlara karşı test edildi. Gruplar bakteriler üzerine test edildikten sonra ölçülen pigment miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Grup 1 ve grup 3'ün viyolasin üretimini; grup 4'ün viyolasin ve piyosiyanin üretimini kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde inhibe ettikleri tespit edildi (Şekil 8, 9 ve Resim 2, 3).



Şekil 8. *C. violaceum*'da viyolasin üretimi inhibisyonunun kantitatif olarak gösterilmesi. Grup 1, 3 ve 4'ün kontrole göre viyolasin üretimini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği görülmektedir (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, * $p < 0.05$)



Resim 2. *C. violaceum*'da viyolasin üretimi inhibisyonunun kalitatif olarak gösterilmesi (1, grup 1; 2, grup 2; 3, grup 3; 4, grup 4; 5, grup 5; 6, vanilin; 7, kontrol)

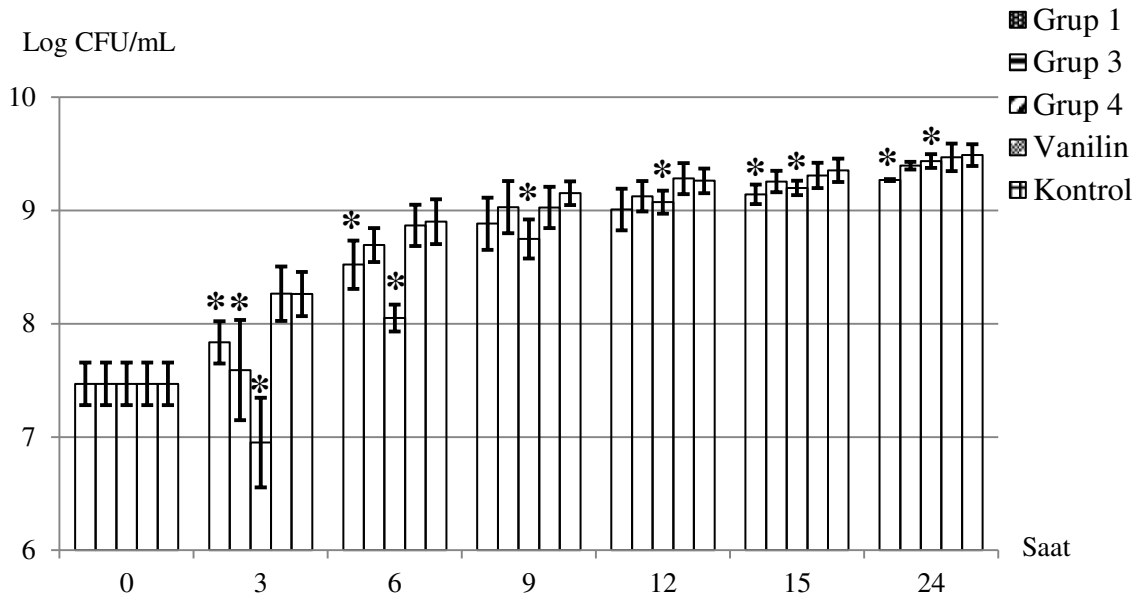


Şekil 9. *P. aeruginosa*'da piyosiyanin üretimi inhibisyonunun kantitatif olarak gösterilmesi. Grup 4'ün kontrole göre piyocyanin üretimini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği görülmektedir (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, * $p < 0.05$)

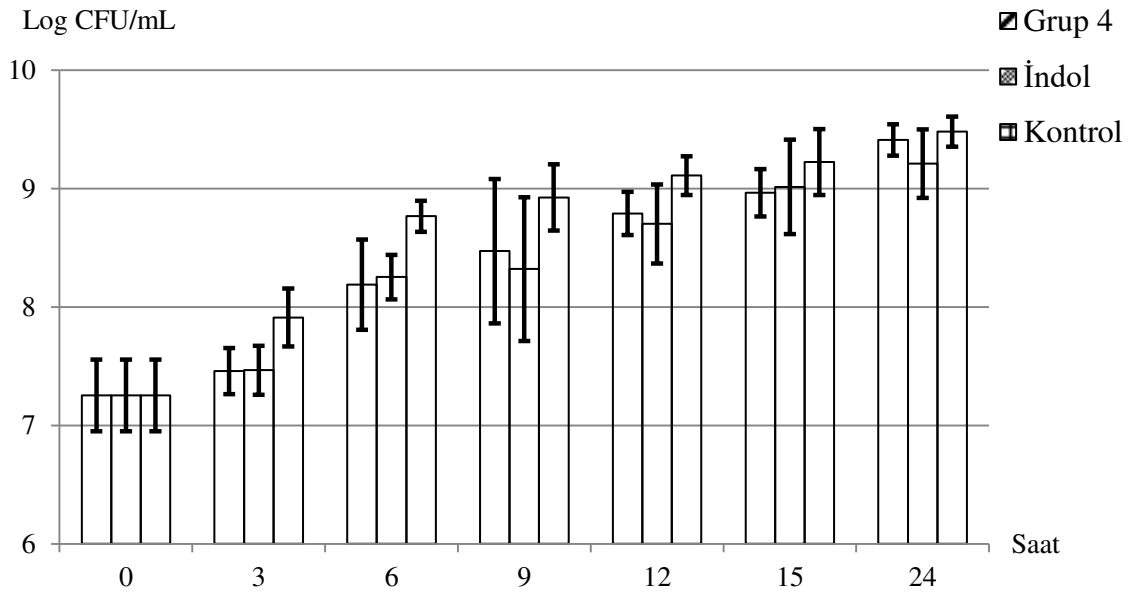


Resim 3. *P. aeruginosa*'da piyosiyanin üretimi inhibisyonunun kalitatif olarak gösterilmesi (1, grup 1; 2, grup 2; 3, grup 3; 4, grup 4; 5, grup 5; 6, indol; 7, kontrol)

Bunun yanında grup 1, 3 ve 4'ün *C. violaceum*'un üreme eğrisi grafiğinin çeşitli evrelerinde kontrole göre üremeyi istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde baskıladıkları tespit edildi (Şekil 10). Grup 4'ün ise *P. aeruginosa* suşunda neden olduğu baskılanma istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmedi (Şekil 11).



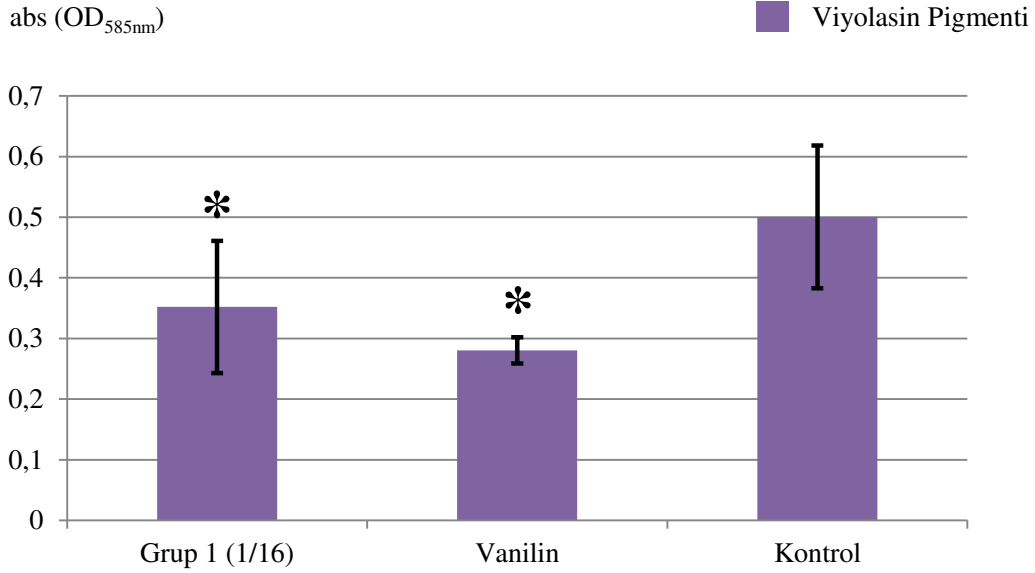
Şekil 10. Viyolasin inhibisyonu yapan grupların *C. violaceum*'un üreme eğrisi üzerine etkileri (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, * $p < 0.05$)



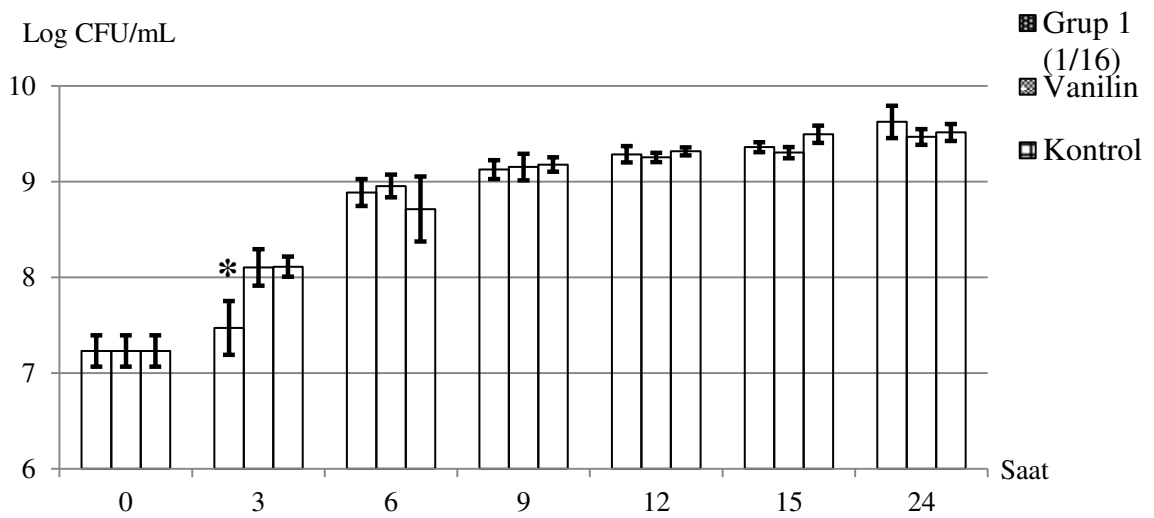
Şekil 11. Piyosiyanin inhibisyonu yapan grup 4'ün *P. aeruginosa*'nın üreme eğrisi üzerine etkisi (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, $p > 0.05$)

Grup 1, 3 ve 4'ün *C. violaceum*'un üremesi üzerine yaptıkları baskılamadan dolayı bu grupları oluşturan inhibitörler iki kat seri sulandırılarak deney tekrarlandı. Grup 3 ve 4 kombinasyonunu oluşturan maddeler en fazla dört kat sulandırıldığında viyolasin pigment üretimindeki baskılanmanın kontrole göre anlamlı bir şekilde devam

ettiği ancak, üremedeki baskılanmanın da üreme eğrisi grafiğinin altıncı saatinde devam ettiği tespit edildi ($p<0.05$). Grup 1'i oluşturan inhibitörlerin 16 kat sulandırımında bile viyolasin inhibisyonunun kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu (Şekil 12), fakat üreme eğrisinin üçüncü saatindeki baskılanmanın da istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde devam ettiği tespit edildi (Şekil 13).



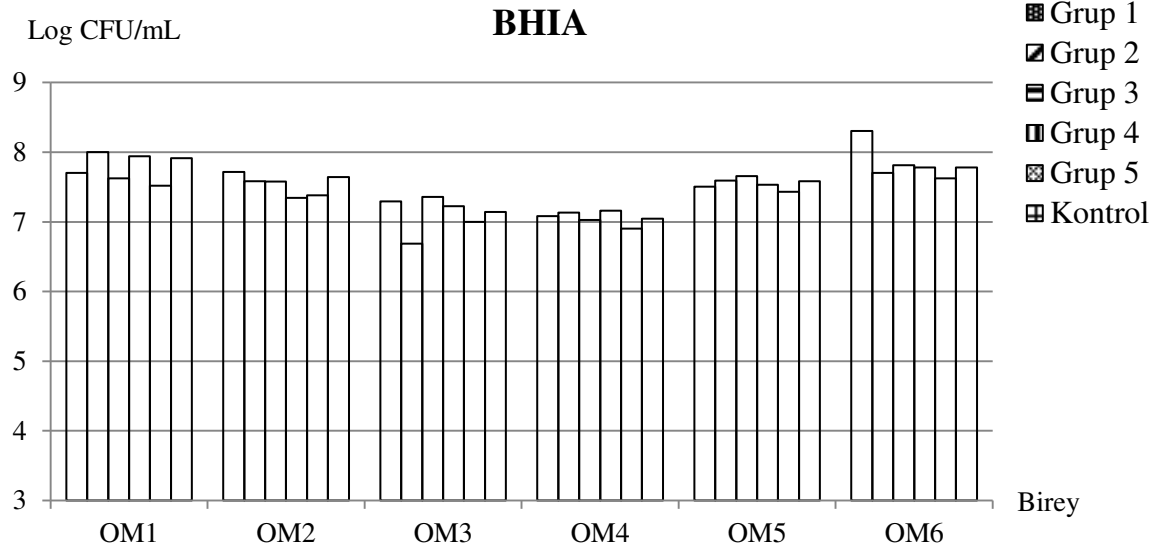
Şekil 12. Grup 1'in 16 kat sulandırımının *C. violaceum*'da viyolasin üretimi üzerine etkisi. Grup 1'in 16 kat sulandırımının kontrole göre viyolasin üretimini istatistiksel olarak anlamlı şekilde inhibe ettiği görülmektedir (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, * $p<0.05$)



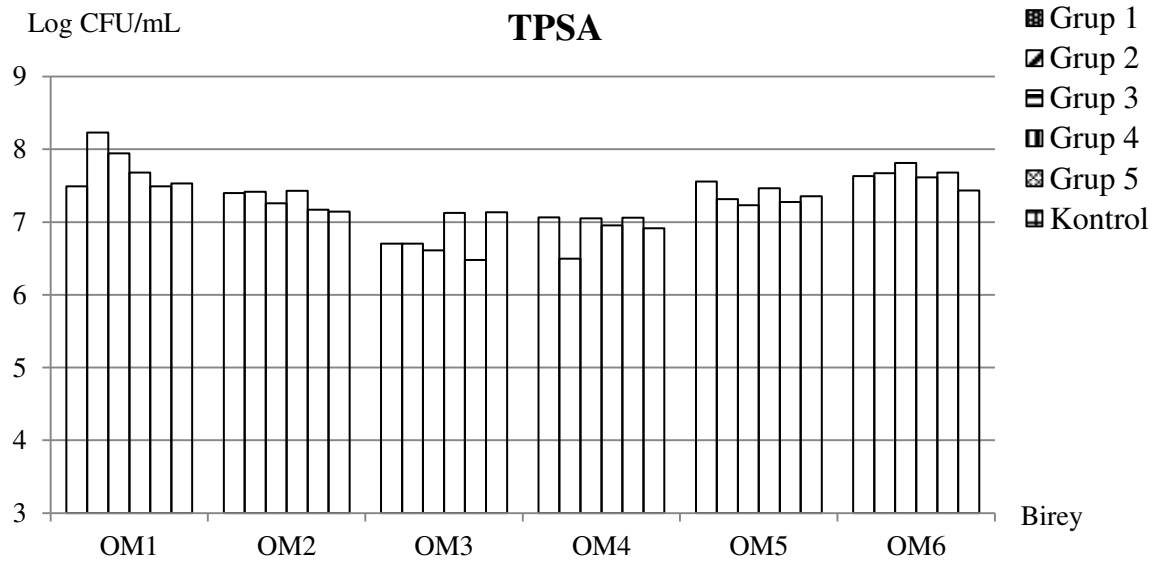
Şekil 13. Grup 1'in 16 kat sulandırımının *C. violaceum*'un üreme eğrisi üzerine etkisi (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, * $p<0.05$)

6.3. Bakteri İzolasyonu ve Canlı Hücre Sayısı

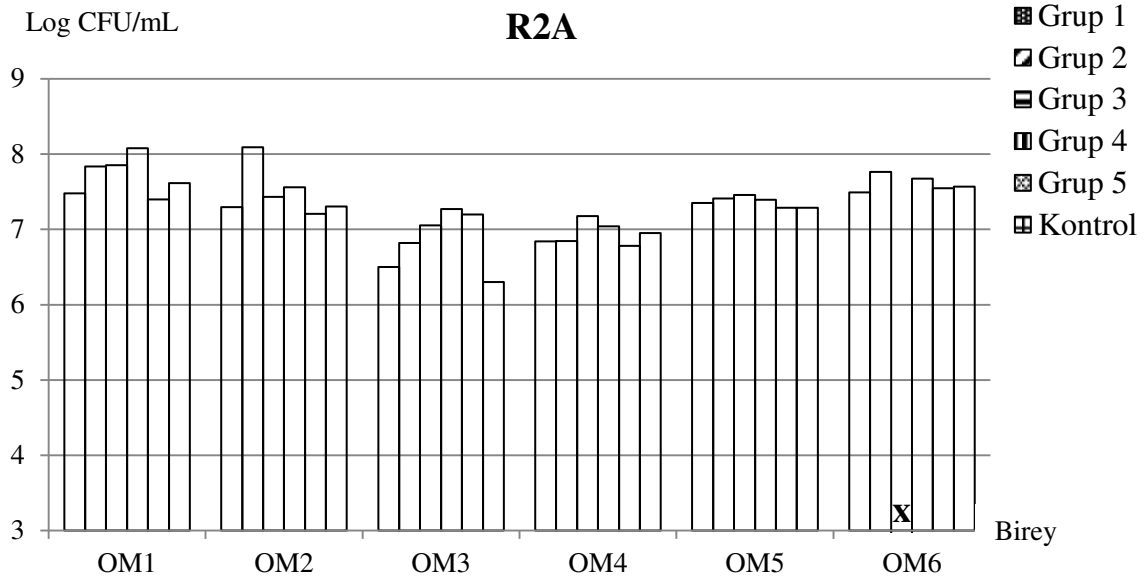
Bireylerin ağız boşluğu örneklerinden yapılan direkt ekimler sonrası QS inhibitörlü ve kontrol besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları (Log CFU/mL) Şekil 14-16 arasında sunulmuştur.



Şekil 14. QS inhibitörlü ve kontrol BHIA besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları

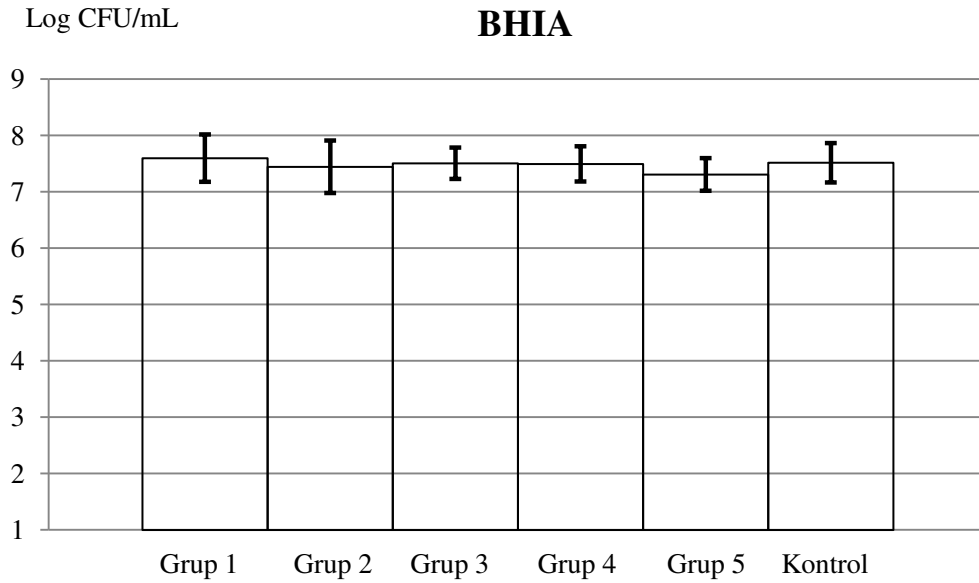


Şekil 15. QS inhibitörlü ve kontrol TPSA besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları

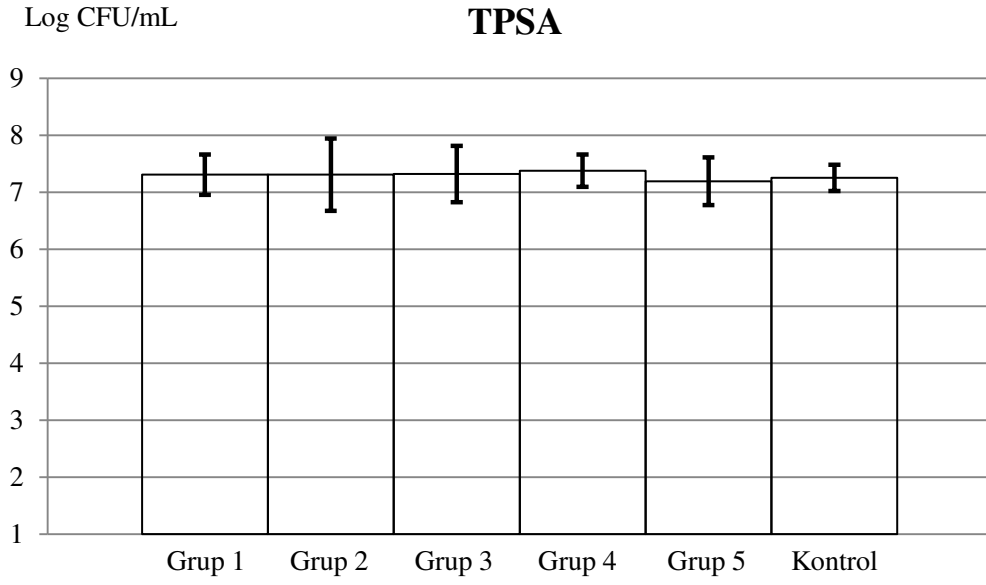


Şekil 16. QS inhibitörlü ve kontrol R2A besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları (x: swarming tarzındaki üremelerden dolayı sayım yapılamadı)

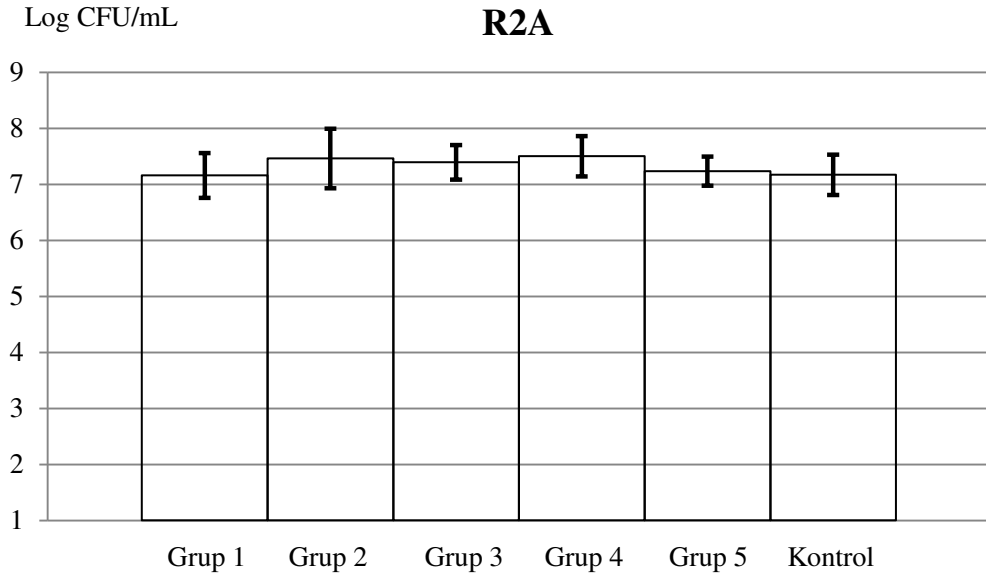
Bireylerin ortalaması alındığında izole edilen canlı hücre sayısı bakımından QS inhibitör grupları ile kontrol besiyerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p>0.05$) tespit edilmedi (Şekil 17-19).



Şekil 17. QS inhibitörlü ve kontrol BHIA besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, $p>0.05$)

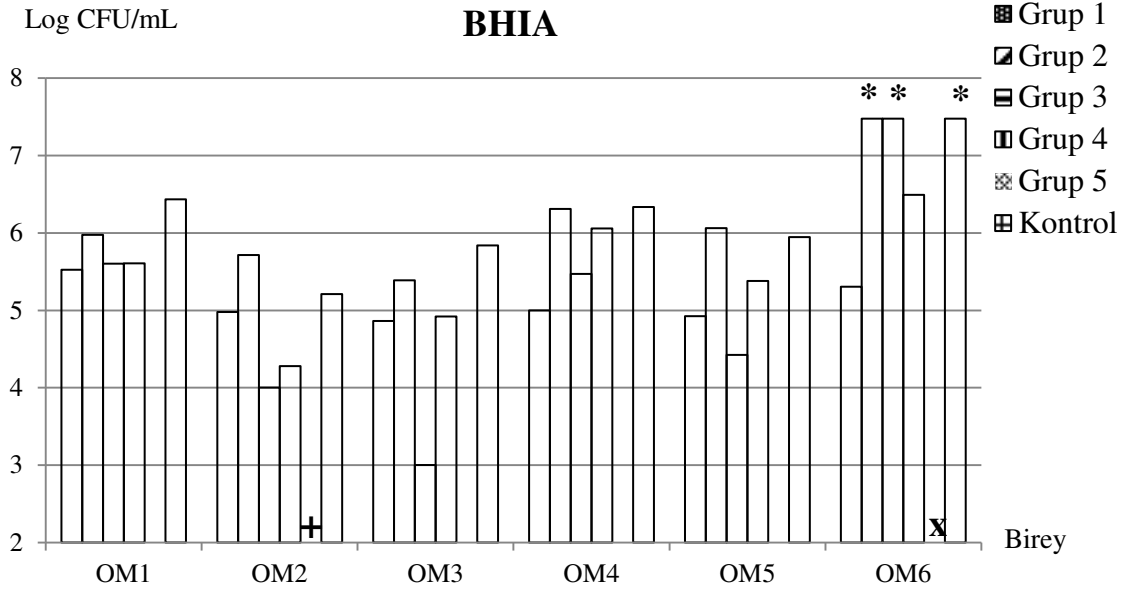


Şekil 18. QS inhibitörlü ve kontrol TPSA besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, $p>0.05$)

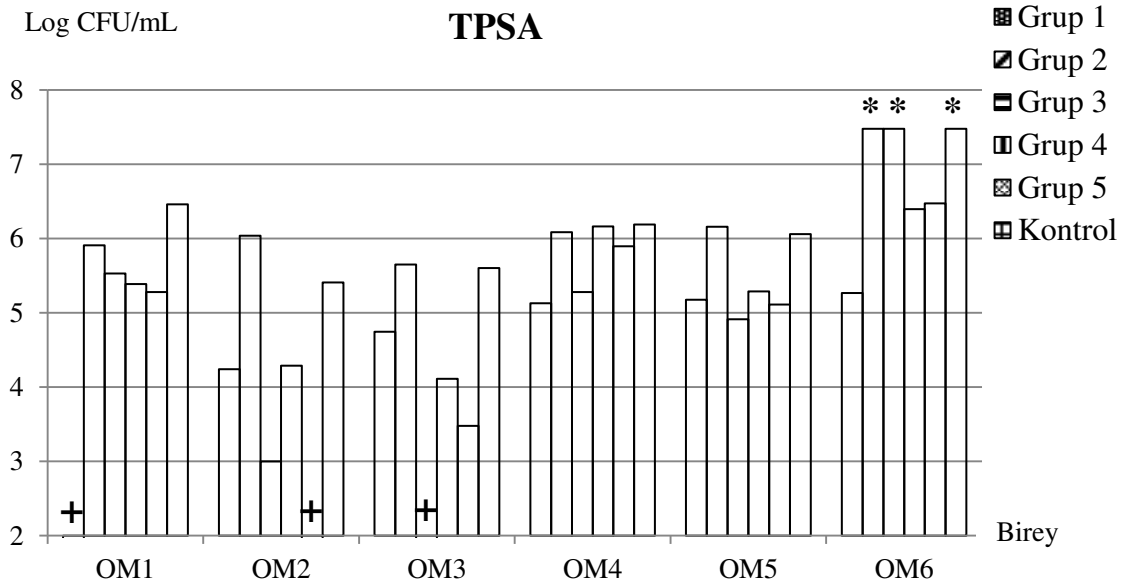


Şekil 19. QS inhibitörlü ve kontrol R2A besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, $p>0.05$)

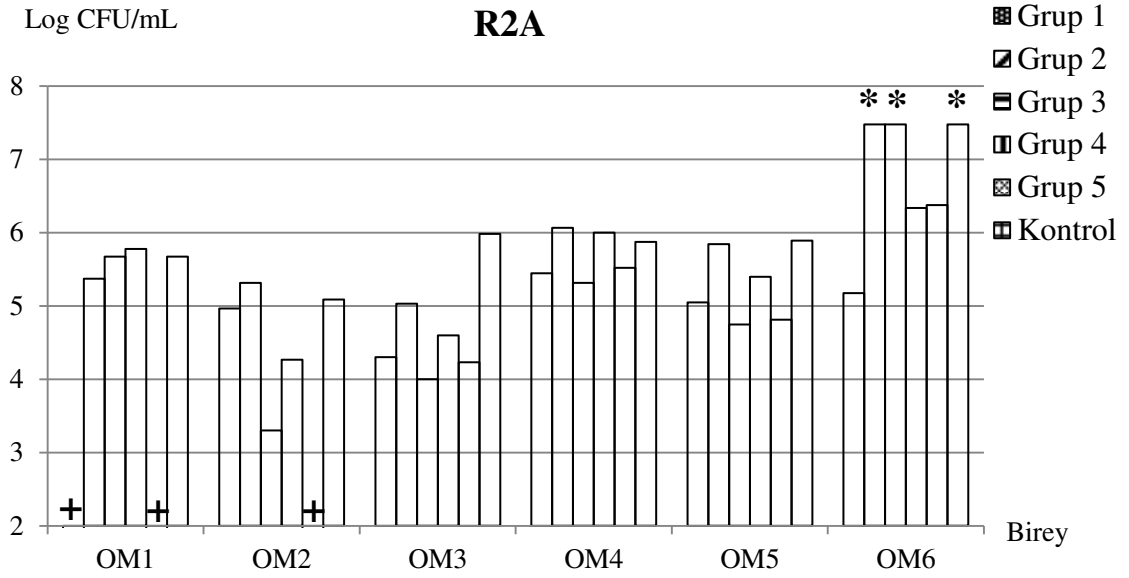
Ön zenginleştirme işlemleri yapılmış bireylerin ağız boşluğu örneklerinin QS inhibitörlü ve kontrol besiyerlerine yapılan ekimlerinden izole edilen canlı hücre sayıları (Log CFU/mL) Şekil 20-22 arasında sunulmuştur.



Şekil 20. Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol BHIA besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları (x: swarming tarzındaki üremelerden dolayı sayım yapılamadı, *: izole olan canlı hücre sayısı 7.47 log değerinden büyüktür, +: izole olan canlı hücre sayısı 3 log değerinden küçüktür)

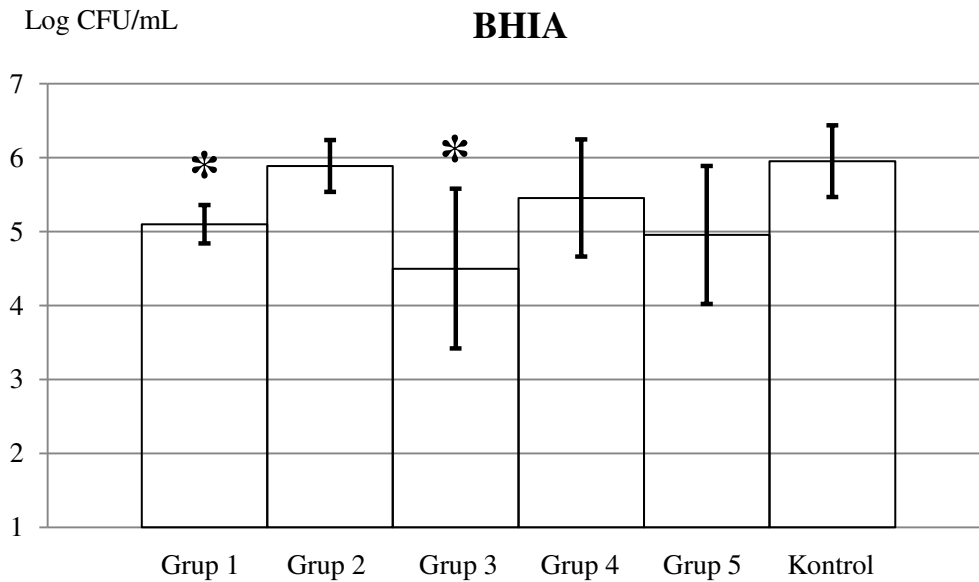


Şekil 21. Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol TPSA besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları (*: izole olan canlı hücre sayısı 7.47 log değerinden büyüktür, +: izole olan canlı hücre sayısı 3 log değerinden küçüktür)

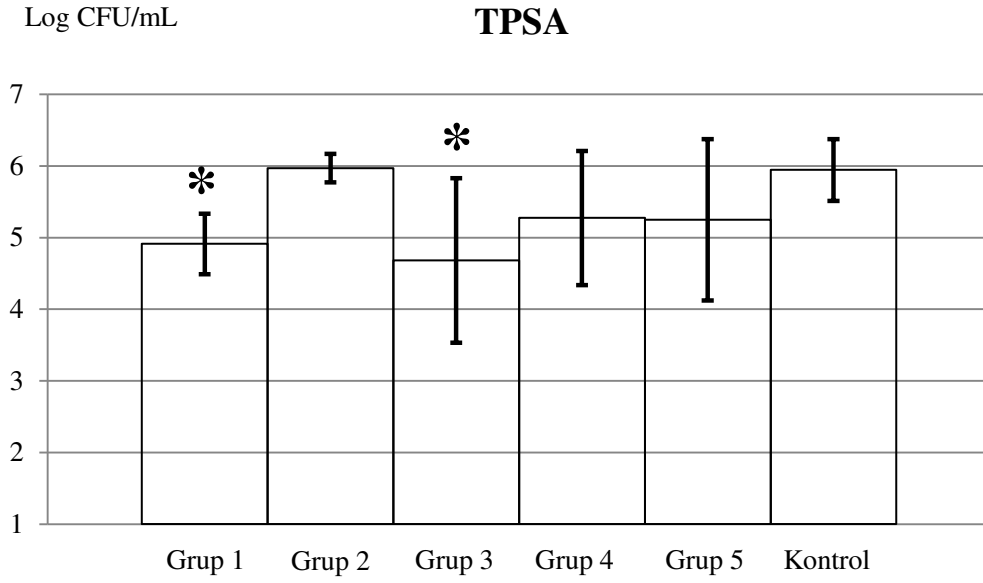


Şekil 22. Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol R2A besiyerlerinde izole olan canlı hücre sayıları (*: izole olan canlı hücre sayısı 7.47 log değerinden büyüktür, +: izole olan canlı hücre sayısı 3 log değerinden küçüktür)

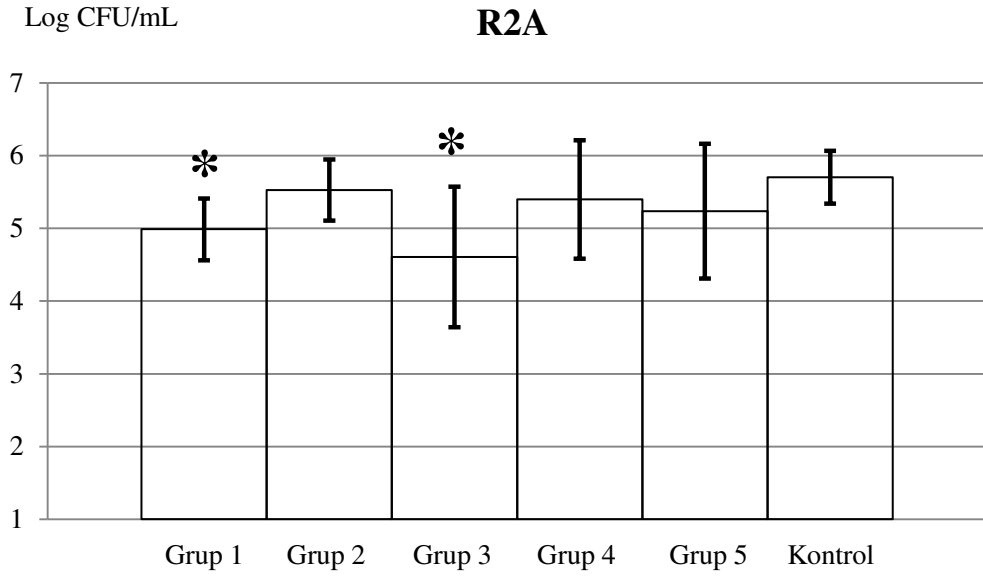
Ön zenginleştirme işlemleri yapılmış bireylerin ağız boşluğu örneklerinden izole edilen canlı hücre sayısının ortalaması alındığında grup 1 ve grup 3 inhibitörlerinin kontrole göre üremeyi anlamlı bir şekilde ($p < 0.05$) baskıladıkları tespit edildi (Şekil 23-25).



Şekil 23. Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol BHIA besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları. (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, * $p < 0.05$)



Şekil 24. Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol TPSA besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları. (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, * $p < 0.05$)



Şekil 25. Ön zenginleştirme sonrası QS inhibitörlü ve kontrol R2A besiyerlerinde bireylerin ortalaması alınarak hesaplanan canlı hücre sayıları. (ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapması, * $p < 0.05$)

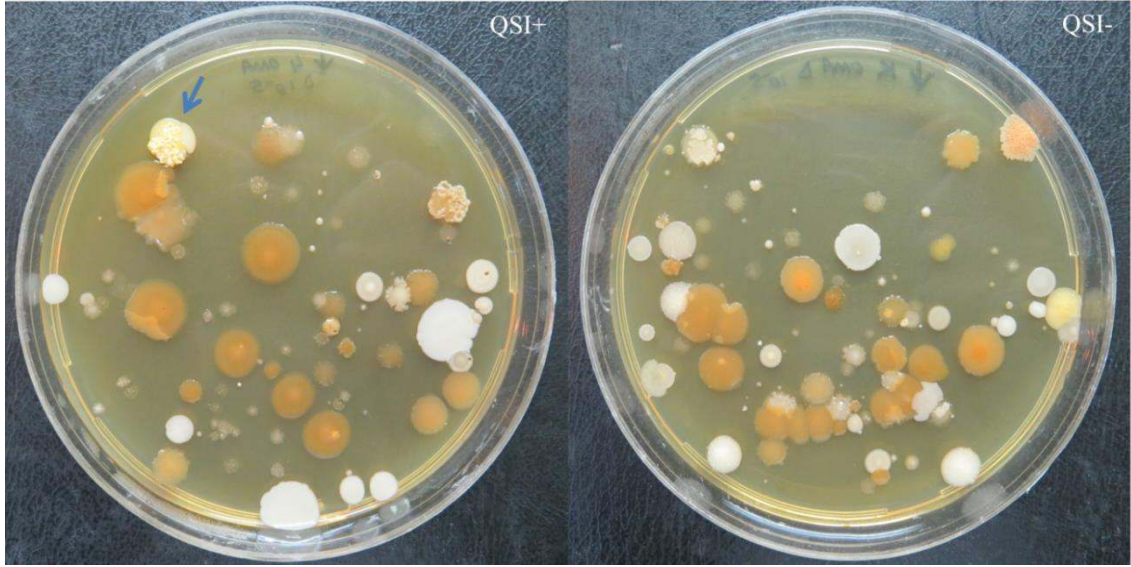
Çalışma sonunda QS inhibitörlü ve kontrol besiyerlerinde gözlenen farklı morfolojideki bakteri sayılarının bireyler ve besiyerleri içerisindeki dağılımı Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. QS inhibitörlü ve kontrol besiyerlerinde gözlenen farklı morfolojideki bakteri sayılarının bireyler ve besiyerleri içerisindeki dağılımı (QSI+: QS inhibitörlü besiyeri; QSI-: kontrol besiyeri)

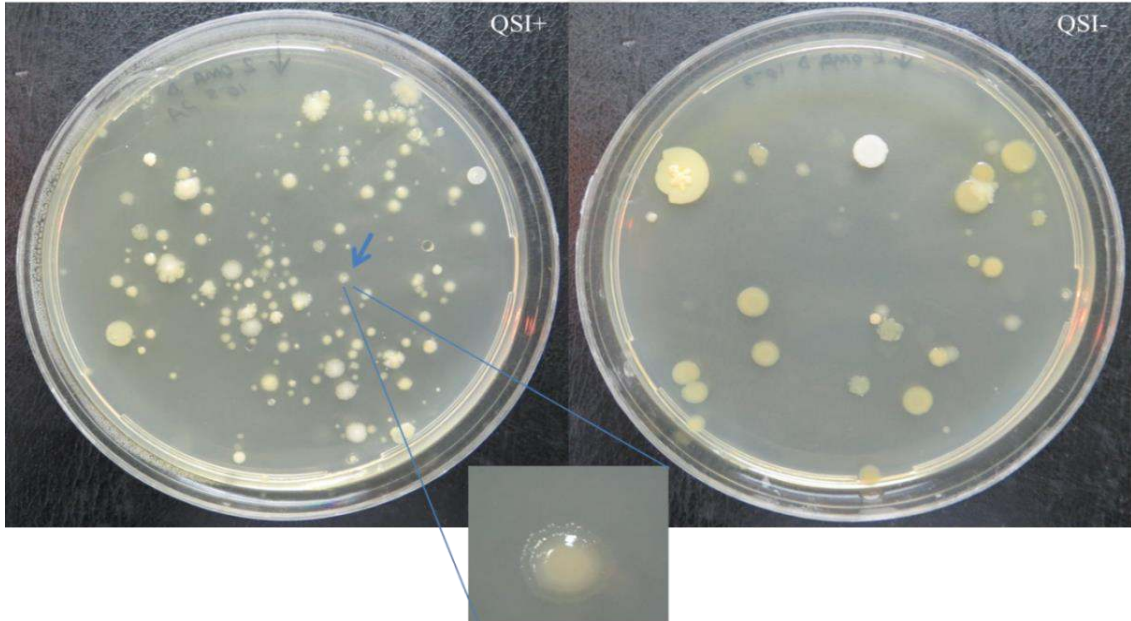
Çalışma	Besiyerleri							
Grubu	BHIA		TPSA		R2A		Toplam	
	QSI+	QSI-	QSI+	QSI-	QSI+	QSI-	QSI+	QSI-
OM1	13	30	11	24	6	22	30	76
OM2	6	36	7	13	7	10	20	59
OM3	5	25	9	22	6	13	20	60
OM4	5	23	5	13	3	23	13	59
OM5	3	20	5	13	6	14	14	47
OM6	6	28	8	28	10	16	24	72
Toplam	38	162	45	113	38	98	121	373

Tüm bireyler, QS inhibitör grupları ve besiyerleri göz önüne alındığında QS inhibitörü içeren besiyerlerinde gözlenip QS inhibitörü içermeyen besiyerlerinde gözlenmeyen toplam 121 bakteri suşu tespit edildi. Sadece inhibitörlü besiyerlerde gözlenen 121 suşun sırasıyla en fazla grup 1 (25), grup 2 (24), grup 5 (15), grup 4 (12) ve grup 3 (10) inhibitörlerini içeren besiyerlerinden diğerlerinin birden fazla grupları içeren besiyerlerinden izole edildikleri tespit edildi.

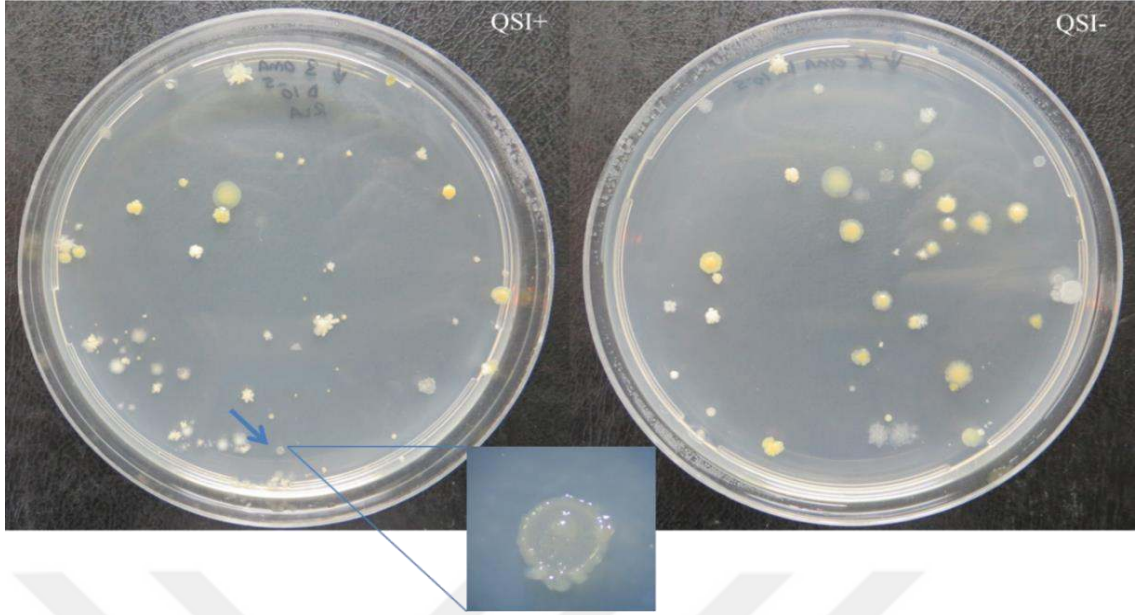
Resim 4-15’de QS inhibitörlü besiyerlerinde gözlenip kontrol besiyerlerinde gözlenmeyen suşların kültür fotoğrafları görülmektedir.



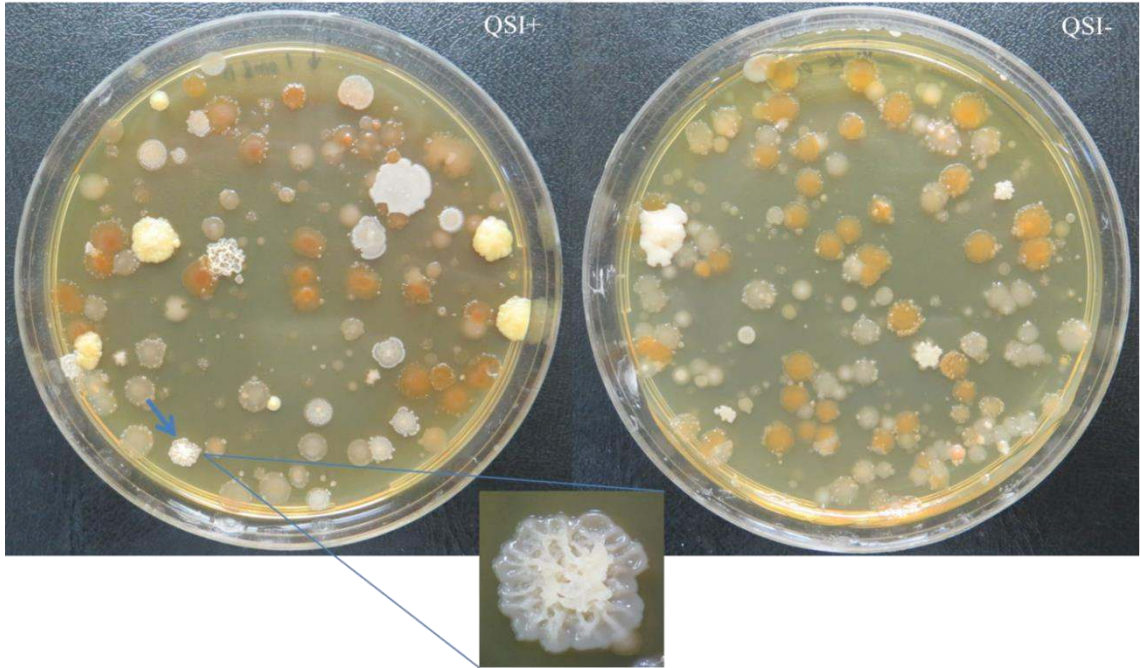
Resim 4. OM1-1-48 kodlu suşun grup 4 inhibitörünü içeren BHIA besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



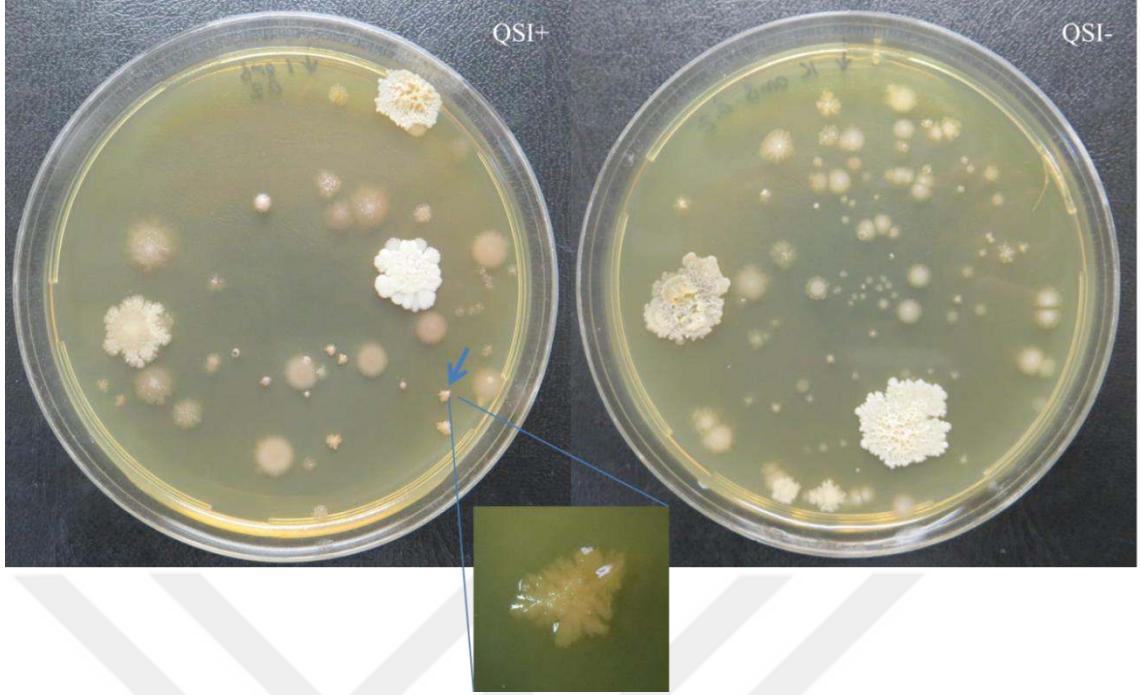
Resim 5. OM1-2-11 kodlu suşun grup 2 inhibitörünü içeren TPSA besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



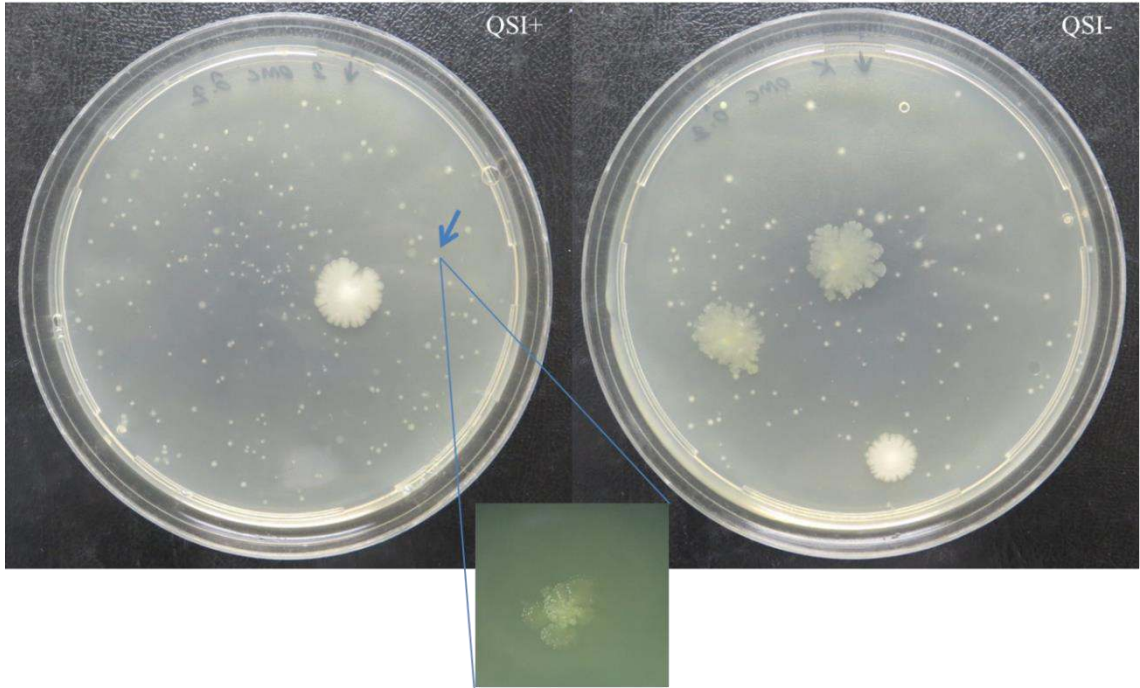
Resim 6. OM1-3-32 kodlu suşun grup 3 inhibitörünü içeren R2A besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



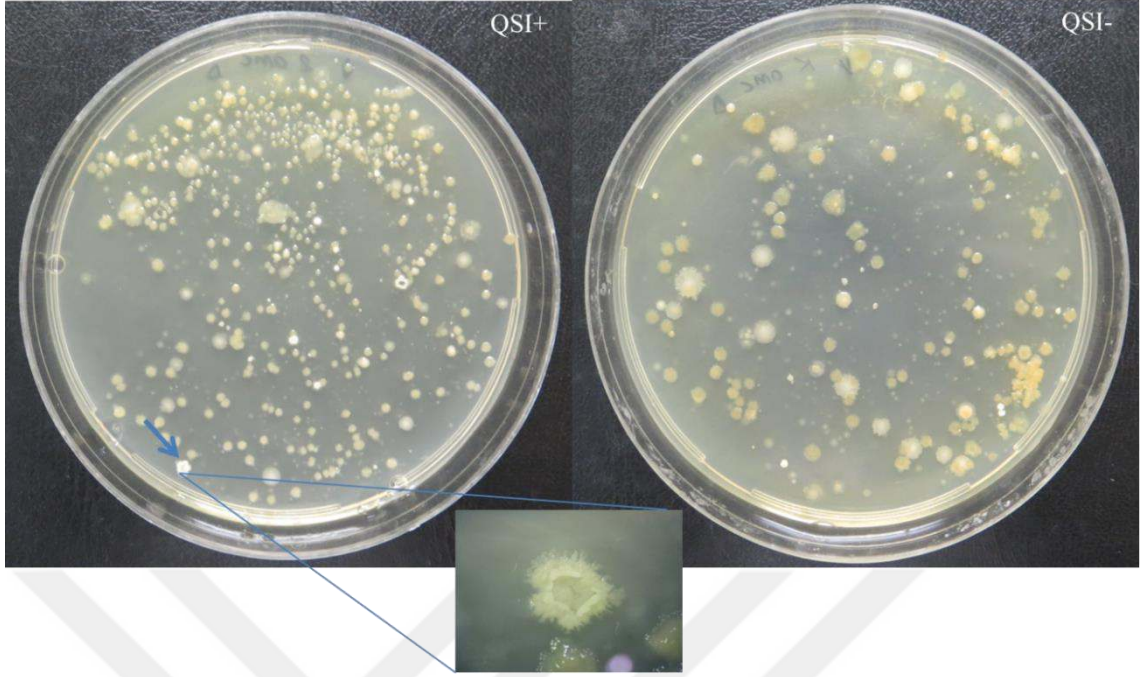
Resim 7. OM2-1-14 kodlu suşun grup 1 inhibitörünü içeren BHIA besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



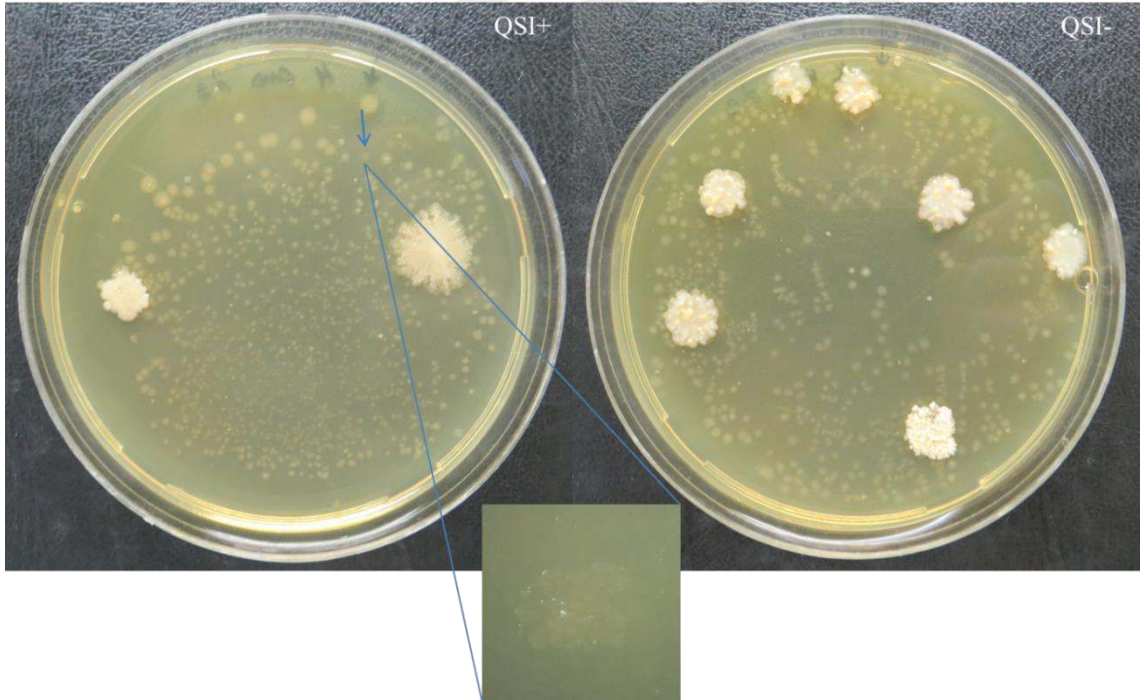
Resim 8. OM2-1-43 kodlu suşun grup 1 inhibitörü ile ön zenginleştirme sonrası yine grup 1 kombinasyonunu içeren BHIA besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



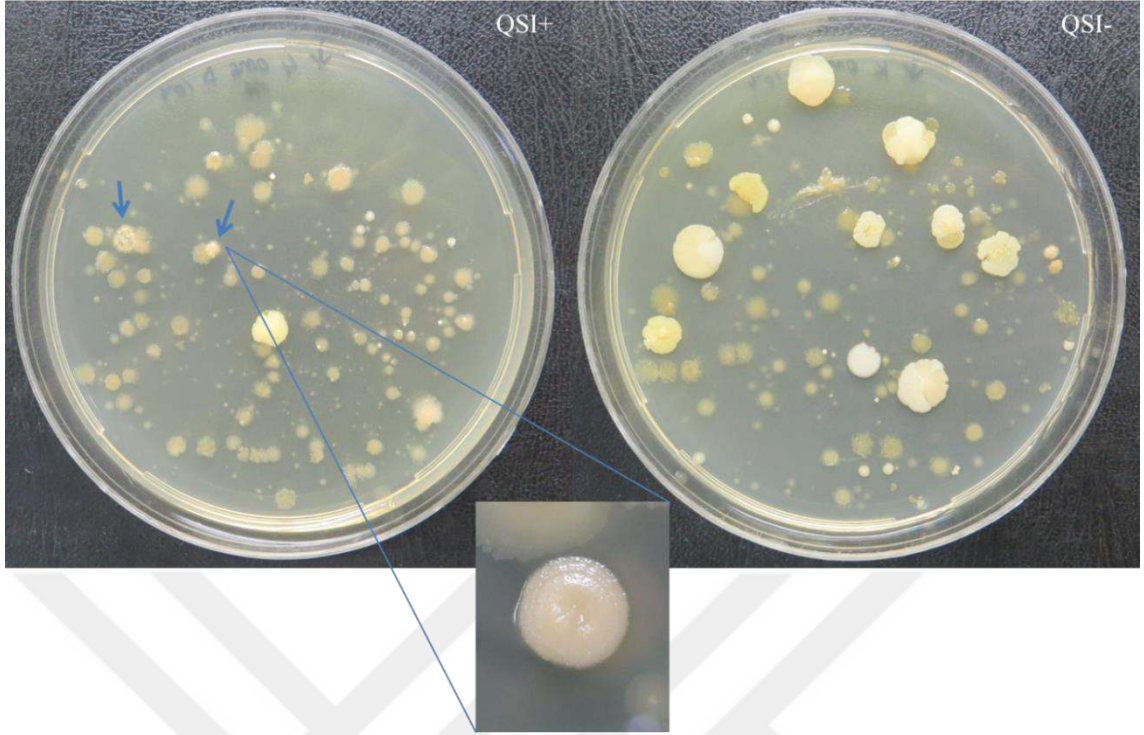
Resim 9. OM3-2-25 kodlu suşun grup 2 inhibitörü ile ön zenginleştirme sonrası yine grup 2 kombinasyonunu içeren R2A besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



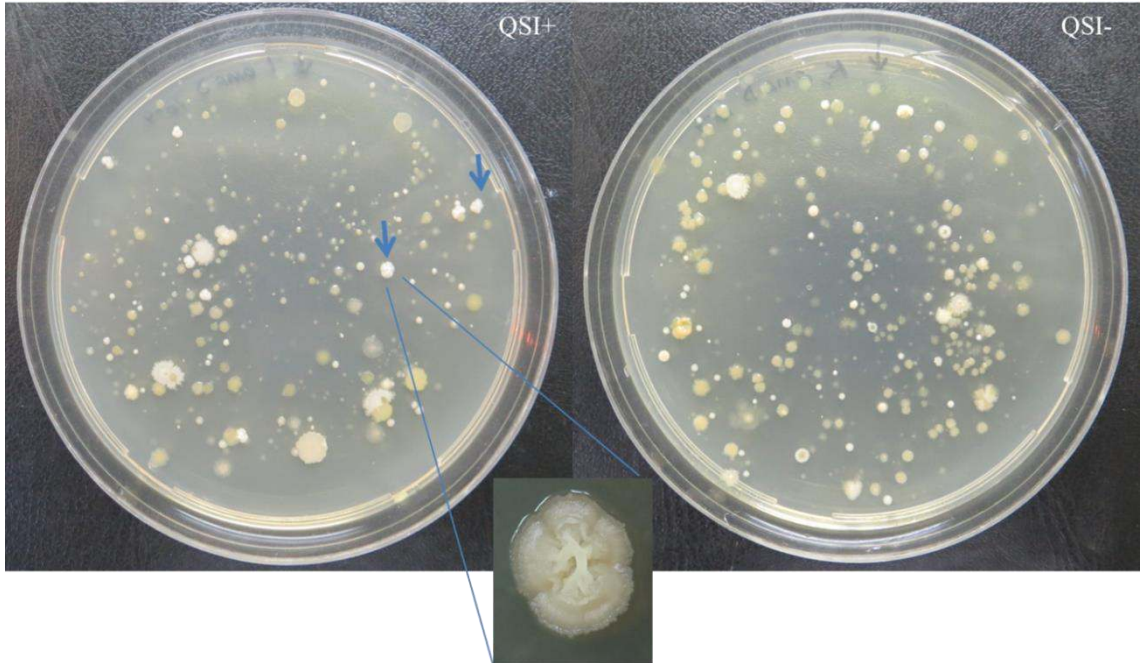
Resim 10. OM3-2-34 kodlu suşun grup 2 inhibitörünü içeren TPSA besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



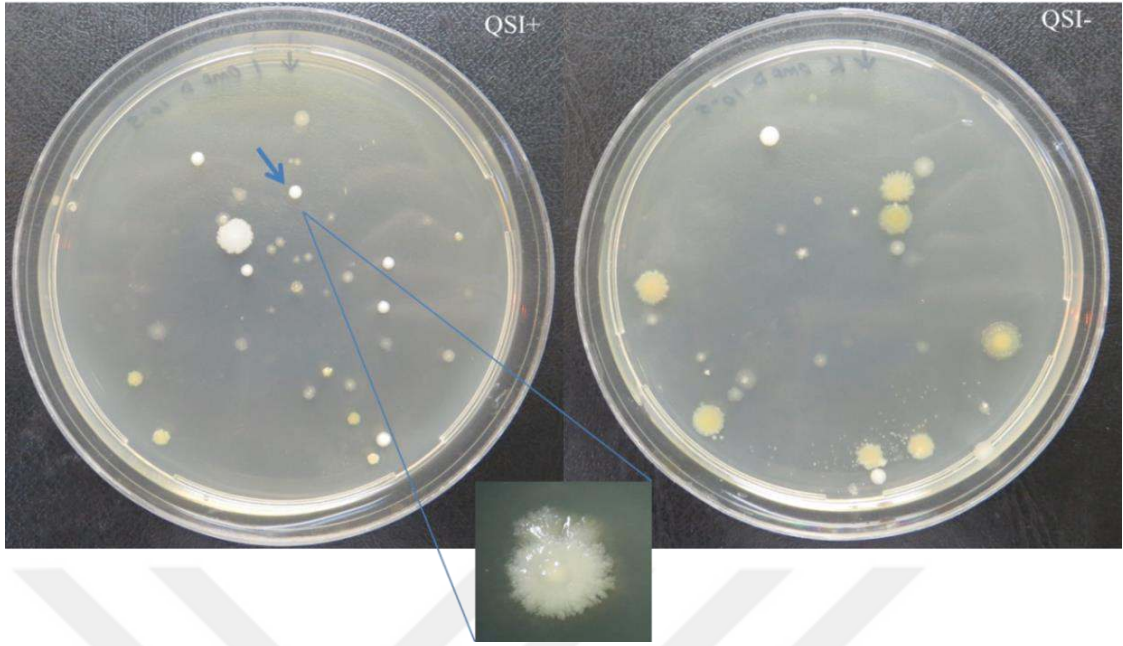
Resim 11. OM4-1-47 kodlu suşun grup 4 inhibitörünü ile ön zenginleştirme sonrası yine grup 4 kombinasyonunu içeren BHIA besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



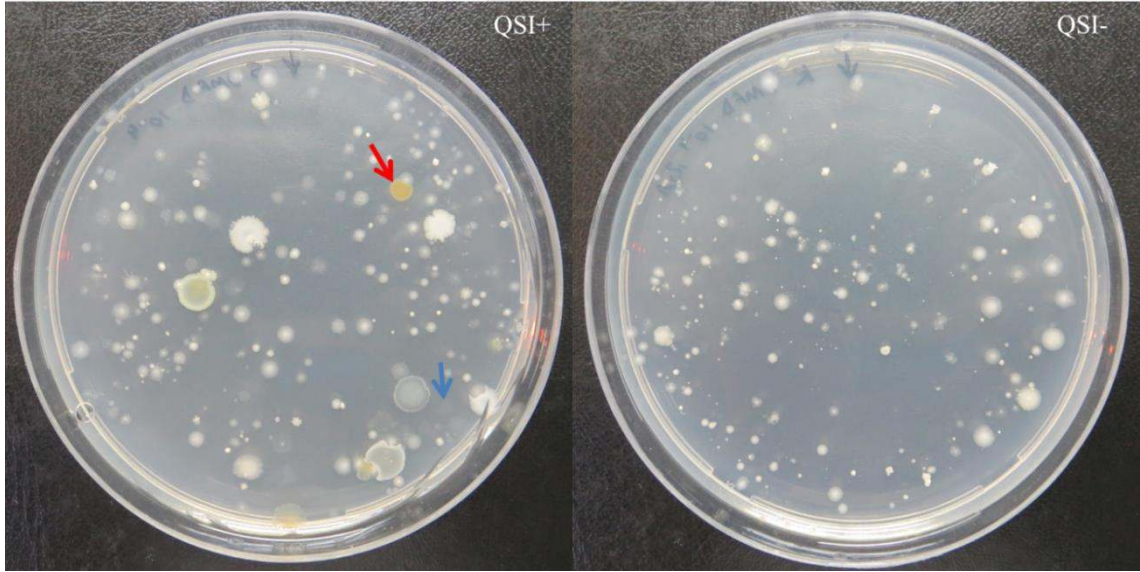
Resim 12. OM5-2-31 kodlu suşun grup 4 inhibitörünü içeren TPSA besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



Resim 13. OM6-2-41 kodlu suşun grup 1 inhibitörünü içeren TPSA besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



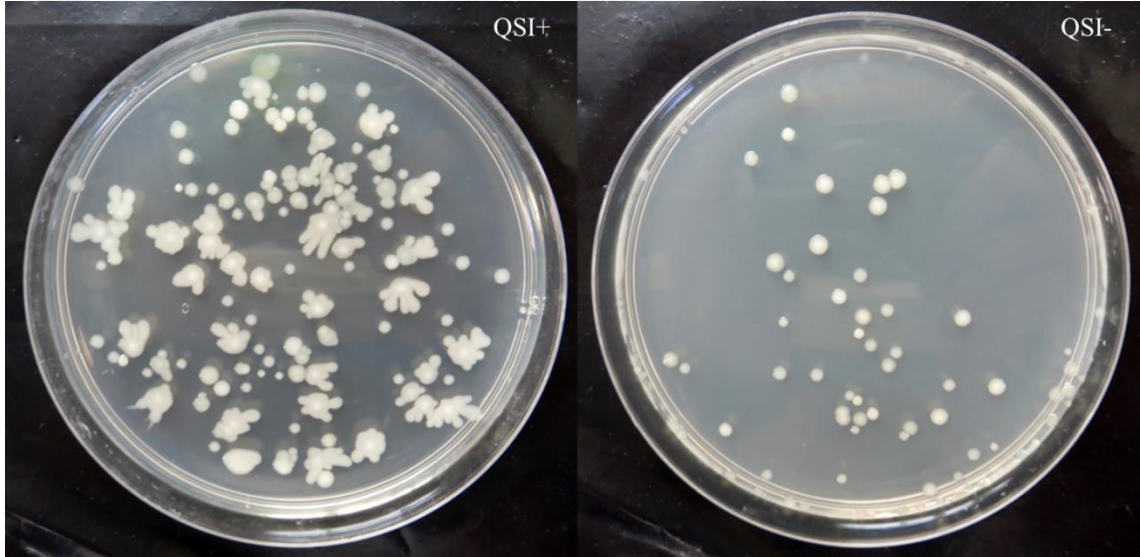
Resim 14. OM6-2-42 kodlu suşun grup 1 inhibitörünü içeren TPSA besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



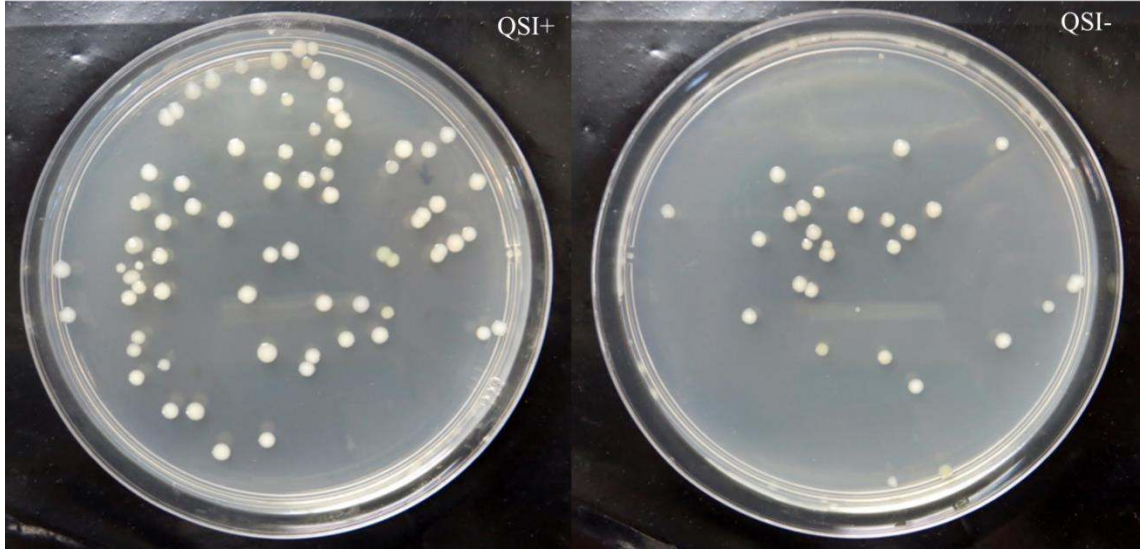
Resim 15. OM6-3-31 (mavi ok) ve OM6-3-14 (kırmızı ok) kodlu suşların grup 5 inhibitörünü içeren R2A besiyerindeki görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)

6.4. Toprak Örneklerinden Bakteri İzolasyonu

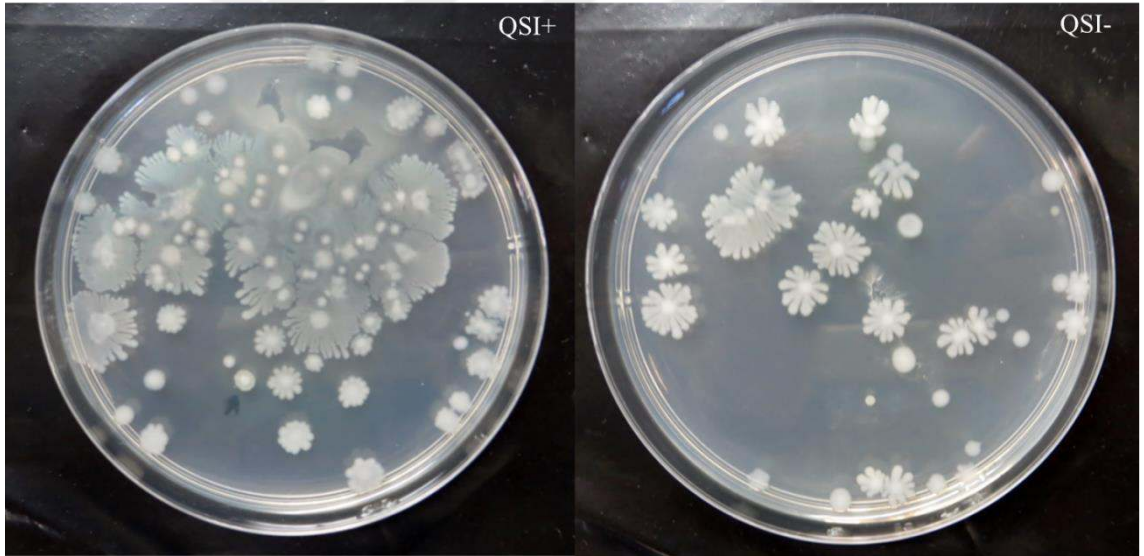
Toprak örneklerinin ön zenginleştirme işleminden sonra QS inhibitörü içeren ve içermeyen R2A, SEA ve AIA besiyerlerine yapılan ekimlerin 48 saat sonrasında izole olan koloni sayıları karşılaştırıldı. ABC, ACE, ADE kombinasyonları için QS inhibitörlü SEA besiyerinde, BCE ve CDE kombinasyonları için QS inhibitörlü R2A besiyerinde QS inhibitörü içermeyen besiyerlerine göre daha fazla sayıda koloninin izole olduğu görüldü (Resim 16-19). Çalışma sonunda QS inhibitörlü besiyerinde gözlenip, kontrol besiyerlerinde gözlenmeyen 64 suşun olduğu tespit edildi ve sekiz tanesi 16S rRNA dizi analizi yapılmak üzere seçildi.



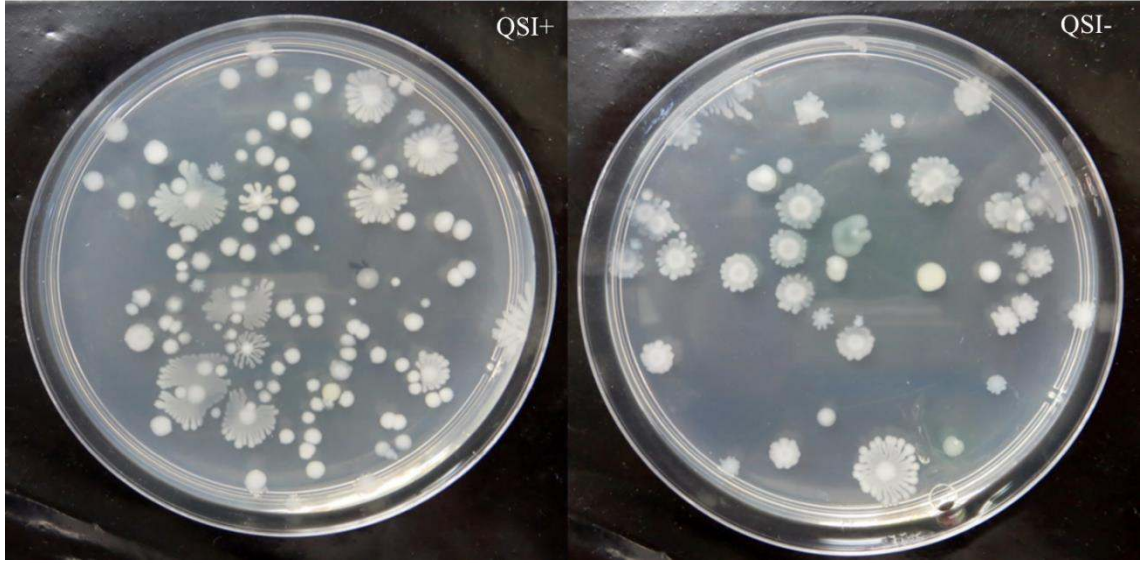
Resim 16. Ön zenginleştirme sonrası ABC inhibitörünü içeren ve içermeyen SEA besiyerinde izole olan kolonilerin görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



Resim 17. Ön zenginleştirme sonrası ACE inhibitörünü içeren ve içermeyen SEA besiyerinde izole olan kolonilerin görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



Resim 18. Ön zenginleştirme sonrası BCE inhibitörünü içeren ve içermeyen R2A besiyerinde izole olan kolonilerin görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)



Resim 19. Ön zenginleştirme sonrası CDE inhibitörünü içeren ve içermeyen R2A besiyerinde izole olan kolonilerin görüntüsü (QSI+: QS inhibitörlü, QSI-: Kontrol besiyeri)

6.5. Standart Bakteriyolojik Yöntemler İle Gruplandırma

Ağız bakterileri için QS inhibitörlü besiyerlerinde gözlenip, kontrol besiyerlerinde gözlenmeyen 121 suşun gram reaksiyonları ve hücre şekillerine göre 60 gram pozitif kok, 44 gram pozitif basil, 9 gram negatif kok, 8 gram negatif basilden oluştukları görüldü. Bu bakteriler gram reaksiyonları, hücre morfolojisi [kok (üzüm salkımı, zincir, tetrat), basil (normal basil, filamentöz)], katalaz, oksidaz reaksiyonları ve hemoliz özelliklerine göre 29 gruba ayrıldı (Tablo 9).

Tablo 9. Sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde izole olan bakterilerin standart bakteriyolojik yöntemlere göre gruplandırılması

Grup No	Gram Reaksiyonu	Hücre Şekli	Katalaz	Oksidaz	Hemoliz	Suş Sayısı
1	+	Kok (Zincir)	-	-	α	28
2	+	Kok (Zincir)	-	-	β	2
3	+	Kok (Üzüm Salkımı)	+	+	α	1
4	+	Kok (Üzüm Salkımı)	+	-	β	8
5	+	Kok (Üzüm Salkımı)	+	-	α	7
6	+	Kok (Üzüm Salkımı)	+	-	γ	5
7	+	Kok (Tetrakok)	+	+	α	1
8	+	Kok (Tetrakok)	+	-	γ	5
9	+	Kok (Tetrakok)	+	-	α	1

Tablo 9. (Devam) Sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde izole olan bakterilerin standart bakteriyolojik yöntemlere göre gruplandırılması

Grup No	Gram Reaksiyonu	Hücre Şekli	Katalaz	Oksidaz	Hemoliz	Suş Sayısı
10	+	Kok (Tetrakok)	-	-	γ	1
11	+	Kok (Tetrakok)	-	-	α	1
12	+	Basil	+	+	β	3
13	+	Basil	+	+	α	1
14	+	Basil	+	-	α	8
15	+	Basil	+	-	γ	4
16	+	Basil	-	+	β	3
17	+	Basil	-	-	β	2
18	+	Basil	-	-	α	6
19	+	Basil	-	-	γ	2
20	+	Filamentöz	+	-	α	3
21	+	Filamentöz	+	-	γ	11
22	+	Filamentöz	-	-	α	1
23	-	Kok	-	+	γ	4
24	-	Kok	+	+	γ	5
25	-	Basil	+	+	γ	2
26	-	Basil	+	*	γ	1
27	-	Basil	+	-	α	2
28	-	Basil	-	+	γ	2
29	-	Basil	-	-	γ	1

6.6. 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları

Ağız boşluğuna ait örneklerden sadece QS inhibitörlü besiyerlerinden izole edilen 121 suşun 28'inin kısmi 16S rRNA dizi analizleri yapıldı. Bakterilerin 16S rRNA dizileri gen bankasının (www.homd.org) 16S rRNA BLAST programı kullanılarak karşılaştırıldı ve 28 bakteriden 20 tanesinin oral mikrobiyotada bulunan bakteriler ile en az %98.5 oranında, diğerlerinin %98.5'dan az benzerlik yüzdesi ile homoloji gösterdikleri tespit edildi.

HOMD'a göre $\geq$ %98.5 oranında homoloji gösteren dizilerin 17'sinin daha önce kültür edilen ve adlandırılan, üç tanesinin kültür edilen fakat adlandırılmayan taksonlar ile homoloji gösterdikleri tespit edildi. Daha önce kültürü yapılan ve adlandırılan

taksonların *Actinomyces naeslundii*, *Corynebacterium matruchotii*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria sicca*, *Rothia aeria*, *Rothia dentocariosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus sanguinus*, *Streptococcus tigurinus* oldukları tespit edildi. Dört farklı bireye ait 5 suşun *R. aeria* taksonu ile homoloji gösterdiği tespit edildi. Adlandırılmamış türlerin *Streptococcus* sp. Human Oral Takson (HOT) 061 ve *Streptococcus* sp. HOT 431 taksonları ile homoloji gösterdikleri saptandı (Tablo 10).

Tablo 10. HOMD'un veritabanında bulunan taksonlar ile ≥ 98.5 oranında homoloji gösteren suşlar ve benzerlik durumları

Suş Kodu	Taksonların ismi, HOT ve erişim numaraları	Benzerlik Oranı (bp) ve Yüzdesi
OM1-1-27	<i>Neisseria bacilliformis</i> HOT 013, EF509613.1	831/839 (%99)
OM1-2-11	<i>Neisseria flavescens</i> HOT 610, EF511998.1	1383/1394 (%99)
OM1-3-24	<i>Staphylococcus epidermidis</i> HOT 601, D83363.1	842/847 (%99.4)
OM1-3-32	<i>Streptococcus sanguinis</i> HOT 758, AF003928.1	841/845 (%99.5)
OM2-1-14	<i>Rothia aeria</i> HOT 188, Y13025.1	836/849 (%98.5)
OM2-1-43	<i>Streptococcus australis</i> HOT 073, AF385525.1	769/777 (%99)
OM2-2-33	<i>Rothia aeria</i> HOT 188, Y13025.1	1383/1394 (%99)
OM3-1-22	<i>Streptococcus</i> sp. HOT 431, AY278633.1	850/856 (%99.3)
OM3-2-25	<i>Streptococcus tigurinus</i> HOT 071, AY278631.1	785/791 (%99.2)
OM3-2-34	<i>Rothia aeria</i> HOT 188, Y13025.1	830/836 (%99.3)
OM4-1-47	<i>Streptococcus</i> sp. HOT 061, AF432131.1	744/750 (%99.2)
OM4-2-12	<i>Neisseria sicca</i> HOT 764, AJ239292.1	883/894 (%98.8)
OM4-2-27	<i>Corynebacterium matruchotii</i> HOT 666, AF543287.1	870/883 (%98.5)
OM5-2-29	<i>Rothia aeria</i> HOT 188, Y13025.1	760/761 (%99.9)
OM5-2-35	<i>Streptococcus gordonii</i> HOT 622, AF003931.1	762/773 (%98.6)
OM4-1-47	<i>Streptococcus</i> sp. HOT 061, AF432131.1	744/750 (%99.2)
OM4-2-12	<i>Neisseria sicca</i> HOT 764, AJ239292.1	883/894 (%98.8)
OM4-2-27	<i>Corynebacterium matruchotii</i> HOT 666, AF543287.1	870/883 (%98.5)
OM5-2-29	<i>Rothia aeria</i> HOT 188, Y13025.1	760/761 (%99.9)
OM5-2-35	<i>Streptococcus gordonii</i> HOT 622, AF003931.1	762/773 (%98.6)
OM5-3-58	<i>Streptococcus</i> sp. HOT 431, AY278633.1	815/825 (%98.8)
OM6-2-32	<i>Rothia dentocariosa</i> HOT 587, M59055.2	764/767 (%99.6)
OM6-2-41	<i>Rothia aeria</i> HOT 188, Y13025.1	778/778 (%100)
OM6-2-42	<i>Actinomyces naeslundii</i> HOT 176, X81062.1	808/820 (%98.5)
OM6-3-31	<i>Streptococcus infantis</i> HOT 638, AB008315.1	796/804 (%99)

HOMD'a göre sekiz suşun *Arsenicococcus bolidensis*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheria*, *Corynebacterium durum*, *Kocuria* sp. ve *N. bacilliformis* taksonları ile <%98.5 oranında homoloji gösterdikleri belirlendi. NCBI'a göre ise bu suşların ≥%98 oranında *Bacillus* sp., *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium argenteratense*, iki tane kültür edilmemiş bakteri klonları, *Micrococcus* sp. ve *Kocuria rhizophila* ile homoloji gösterdikleri tespit edildi (Tablo 11).

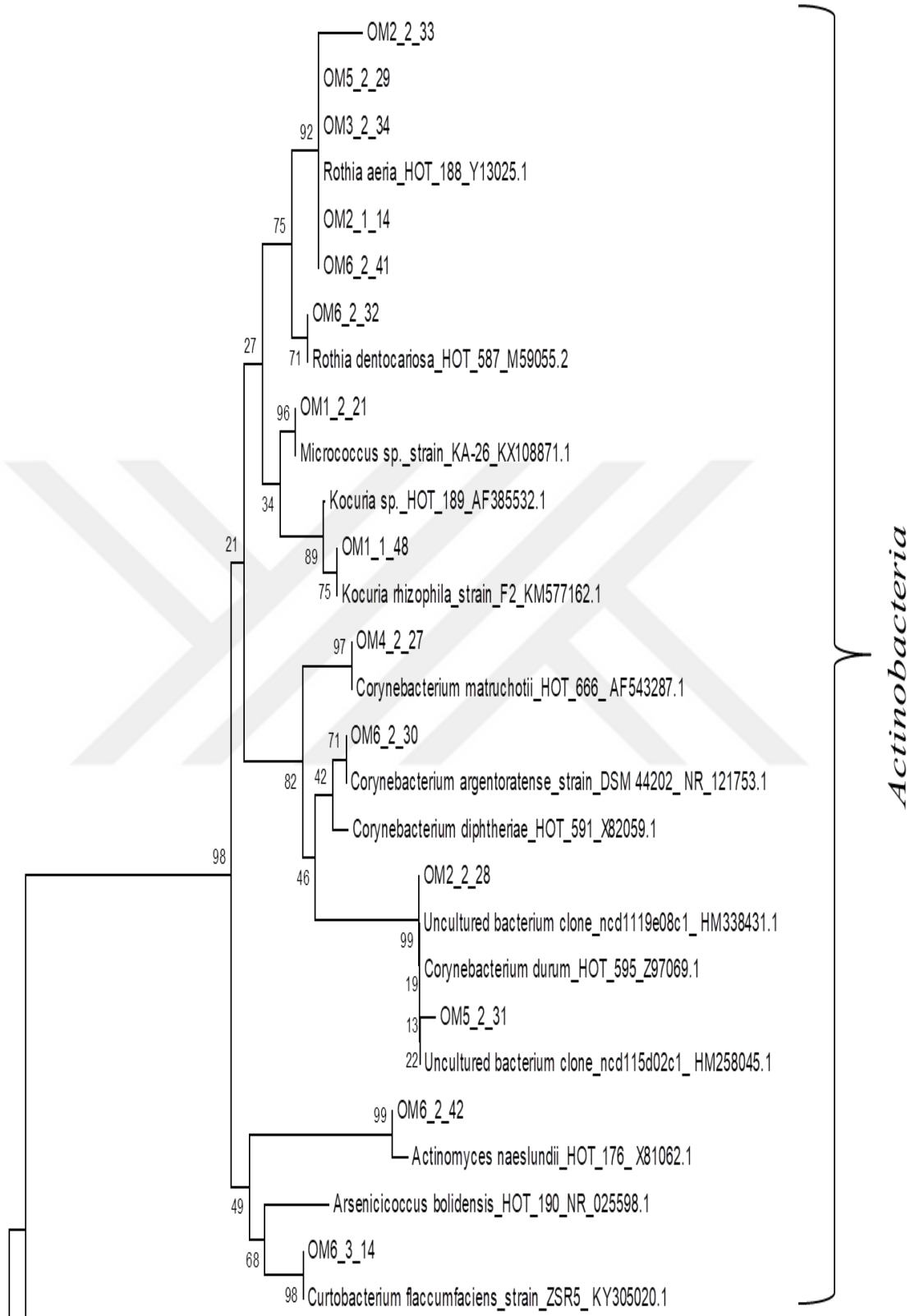
Toprak bakterileri için 16S rRNA dizi analizi yapılan sekiz suştan iki tanesinin %99 oranında daha önce kültür edilmemiş bakteri klonları ile homoloji gösterdikleri görüldü.

Tablo 11. HOMD'un veritabanında bulunan taksonlar ile <%98.5 oranında homoloji gösteren suşların NCBI'a göre eşleştikleri taksonlar ve benzerlik durumları

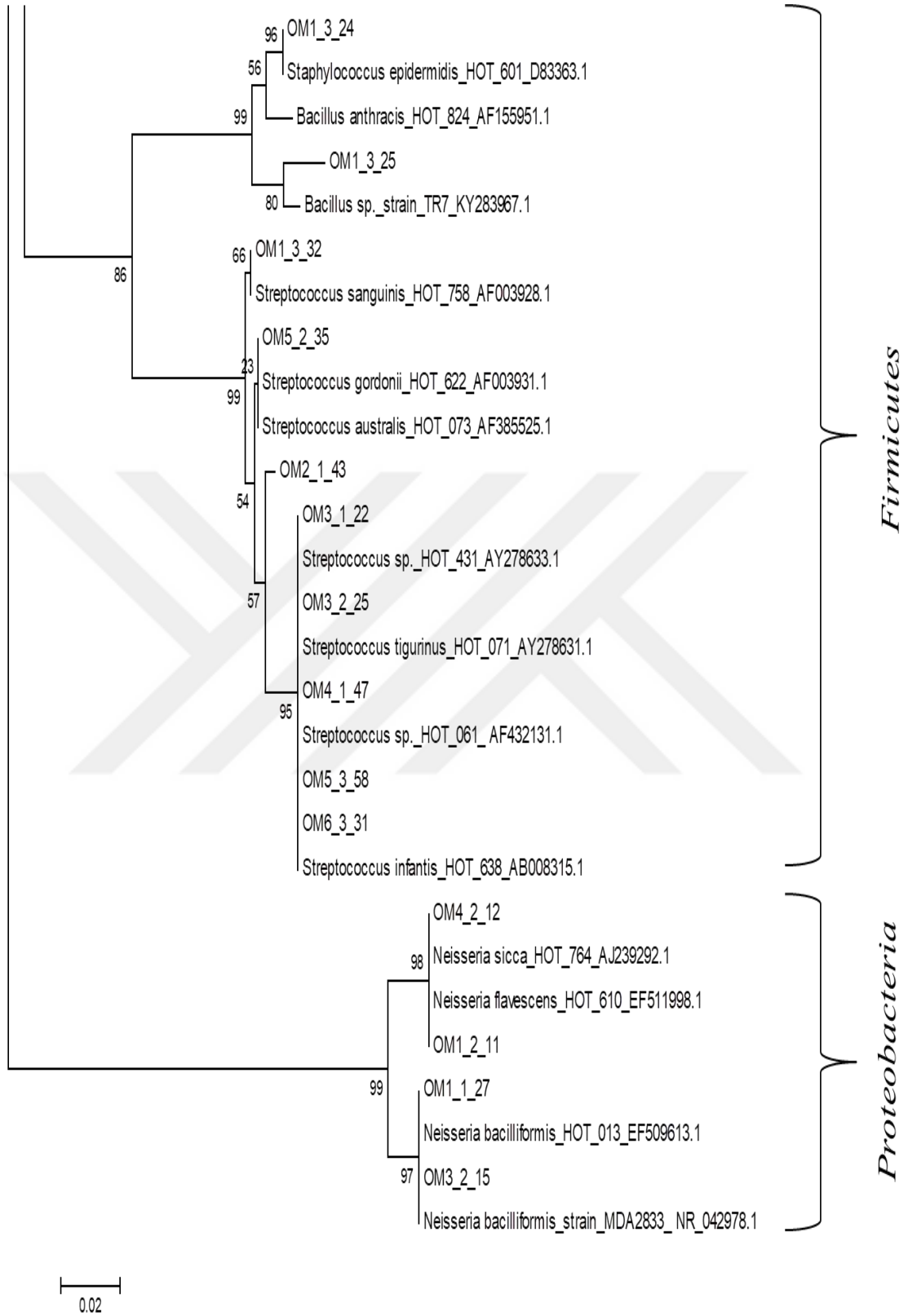
Suş Kodu	HOMD'a göre		NCBI'a göre	
	Taksonların ismi, HOT ve erişim numaraları	Benzerlik Oranı (bp) ve Yüzdesi	Taksonların ismi ve erişim numaraları	Benzerlik Oranı (bp) ve Yüzdesi
OM1-1-48	<i>Kocuria</i> sp. HOT 189, AF385532.1	1437/1467 (%98)	<i>Kocuria rhizophila</i> strain F2, KM577162.1	1484/1488 (%99)
OM1-2-21	<i>Kocuria</i> sp. HOT 189, AF385532.1	799/857 (%93.2)	<i>Micrococcus</i> sp. strain KA-26, KX108871.1	840/854 (%98)
OM1-3-25	<i>Bacillus anthracis</i> HOT 824, AF155951.1	794/823 (%96.5)	<i>Bacillus</i> sp. strain TR7, KY283967.1	828/829 (%99)
OM2-2-28	<i>Corynebacterium durum</i> HOT 595, Z97069.1	773/788 (%98.1)	Uncultured bacterium clone ncd1119e08c1, HM338431.1	775/788 (%98)
OM3-2-15	<i>Neisseria bacilliformis</i> HOT 013, EF509613.1	1316/1338 (%98.4)	<i>Neisseria bacilliformis</i> strain MDA2833, NR_042978.1	1319/1341 (%98)
OM5-2-31	<i>Corynebacterium durum</i> HOT 595, Z97069.1	767/782 (%98.1)	Uncultured bacterium clone ncd115d02c1, HM258045.1	776/787 (%99)
OM6-3-14	<i>Arsenicococcus bolidensis</i> HOT 190, NR_025598.1	1264/1352 (%93.5)	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> strain ZSR5, KY305020.1	1350/1355 (%99)
OM6-2-30	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> HOT 591, X82059.1	766/797 (%96.1)	<i>Corynebacterium argenteratense</i> strain DSM 44202, NR_121753.1	795/797 (%99)

6.7. Filogenetik Analiz

Seçilen 28 suşun homoloji gösterdikleri taksonlar ile oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 26'da görülmektedir. Seçilen suşların *Actinobacteria*, %50; *Firmicutes*, %35.7 ve *Proteobacteria*, %14.3 şubelerinde bulundukları belirlendi.



Şekil 26. Sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde izole olan suşlar ve bu suşların 16S rRNA dizi analizine göre eşleştikleri taksonların filogenetik ağaçtaki konumları



Şekil 26. (Devam) Sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde izole olan suşlar ve bu suşların 16S rRNA dizi analizine göre eşleştikleri taksonların filogenetik ağaçtaki konumları

7. TARTIŞMA

Literatürde QS sinyal moleküllerinin besiyerlerine ilave edilmesi ile canlı fakat kültür edilmeyen bakterilerin üretilmesine yönelik çalışmalar mevcut iken QS inhibisyonu yaparak kültür edilebilirliği gösteren detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, 2011 yılında bakterilerde QS inhibisyonu gerçekleştirerek bakterilerin popülasyon yoğunluklarının kontrol etme yeteneklerini ortadan kaldırılması ve daha önce kültür edilmemiş bakterilerin kültür edilmesine yönelik patent almış bir fikir ortaya atılmıştır (1). Biz de bu patentten yola çıkarak önce toprak örneğinden sonrada sağlıklı bireylerin ağız boşluğu örneklerinden daha önce kültür edilmemiş bakterilerin kültür edilebileceğini göstermek istedik.

Doğada bakterilerin ancak %1'nin kültür edilebildiği kalanların moleküler teknikler ile var olduklarının gösterildiği fakat *in vitro* koşullarda kültür edilemedikleri bilinmektedir (9, 67). KTÜ BAP birimi tarafından 2014-2016 yılları arasında desteklenen 11542 kodlu “Canlı Fakat Kültür Edilemeyen Bakterilerin Üretilmelerinde Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama) İnhibitörlerinin Kullanılması” adlı proje kapsamında toprak örneklerinden QS inhibitörü içeren ve içermeyen besiyerlerinde kültür işlemleri gerçekleştirildi. O çalışmada bakteriler QS inhibitörlü ve kontrol SEA, AIA ve R2A besiyerlerinde kültür edildi ve sadece inhibitörlü besiyerlerinde gözlenen suşlardan sekiz tanesinin 16S rRNA dizi analizi yapıldı. Elde edilen diziler gen bankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) ile nükleotit BLAST programı kullanılarak karşılaştırıldı ve homolojileri belirlendi. Çıkan sonuçların değerlendirilmesinde en düşük E-değerine sahip, maksimum benzerliği ve sorgulama kapsamı en yüksek olan sonuçlara öncelik verildi. Sonuçta dizilenen sekiz bakteriden ikisinin %99 benzerlik oranında daha önce kültür edilmemiş bakteri klonları ile homoloji gösterdikleri tespit edildi.

Her ne kadar kültür edilemeyen bakteri sayısının oranı doğaya ve çevre örneklerine kıyasla ağız boşluğunda daha az olsa da örnekleme kolaylığı ve medikal öneminden dolayı bu tez çalışmasında ağız mikrobiyotası hedef alındı. Çalışmada kullanılan QS inhibitörleri literatürden seçildi. Bu çalışmada literatüre göre bakterilerde QS sistemi ile düzenlenen çeşitli fenotipik yapıları ve fizyolojik özellikleri (pigment oluşumu, virülans faktörlerinin sentezlenmesi, biyofilm oluşumu vb) hedef alan maddeler kullanıldı. Literatürlerde geçen bu inhibitörlerden QS mekanizmasının

düzenlenmesinde görev alan LuxR, LuxP/Q ve oligopeptit sistemlerini inhibe eden ve test edildikleri bakterilerde üreme ve gelişmeyi baskılamadan QS ile düzenlenen çeşitli fenotipik ve fizyolojik oluşumları engelleyen inhibitörler çalışmaya dahil edildi. Bu tez çalışmasında kullanılan QS inhibitörlerinin bakterilerde QS ile düzenlenen çeşitli fenotipik ve fizyolojik davranışları inhibe ettiğine yönelik yapılan çalışmalar şu şekilde özetlenebilir:

Ponnusamy ve ark. (47) vanilinin, Mukherji ve ark. (44) ksilitolün *C.violaceum* CV026 suşunda viyolasin üretimini belli oranlarda inhibe ettiklerini göstermişlerdir. Bandara ve ark. (43) salisilik asitin *P. aeruginosa*'ya karşı subinhibitör konsantrasyonlarda QS ile düzenlenen virülans faktörleri sentezini azalttığını, Rudrappa ve arkadaşları (74) kurkuminin *P. aeruginosa* PAO1 suşunda biyofilm oluşumu, piyosiyanın sentezi, elastaz ve proteaz aktivitesini engellediğini, Smith ve ark. (80) AHL analoğu olan siklohekzanon bileşiğinin *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu ve virülans faktörlerinin sentezini engellediğini göstermişlerdir. Paul ve ark. (34) açılaz I enziminin *A. hydrophila* ve *Pseudomonas putida* suşlarında biyofilm oluşumunu inhibe ettiklerini göstermişlerdir. Norizan ve ark. (46) kafeinin *C. violaceum* CV026 suşunda viyolasin, *P. aeruginosa* PAO1 suşunda swarming hareketini inhibe ettiklerini tespit etmişlerdir.

Jones ve ark. (81) tannik asitin *Proteus mirabilis*'de QS ile düzenlenen biyofilm oluşumunu engellediğini göstermişlerdir. Vikram ve ark. (50) naringenin, kamferol, kuersetin ve apigeninin *V. harveyi* ve *E. coli* O157:H7 suşlarında biyofilm oluşumunu, naringenin *V. harveyi*'de tip III sekresyon sistemi sentezini baskıladığını, Ni ve ark. (52) fenotiyazinin *V. harveyi*'de biyoluminesan üretimini engellediğini göstermişlerdir. Bodini ve ark. (40) sarımsak ekstraktının *E.coli* pSB401 ve pSB536 biyosensör suşlarında biyoluminesan, *A. tumefaciens* NTL4 suşunda beta-galaktosidaz üretimini baskıladığını göstermişlerdir. P-kumarik asitin ise *C. violaceum* 5999 suşunda viyolasin, *A. tumefaciens* NTL4'de beta-galaktosidaz üretimini inhibe ettiklerini göstermişlerdir.

Kim ve ark. (82) indolün *Acinetobacter oleivorans* DR1 suşunda QS bağımlı biyofilm oluşumu ve motiliteyi inhibe ettiğini saptamışlardır. Kiran ve ark. (55) hamamelitannin bileşiğinin *S. aureus*'da QS ile ilişkili virülans faktörleri sentezini baskıladığını göstermişlerdir. Chevrot ve ark. (37) GABA'nın *A. tumefaciens* suşlarında

AHL sinyal moleküllerini yıkımlayan laktonaz enzim üretimini arttırdığını göstermişlerdir. Huber ve ark. (33) EGCG, ellagik asit ve tannik asitin konsantrasyona bağlı *E. coli* pSB403'de biyoluminesan, *P. putida* pKR-C12 suşunda floresan üretimini baskıladığını, yine konsantrasyona bağlı olarak EGCG ve ellagik asitin *B. cepacia*'da biyofilm oluşumunu ve swarming hareketini inhibe ettiklerini göstermişlerdir. Parsek ve ark. (39) S-adenozilhomosisteinin AHL molekülünün yapıtaşlarından olan SAM yerine geçmesiyle *P. aeruginosa*'da AHL sentezini engellediğini göstermişlerdir.

Hanzelka ve ark. (38) *luxI* geni insert edilmiş plazmit içeren *E. coli* suşunda siklölösinin AHL sentezinin ana basamağını oluşturan S-adenozilmetiyonin sentezini engellediğini tespit etmişlerdir. Niu ve ark. (42) sinnamaldehidin *E. coli* ATCC 33456 pJBA89 ve pMHLAS suşlarında yeşil floresan yapıda protein üretimini, *V. harveyi* BB886 ve BB170 suşlarında biyoluminesan üretimini inhibe ettiklerini tespit etmişlerdir. Girennevar ve ark. (51) bergamottinin *V. harveyi* BB886 ve BB170 suşlarında biyoluminesan üretimini, *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* ve *P. aeruginosa* suşlarında biyofilm oluşumunu baskıladıklarını göstermişlerdir. Yadav ve ark. (49) 5-azasitidin *Streptococcus pneumoniae* suşunda QS ile düzenlenen biyofilm oluşumunu engellediğini göstermişlerdir. Brackman ve ark. (83) p-benzokinon, sinnamaldehit, kurkumin, EGCG, indol ve farnesolün test edilen *Burkholderia* türlerinden en az birinde biyofilm oluşumunu inhibe ettiklerini tespit etmişlerdir.

Rasmussen ve ark. (32) 2,4,5-tribromoimidazol, sarımsak ekstraktı, p-benzokinon, 4-NPO ve indolün anti-QS özelliklerini tasarladıkları bir sisteme karşı test etmiş ve bahsi geçen maddelerin QS inhibisyonu gerçekleştirdiğini göstermişlerdir. Tasarladıkları sistemde plazmit üzerine QS mekanizmasının düzenlenmesinden sorumlu promotör genini, letal toksin kodlayan bir gen ile birleştirmişlerdir. Normalde ortamda bulunan AHL molekülü hedef hücrede plazmit ile kodlanan LuxR reseptörüne bağlanacak ve bağlanma sonucunda oluşan kompleks letal toksin kodlayan gen için transkripsiyon aktivatör görevini üstlenecektir ve neticesinde plazmit içeren *E. coli* toksik etkiye maruz kalacağı için besiyerinde üreyemeyecektir. Fakat QS inhibitörleri varlığında LuxR proteini bloke olacağından letal protein kodlayan genin ekspresyonu gerçekleşemeyerek *E. coli* besiyerinde üremesine devam edecektir.

Çalışmada kullanılan inhibitörlerin ağız mikrobiyotası üzerine antibakteriyel etki göstermemesi için kullanılan konsantrasyonlar büyük bir titizlikle belirlendi. Ağız mikrobiyotasını temsil etmesinden dolayı sağlıklı üç bireye ait tükürük örnekleri kombine edilerek inhibitörlerin bakteri üreme ve gelişmesini baskılamayan konsantrasyonları belirlendi. Bunun yanında, literatürler taranıp inhibitörlerin hedef bakteride üremeyi baskılamadan QS inhibisyonu sağladığı konsantrasyonlar dikkate alındı. Ancak, oluşturulan gruplardan özellikle grup 1 ve 3'ün bireylerde canlı bakteri sayısında azalmaya yol açtığı görülmüştür.

QS inhibitör gruplarının hazırlanmasında, inhibitörlerin etki mekanizmaları başta olmak üzere çözücüler ve her bir maddenin kullanılacak son konsantrasyonları ve hazırlanan stok konsantrasyonları gibi faktörler göz önüne alındı. Gruplar oluşturulurken bir grup sadece AHL inhibitörleri içeren, bir grup sadece AI-2 inhibitörlerini içeren maddelerden oluşturulabilirdi, fakat bunun yerine heterojen bir grup oluşturuldu. Yine de çalışmamızda kullanılan inhibitörlerin çoğu AHL sinyal molekül inhibitörü olduğu için oluşturulan gruplarda AHL inhibitörleri daha fazla sayıda olmuş oldu. Gruplarda AHL sinyal molekülleri ağırlıklı olduğu için bu çalışmadaki öngörümüze göre sadece QS inhibitör besiyerlerinden izole olan suşların gram negatif ağırlıklı olması beklenmekteydi, fakat çalışma sonunda sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde izole olan suşların %86'sını gram pozitif bakterilerin oluşturdu tespit edildi. Bu sonuç, ağız mikrobiyotasında gram pozitif bakterilerin negatiflere göre daha fazla oranda bulunması ile açıklanabilir.

Hazırlanan grupların QS inhibitör etkileri *C. violaceum* ve *P. aeruginosa* biyoindikatör suşlarına karşı test edildi. Bu bakteriler çeşitli AHL sinyal mekanizmalarını kullanarak sırasıyla viyolasin ve piyosiyenin pigmentlerini üretmektedirler. Ağız mikrobiyotasında gram pozitif bakteriler gram negatiflere göre daha fazla oranda bulunur (7). Bu nedenle inhibitör grupların gram pozitif bakterilerin kullandıkları AI-2 ve AIP sinyal mekanizmalarını engellediğini gösteren biyoindikatör suşların kullanılması daha değerli olabilirdi. Fakat bu sinyal moleküllerini kullanan biyoindikatör suşlara sahip olmamamız ve laboratuvarımızda viyolasin ve piyosiyenin inhibisyonu test etme yöntemlerine hakim olmamızdan dolayı oluşturulan grupların anti-QS etkileri gram negatif bakterilerin kullandıkları AHL sinyal moleküllerinin

inhibisyonuna yönelik oldu. Grup 1, 3 ve 4 için viyolasin üretiminde, grup 4 için *P. piyosyanin* üretiminde kontrole göre anlamlı bir inhibisyon tespit edildi.

Bir maddenin QS inhibitörü olması için hedef hücrede herhangi bir toksik etkiye ve QS ile ilgili olmayan fenotipik özelliklerinde bir değişikliğe yol açmaması, transkriptomik analiz ile sadece QS ile düzenlenen genlerin baskılandığının gösterilmesi ve/veya QS inhibitör adayının bakteride hedef molekülünün gösterilmesi gerekir (84). QS sinyal molekül yoğunluğu ortamda bulunan bakteri sayısı ile orantılıdır (3). Bu nedenle viyolasin ve *P. piyosyanin* konsantrasyonundaki azalma ortamda bulunan bakteri sayısındaki azalmadan kaynaklanabilir. Bir maddenin neden olduğu inhibisyonun QS inhibisyonundan mı yoksa toksik etkiden mi kaynaklandığını belirlemek için maddelerin hedef hücrelerde minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenebilir, “end point” olarak deney grupları ile kontrol grubu arasındaki bakteri konsantrasyonu karşılaştırılabilir veya üreme eğrisi yapılabilir. Bu yöntemler içerisinde üreme eğrisi QS inhibitör adayının toksik etki gösterip göstermediğinin tespit edilmesinde en duyarlı yöntemdir (84). Bu çalışmada biyoindikatör suşlarda pigment inhibisyonu yapan grupların suşlar üzerine toksik etki gösterip göstermedikleri üreme eğrisi grafiği oluşturularak tespit edildi. Grup 4’ün *P. aeruginosa*’nın üreme eğrisinde canlı hücre sayısı bakımından kontrole göre bir baskılamaya neden olmadığı tespit edilirken; grup 1, 3 ve 4’ün *C. violaceum*’un üreme eğrisi grafiğinin çeşitli evrelerinde canlı hücre sayısında baskılamaya neden oldukları görüldü. Grup 1, 3 ve 4’ü oluşturan maddelerin kullanım konsantrasyonları yarı yarıya indirilerek deneyler tekrarlandı. Grup 3 ve 4’ü oluşturan maddelerin normalde kullanıldıkları konsantrasyonlar ancak 8 kata kadar azaltıldığında üremede baskılamaya neden olmadıkları tespit edildi, fakat viyolasin üretim inhibisyonunda ortadan kalktığı görüldü. Grup 1’i oluşturan maddeler 16 kat sulandırıldıktan sonra bile viyolasin üretimindeki baskılanma kontrole göre anlamlı bir şekilde devam etti. Üreme eğrisinin ise sadece üçüncü saatinde (logaritmik faz) kontrole göre baskılanma tespit edildi. Sonuç olarak grup 3 ve 4’ün neden olduğu viyolasin inhibisyonu canlı hücre sayısındaki azalmadan, grup 1’in ise üremedeki baskılanmadan ziyade QS inhibisyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Viyolasin üretiminin en fazla olduğu dönem olarak bilinen üreme eğrisinin durağan fazında (56) grup 1 ile kontrol arasında bakteri konsantrasyonu bakımından farkın

olmaması, inkübasyon süresinin 48 saate kadar uzatıldığında bile viyolasin inhibisyonunun %100'e yakın devam etmesi gibi veriler bu düşünceyi desteklemektedir.

C. violaceum AHL sinyal molekülünü kullanarak viyolasin üretimini düzenlemektedir. Çalışmada kullandığımız *C. violaceum* ATCC 12472 LuxI/R mekanizmasının homoloğu olan CviI/R sisteminde uzun zincirli (C10-16) AHL sinyal moleküllerini kullanarak viyolasin üretimini düzenler (15, 56). Grup 1'in *C. violaceum*'da QS inhibisyonu ile viyolasin üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Grup 1; apigenin, 5-azasitidin, ellagik asit, vanilin, açılaz I ve fenotiyazin kimyasallarından oluşmaktadır. 5-azasitidin (49) AI-2; ellagik asit (33), vanilin (47) ve açılaz I (34) AHL; apigenin (50) ve fenotiyazin (52) ise LuxM ile sentezlenen AHL ve AI-2 sinyal inhibitörüdür. Ponnusamy ve ark. (47) vanilinin *C. violaceum* CV026'da kısa zincirli AHL sinyal moleküllerini değişen oranlarda, Truchado ve ark. (85) ellagik asidin *C. violaceum* CECT 494'de viyolasin üretimini hücre üremesini baskılamadan inhibe ettiklerini, Park ve ark. (86) *Streptomyces* türlerinden elde ettikleri açılaz enziminin C10-AHL sinyal molekülünü yıkımladıklarını göstermişlerdir. Grup 1'in neden olduğu viyolasin inhibisyonu vanilin, ellagik asit ve açılaz I enzimlerinden kaynaklanmış olabilir. İnhibisyon tek başına ellagik asit ve açılaz I enzimi ile gerçekleştiği gibi bu kimyasalların additif etkisinden de kaynaklanmış olabilir. Çünkü viyolasin inhibisyon deneyinde kontrol olarak vanilin kullanıldı ve vanilinin pigment üretimi üzerine etkisinin grup 1 kadar olmadığı görülmektedir (Şekil 3 ve 4). Bunun yanında *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun viyolasin üretiminde uzun zincirli AHL sinyal moleküllerini kullanması ve vanilinin düşük konsantrasyonlarda uzun zincirli sinyal molekül reseptörüne sinerjistik etki göstermesi esas alındığında grup 1'de görülen viyolasin inhibisyonunun kimyasalların additif etki göstermesinden kaynaklanmış olabilir. Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* PAO1 LuxI/R mekanizmasının homoloğu olan RhII/R sisteminde C4-AHL sinyal molekülünü kullanarak piyosyanin pigmentini üretmektedir (16). Bu çalışmada grup 4'ün kontrole göre canlı hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılamadan piyosyanin üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Grup 4; kuersetin, hamamelitannin, siklohekzanon, S-adenozilhomosistein, p-benzokinon ve indol maddelerini içermektedir. Kuersetin (50) LuxM ile sentezlenen AHL ve AI-2; hamamelitannin (55) AIP; siklohekzanon, S-adenzilhomosistein (30), p-benzokinon ve indol (32) AHL sinyal molekülü

inhibitörüdür. Lee ve ark. (87) indolün, Vasavi ve ark. (88) *Psidium guajava* ekstraktının flavanoid fraksiyonlarının konsantrasyona bağlı olarak piyosiyanın üretimini baskıladıklarını ve bu fraksiyonların kuersetin ve kuersetin-3-*O*-arabinoz yapısında olduğunu saptamışlardır. Grup 4'ün neden olduğu piyosiyanın üretimindeki baskılanma indol, p-benzokinon, S-adenozilhomosistein ve kuersetin kimyasallarından biri veya kombine etkisinden kaynaklanmış olabilir. Fakat indol tek başına kullanıldığında grup 4'den daha fazla piyosiyanın üretimini inhibe etmektedir (Şekil 5 ve 6). Bu durum grup 4'te bulunan diğer kimyasalların indolün etkisine zıt bir etki oluşturduğunu göstermektedir. Sikloheksanon analoglarının *P. aeruginosa*'da LasR inhibisyonu yaparken piyosiyanın üretimini düzenleyen RhIR reseptörü için aktive edici özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (30). Grup 4'te görülen piyosiyanın üretim inhibisyonunun, tek başına indole göre az olmasının nedeni sikloheksanon kimyasalının RhIR reseptörüne agonist etki göstermesinden kaynaklanabilir. Diğer gruplar içerisinde literatüre göre viyolasin ve piyosiyanın üretimini inhibe eden maddeler bulunmasına rağmen bu gruplarda pigment üretim inhibisyonu gerçekleşmedi. Bu durum maddelerin inhibisyon için yeterli konsantrasyonda kullanılmamaları, grupları oluşturan maddeler arasındaki uyumsuzluk gibi nedenlere bağlanabilir.

Ağız mikrobiyotasının QS inhibitörlü ve kontrol besiyerlerindeki kültürleri BHIA, TPSA ve R2A agar besiyerlerinde gerçekleşti. Tamponlanmış peptonlu su normalde gıda örneklerinden *Salmonella* izolasyonu için kullanılan bir ön zenginleştirme besiyeridir. Gıda katkı maddelerinden strese girerek hücresel hasara uğrayan ve kültür olma yeteneğini kaybeden *Salmonella* türlerinin izolasyonu için kültür edilmeden önce hücresel hasarının giderilmesi ve tekrar üreme yeteneğini kazanması gerekir. Bunun için tamponlama mekanizması iyi olan ve bakterinin yaşaması için optimal pH aralığını oluşturan tamponlanmış peptonlu su kullanılır (89, 90). Besiyeri içeriğinde bulunan pepton bakterilerin karbon, nitrojen, vitamin ve mineral ihtiyaçlarını karşılar, sodyum klorür ozmotik dengeyi, tamponlar besiyeri pH'sının dengelenmesini sağlar. R2A besiyeri daha çok içme sularındaki total bakteri sayısının tespit edilmesi için kullanılan bir besiyeridir. Düşük besin içeriği ile hızlı üreyen bakterilerin yavaş üreyenleri maskeleymesini engeller (91). BHIA zengin besin içeriği ile nazlı üreyen bakterilerin kültüründe kullanılan seçici olmayan bir besiyeridir. Bu çalışmada ağız boşluğunun ekolojisinde bakterilerin karşı karşıya kaldığı ve kültür olmalarını engelleyebilecek stres

faktörlerinin ortadan kaldırılması, kültürde hızlı üreyen bakterilerin yavaş üreyenleri baskılamaması ve nazlı üreyen bakterilerin kültür edilme oranını artırmak için üç farklı besiyeri kullanıldı. Bireylerden alınan ağız boşluğuna ait örnek kombinasyonlarından QS inhibitörlü ve kontrol besiyerlerine direkt ekimler yapıldığı gibi QS inhibitörlü ve inhibitörsüz %0.1 peptonlu su besiyerinde 24 saat ön zenginleştirme işleminden sonrada ekimler yapıldı. Ön zenginleştirme işleminde amaç bakterilerin sıvı ortamda inhibitörler ile daha iyi temasa geçmesini sağlamaktır. İnkübasyon sonunda her gruba ve kontrole ait tüplerden hazırlanan dilüsyonlar ile QS inhibitörlü ve kontrol agar besiyerlerine ekimler yapıldı. Peptonlu su (%0.1) bakteriler için izotonik bir ortam oluşturması ve minimal düzeyde besin maddesi içermesi nedeniyle tercih edildi.

Kültürler mikroaerofilik koşullarda gerçekleşti. Ağız mikrobiyotasının geneli anaerobik bakterilerden oluşmaktadır (12). Fakat kültürler ilk dört, yedi, 14. ve 35. günlerde örneklerdeki canlı hücre sayısının tespit edilmesi ve izole olan bakteriler yönünden detaylı bir şekilde analizinin yapılması için etüvden çıkartılıp biyogüvenlik kabini altına alındı. Bu koşullarda kültürler atmosfer havasına maruz kalacağı ve laboratuvarımızda anaerobik koşullar sağlanamadığı için kültürlerin mikroaerofilik koşullarda yapılmasına karar verildi.

QS inhibitörlü besiyerlerinin hazırlanmasında çift katlı agar besiyeri tekniği kullanıldı. Petri plağında alt kat %1.5 konsantrasyonunda agar içerecek ve 20 mL hacminde olacak şekilde döküldü. Üst kat %0.9 agar konsantrasyonunda, 5 mL hacminde ve gruplar için inhibitör madde, kontrol (hiçbir inhibitör içermeyen) için gruplardaki maddelerin hacmi kadar steril distile su içerecek şekilde hazırlandı. Üst kat, donmuş alt kat üzerine döküldü. Çalışmanın madde içeren tek katlı %1.5 agar konsantrasyonlu besiyerleri ile sürdürülmesi istendi. Fakat bir petri plağına ortalama 20 mL agar besiyeri döküleceği göz önüne alınırsa çalışmada kullanılan besiyeri çeşitliliği (üç besiyeri), birey sayısı (altı kişi) ve örneklerin dilüsyonları ile beraber fazla miktarda inhibitör maddeye ihtiyaç olacaktı. İnhibitör maddelerin maliyetide göz önüne alınarak çift katlı agar besiyeri tekniğinin kullanılmasına karar verildi.

Ağız boşluğuna ait örneklerden direkt QS inhibitörlü ve kontrol besiyerlerine yapılan ekimler sonrası gruplar ile kontrol arasında canlı hücre sayısı bakımından anlamlı bir fark olmadığı, ön zenginleştirme sonrasında ise grup 1 ve 3'ün kontrole göre

anlamlı bir şekilde üremeyi baskıladığı tespit edildi. Grupları oluşturan inhibitörler tükürük mikrobiyotasında üremeyi baskılamayan konsantrasyonlarda kullanılmış olmasına rağmen gruplar oluşturulduktan sonra maddelerin additif etki göstererek popülasyon üzerine antibakteriyel etki gösterdikleri düşünülmektedir. Bununla birlikte sadece ön zenginleştirme sonrası görülen baskılanmanın sıvı ortamda maddeler ile bakterilerin daha etkin karşılaşması ve toksik etkiye maruz kalmaları ile açıklanabilir.

Biyoundikatör suşlarda pigment inhibisyonu ve tüm kültürlerde canlı hücre sayılarının gruplar ile kontrol arasında istatistiksel anlamlılığının belirlenmesinde Mann-Whitney *U* testi kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygun olmaması ve deney tekrar sayısı ve/veya örneklem sayısının az olmasından dolayı bu istatistik testi seçildi (92).

Çalışma sonunda total olarak QS inhibitörlü besiyerinde gözlenen fakat kontrol besiyerlerinde gözlenmeyen 121 bakteri suşunun izole edildiği tespit edildi. Bu bakterilerin izole oldukları inhibitör grupları arasında en fazla grup 1 ve grup 2 inhibitörlerini içeren besiyerlerinin olduğu görüldü. Bireyler arasında en fazla OM1, en az OM4 bireyinden suş seçildi. Besiyerleri arasında en fazla suşun TPSA'dan seçildiği, BHIA ve R2A besiyerlerinden ise eşit sayıda suş seçiminin yapıldığı görüldü. Besiyerleri arasında izole olan canlı hücre sayısı bakımından kalitatif olarak bir fark tespit edilmedi.

Sadece inhibitör içeren besiyerlerinde izole olan 121 suş saflaştırıldıktan sonra gram, katalaz, oksidaz reaksiyonları ve hemoliz özelliklerine göre 29 ana gruba ayrıldı. gram pozitif kok zincirleri, katalaz ve oksidaz reaksiyonları negatif, γ hemolitik grubunun 28 suş ile en kalabalık grup olduğu görüldü. Ağız mikrobiyotasında *Streptococcus* türlerinin daha baskın olduğu (7) göz önüne alındığında bu durumun beklenen bir sonuç olması normaldir.

Gözlenen 121 suştan 28 tanesi 16S rRNA dizi analizi yapılmak üzere seçildi. Diziler insan ağız mikrobiyomu (www.homd.org) “16S rRNA BLAST Sequence” programı kullanılarak karşılaştırıldı. HOMD, ağız mikrobiyotasının 16S rRNA dizi analizinde referans bir sayfadır. HOMD'a göre eşleştirilen dizilerin homoloji gösterdiği

taksonlar ile identik olması için karşılaştırılan bazların en az %98.5 oranında homoloji göstermesi gerekir (7, 8).

Bakterilerde 16S rRNA bölgesi yüksek derecede korunmuş bir bölgedir. Bunun yanında dokuz tane yüksek derecede değişken bölgeler bulunur. Bu değişken bölgeler türler arası farklılığın ortaya çıkmasından sorumludur. 16S rRNA bölgesinin universal primerler kullanılarak çoğaltılması ve DNA dizi analizinin yapılması bakterilerin filogenetik çalışmalarında standart yöntem olarak kullanılmaktadır (93). Bu çalışmada bakterilerin 16S rRNA dizi analizi önce 27F primeri ile yapıldı. Bir reaksiyonda yaklaşık 1500 bazlık 16S rRNA bölgesinin ortalama 750 bazı dizilendi. Diziler Chromas programı ile kontrol edildi. Eksik ve/veya hatalı nükleotitler el ile düzeltildi. Blast analizi sonrası listede çıkan taksonlar ile eşleşmeyen nükleotit sayısı ≥ 23 baz olan örneklerin ikinci bir primer ile dizilemesinin yapılmasına gerek duyulmadı. Çünkü bu örneklerde kalan bazlar tam olarak eşleşse bile benzerlik yüzdesinin %98.5'a ulaşması imkansızdı. Çalışma sonunda dizi analizi yapılan 28 suştan 20 tanesinin homoloji gösterdikleri taksonlar ile en az %98.5, sekiz tanesinin %98.5'dan az benzerlik gösterdiği tespit edildi.

En az %98.5 oranında eşleşme gösteren taksonların 17 tanesinin daha önce kültür edilen ve adlandırılan, üç tanesinin kültür edilen fakat adlandırılmamış taksonlar ile homoloji gösterdikleri tespit edildi. Adlandırılmayan taksonların *Streptococcus* sp. ile homoloji gösterdikleri belirlendi. Bu taksonlardan *Streptococcus* sp. HOT 061'in daha önce kültür edildiği fakat takson dosyasında kültür statüsünün kayıp olarak geçtiği görüldü. Bu durum önceden kültür edilmiş bu taksonun kültür koleksiyonunun kaybolmasından veya tekrar canlandırılmamış olmasından kaynaklanmış olabilir. Çalışma sonunda bahsi geçen bu suşu sadece QS inhibitörlü besiyerinde izole ederek anabilim dalımızın kültür koleksiyonuna kazandırmış olduk. Diğer adlandırılmamış *Streptococcus* taksonlarının HOT 431 ile homoloji gösterdikleri tespit edildi.

HOMD üzerinde 35000'nin üzerinde klonun 16S rRNA dizi analizi gerçekleşmiş ve yaklaşık 700 taksona ait 800'den fazla tam uzunluğunda 16S rRNA dizi kütüphanesi oluşturulmuştur. Şimdiye kadar ağız boşluğunda tespit edilmiş tüm taksonların taksonomik sınıflandırması ve verilerine HOMD'un sayfasından ulaşılabilir. Benzerlik yüzdesi HOMD'a göre %98.5'dan küçük çıkan sekiz suş için HOMD veritabanında

homolojilerinin bulunmadığı düşünülerek başka bir gen bankasının (www.ncbi.nlm.nih.gov) nükleotit BLAST programı kullanıldı. HOMD'a göre:

A. bolidensis ile %93.5 oranında benzerlik gösteren 16S rRNA dizisinin NCBI'a göre %99 oranında *C. flaccumfaciens* ile homoloji gösterdiği, *B. anthracis* ile %96.5 oranında benzerlik gösteren dizinin NCBI'a göre %99 oranında *Bacillus* sp. TR7 suşu ile homoloji gösterdiği tespit edildi. *C. diphteria* ile %96.1 oranında ile benzerlik gösteren 16S rRNA dizisinin NCBI'a göre %99 oranında *C. argentoratense* ile homoloji gösterdiği saptandı. *C. durum* ile %98.1 oranı ile benzerlik gösteren iki farklı bireye ait 16S rRNA dizilerinin NCBI'a göre $\geq$ %98 oranında kültür edilmemiş bakteri klonları ile homoloji gösterdikleri tespit edildi.

Yüzde 93.2 ve %98 oranında daha önce kültür edilmemiş *Kocuria* sp. HOT 189 filotipi ile benzerlik gösteren OM1-2-21 ve OM1-1-48 suşlarının NCBI'a göre sırasıyla %98 oranında *Micrococcus* sp. ve %99 oranında *Kocuria rhizophila* ile homoloji gösterdikleri belirlendi. *N. bacilliformis* ile %98.4 oranında benzerlik gösteren dizinin NCBI'a göre %98 oranında yine *N. bacilliformis* ile homoloji gösterdiği tespit edildi. Chromas programı ile diziler dikkatlice kontrol edilse bile dizi analizi için reaksiyona yeterli ve/veya tam pürifiye PCR ampikonu sağlanmadıkça dizi kalitesi çok iyi olmayabilir. Bu nedenle HOMD'a göre tür tanısı için sınır değerde eşleşme göstermeyen dizimiz gerçekte de *N. bacilliformis* olması muhtemeldir.

QS inhibitörlü besiyerlerinden seçilen suşların homoloji gösterdikleri taksonlar ile oluşturulan filogenetik ağaçta *Actinobacteria*, *Firmicutes* ve *Proteobacteria* şubelerinden oluşan üç ana dalın bulunduğu görülmektedir. Dizi analizi yapılan 28 suşun %50'nin *Actinobacteria*, %35.7'nin *Firmicutes*, %14.3'nün *Proteobacteria* şubesinde yer aldığı belirlendi. Filogenetik analiz sonunda (Şekil 28);

OM1-2-11, OM1-1-27, OM3-2-15 ve OM4-2-12 suşlarının *Proteobacteria* şubesinden *Neisseria* türleri ile homoloji gösterdikleri saptandı. OM1-2-11 ve OM4-2-12 suşları gram negatif kok morfolojisi gösteren sırasıyla *N. flavescens* ve *N. sicca* türleriyle, OM1-2-27 ve OM3-2-15 suşları gram negatif basil olan *N. bacilliformis* ile aynı dalda oldukları görülmektedir.

OM1-3-24 ve OM1-3-25 suşlarının sırasıyla homoloji gösterdikleri *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfını, *Bacillaceae* takımında bulunan *S. epidermidis* ve *Bacillus* sp. TR7 suşları ile aynı dalda oldukları görülmektedir.

OM1-3-32, OM2-1-43, OM3-1-22, OM3-2-25, OM4-1-47, OM5-2-35, OM5-3-58 ve OM6-3-31 *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfını, *Lactobacillales* takımında bulunan *Streptococcus* türleri ile aynı dalda bulundukları görülmektedir. Bunların içerisinde OM3-1-22, OM3-2-25, OM4-1-47, OM5-3-58 ve OM6-3-31 suşlarının diğer *Streptococcus* türlerine göre birbirleri ile daha yakın bir soyda oldukları görülmektedir. OM2-1-43 suşunun, *S. australis* taksonu ile %99 oranında homoloji göstermesine rağmen *S. australis* ile filogenetik ağaçta farklı dallarda bulunması ve monofilatik bir grup oluşturması göze çarpmaktadır.

OM2-1-14, OM2-2-33, OM3-2-34, OM5-2-29, OM6-2-32 ve OM6-2-41 suşlarının *Actinobacteria* şubesi, *Actinobacteria* sınıfı, *Actinomycetales* takımı, *Micrococcaceae* ailesinde bulunan *Rothia* türleri ile aynı dalda oldukları görülmektedir. OM6-2-32 dışındaki türlerin *R. aeria*, OM6-2-32'nin *R. dentocariosa* ile aynı soydan oldukları görülmektedir. Filogenetik ağaca bakıldığında OM2-2-33'ün konumu dolayısıyla *R. aeria*'nın yeni bir alt türü olması mümkündür.

OM1-2-21 ve OM1-1-48 HOMD veritabanına göre sırasıyla %93.2 ve %98 oranında daha önce kültür edilmemiş *Kocuria* sp. HOT 189 filotipi ile homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat homoloji oranları <%98.5 olduğu için bu suşların eşleşen bu takson ile identik olduğu kanısına varılamazdı. Bunun üzerine bu iki suşa ait diziler NCBI veritabanında bulunan taksonlar ile karşılaştırıldı. Filogenetik ağaçta da görüldüğü üzere OM1-2-21 ve OM1-1-48 suşlarının sırasıyla %98 oranında *Micrococcus* sp. ve %99 oranında *Kocuria rhizophila* taksonları ile homoloji gösterdikleri tespit edildi.

OM2-2-28, OM4-2-27, OM5-2-31 ve OM6-2-30 suşlarının *Corynebacteriales* takımı altında *Corynebacterium* türlerine ait oldukları görülmektedir. OM2-2-28 ve OM5-2-31 suşları HOMD veritabanına göre %98.1 oranında *C. durum* HOT 595 ile homoloji gösterdikleri tespit edilmişti. NCBI veritabanına göre ise OM2-2-28 ve OM5-2-31 sırasıyla %98 ve %99 oranında farklı erişim numaralarına sahip kültür edilmemiş

bakteri klonları ile homoloji gösterdikleri belirlendi. Filogenetik ağaca göre kültür edilmemiş bu bakteri klonlarının *C. durum*'a yakın soylar oldukları görülmektedir. OM5-2-31'in ise filogenetik ağaçtaki konumuna göre *Corynebacterium* türleri içerisinde farklı bir alt tür olması ihtimaldir.

OM6-2-42, *Actinomycetales* takımı, *Actinomycetaceae* ailesi içinde bulunan *A. naeslundii* türü ile aynı dalda bulunan bir suştur. OM6-3-14 ise HOMD'a göre %93.5 oranında *Micrococcales* takımı, *Intrasporangiaceae* ailesinden *A. bolidensis* ile benzerlik göstermesine rağmen filogenetik ağaca bakıldığında *Actinomycetales* takımında *Microbacteriaceae* ailesinde bulunan ve NCBI'a göre %99 oranında benzerlik gösteren *C. flaccumfaciens* ile aynı soyda oldukları net bir şekilde görülmektedir.

Suşlarımızın dizi analizleri sonucu homoloji gösterdikleri taksonların HOMD veritabanına göre moleküler yöntemler ile sağlıklı ve hasta bireylerin ağız boşluğundan saptanma oranlarına bakıldığında *S. sanguinus*, %2.44; *S. gordonii*, %1.37; *S. infantis*, %0.596; *R. dentocariosa*, %0.593; *S. tigurinus*, %0.542; *S. australis*, %0.513; *C. matruchotii*, %0.485; *Streptococcus* sp. HOT 431, %0.401; *N. flavescens*, %0.33; *N. sicca*, %0.281; *A. naeslundii*, %0.226; *N. bacilliformis*, %0.155, *Streptococcus* sp. HOT 61, %0.14, *C. durum*, %0.0803; *R. aerea*, %0.0602, *S. epidermidis*, %0.0086; *Kocuria* sp. HOT 189, %0.00573 oldukları görülmektedir. *B. anthracis*, *A. bolidensis* ve *C. diphtheria* taksonları ise %0 oranında tespit edilmiştir (8). OM1-2-21, OM1-3-25, OM1-1-48, OM6-3-14, OM6-2-30 suşlarının NCBI'a göre homoloji gösterdikleri *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. TR7, *K. rhizophila*, *C. flaccumfaciens*, *C. argentoratense* taksonlarının HOMD veritabanında bulunmadıkları görüldü.

Bu suşlar sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde izole oldukları için potansiyel daha önce kültür edilmemiş bakteriler veya yeni tür/alt türler olarak değerlendirilmişti. Ancak, görüldüğü üzere seçtiğimiz suşların daha önce kültür edilmiş taksonlar ile homoloji gösterdikleri görülmektedir. Besiyerlerine katılan QS inhibitörleri bakterilerin koloni konfigürasyonunda morfolojik değişikliğe neden olmuş olabilirler. Bu yüzden seçtiğimiz suşları sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde gözlemlemiş olabiliriz. Buna ilaveten inhibitörler mikrobiyotada bazı spesifik popülasyonların üremelerini baskılamış olabilirler. Böylece baskılanan popülasyonlardan dolayı, üremesi nazlı veya yavaş olan

türlerin kendilerini göstermeleri için fırsat doğmuş olabilir. Ayrıca inhibitörler seçici etki gösterip bazı popülasyonların üremesini teşvik ederek onları ön plana çıkarmış olabilirler. QS inhibitörü içermeyen besiyerlerinde bu bakteriler hızlı üreyenler ya da dominant türler tarafından baskılanacağı için çalışılan dilüsyonlarda izole olmamış olabilirler. Bunun dışında gerek direkt, gerekse ön zenginleştirmeli kültürlerden üç dilüsyonlu (direkt ekimler için 10^{-3} - 10^{-5} , ön zenginleştirme sonrası için 10^{-2} - 10^{-4} dilüsyonlarından) ekimler yapıldı. Bu nedenle inhibitörlü besiyerinde bazı popülasyonların baskılanmasıyla veya inhibitörlerin üremeyi teşvik etmesiyle seçilen suşlar daha alt dilüsyonlardan yapılan ekimlerde gözlenirken kontrol besiyerlerinde çalışılmayan üst dilüsyonlarda kalmış olabilirler.

Bu çalışmada sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde izole olan ve 16S rRNA dizi analizine göre *R. aeria* ile homoloji gösteren beş suşun farklı zamanlarda çalışılan dört bireyden izole olması ve *R. aeria*'nın HOMD'a göre ağız boşluğunda bulunma oranının %0.0602 olması göze çarpmaktadır.

R. aeria, Li ve ark. (94) tarafından 2004 yılında tanımlanmış bir bakteridir. İlk olarak Rusya'nın Mir uzay istasyonunun hava ve su örneklerinden izole edilmiştir. Haraszthy ve ark. (95) tarafından sağlıklı bireylerin ağız boşluğunda tespit edilmiştir. Ayrıca, insanlarda sepsis, bronşit, pneumoni ve endokardite neden olabilirler (96).

Tsuzukibashi ve ark. (97) *Rothia* türleri için geliştirdikleri seçici bir besiyeri (trypton, sodyum glukonat, Lab-Lemco tozu, sodyum florid, nötral akriflavin, linkomisin, kolistin ve agar) ile 20 kişiye ait tükürük örneğinden bakteri izolasyonu yapmışlar ve mikrobiyotadaki bakterileri baskılayarak sadece *Rothia* türlerinin izole olmasına olanak sağlamışlardır. Nebuka ve arkadaşları (96) trypton, sodyum glukonat, Lab-Lemco tozu, aztreonam ve agar içeren bir besiyeri hazırlayarak *Actinomyces*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Rothia dentocariosa* ve *Rothia mucilaginosa* türlerinin üremelerini baskılayan fakat *R. aeria* izolasyonunu kolaylaştıran seçici bir besiyeri geliştirmişlerdir.

Bu çalışma sonunda da özellikle grup 1 ve 2 inhibitörlerini içeren besiyerlerinde mikrobiyotadan *R. aeria* izolasyonunun ön plana çıktığı görülmektedir (Resim 4, 7 ve 11).

Sonuç olarak, QS inhibitörlerinin ağız mikrobiyotasının popölasyon yoğunluklarını değiştirdiğini ve kontrol besiyerlerine göre farklı bakterilerin izolasyonuna olanak sağladığını gösterdi. Bu alışma sonunda QS inhibitörlerinin örnekte düşük yoğunlukta bulunan bakterilerin “üreme veya üremeyi yavaşlat” sinyallerini engelleyerek bu bakterilerin daha kolay kùltür edilmelerinin sağlanabileceğine dair bulgular elde edilmiştir. Herhangi bir ekosistemden ve diğer vùcut bölgelerinden yapılacak bakteri izolasyonu çalışmalarında biyoçeşitliliği artırmak adına klasik besiyerleri ile birlikte QS inhibitörlerini içeren besiyerlerinin de kullanılması önerilir.



8. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Çalışmaya dahil edilen QS inhibitörlerinin ileri çalışmalarda kullanılmak üzere tükürük mikrobiyotasında üremeyi baskılamayan maksimum konsantrasyonları tespit edildi.
2. QS inhibitörlerinden her grupta altı madde olacak şekilde beş grup oluşturuldu.
3. Oluşturulan grupların anti-QS özellikleri *C. violaceum*'da viyolasin ve *P. aeruginosa*'da piyosiyenin pigmentlerinin üretimi üzerine test edildi. Grup 1'in viyolasin, grup 4'ün piyosiyenin pigment üretimlerini QS inhibisyonu yaparak inhibe ettikleri belirlendi.
4. Sağlıklı altı bireyin ağız boşluğu örnekleri QS inhibitörlü ve kontrol besiyerlerinde kültür edildi. Direkt ekimler sonrası canlı hücre sayısı bakımından inhibitör grupları ve kontrol besiyeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmezken, ön zenginleştirme sonrası grup 1 ve 3'ün kontrole göre canlı hücre sayısını anlamlı bir şekilde baskıladıkları tespit edildi.
5. QS inhibitörlü besiyerlerinde izole olan fakat kontrol besiyerlerinde izole olmayan 121 suş tespit edildi. Kontrol besiyerlerinde gözlenmeyen bu suşların ağırlıklı olarak grup 1 ve grup 2 inhibitörlerini içeren besiyerlerinden izole oldukları görüldü.
6. Seçilen 121 suşun standart bakteriyolojik yöntemlere göre 29 ana gruba ayrıldığı belirlendi. Seçilen suşların ağırlıklı olarak katalaz ve oksidaz reaksiyonları negatif, α hemolitik, gram pozitif kok zincir yapısında oldukları görüldü. Sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde izole olan 121 suştan 28'inin 16S rRNA dizi analizi yapıldı. Dizi analizi sonunda 20 suşun HOMD veritabanında bulunan taksonlar ile $\geq 98.5\%$, sekiz suşun $< 98.5\%$ oranında homoloji gösterdikleri belirlendi.
7. HOMD veritabanında bulunan taksonlar ile $\geq 98.5\%$ oranında homoloji gösteren taksonların üç tanesi adlandırılmamış *Streptococcus* sp., beş tanesi *R. aeria*, diğerleri *A. naeslundii*, *C. matruchotii*, *N. bacilliformis*, *N. flavescens*, *N. sicca*, *R. dentocariosa*, *S. epidermidis*, *S. australis*, *S. gordonii*, *S. infantis*, *S. sanguinus* ve *S. tigurinus* olarak tespit edildi. HOMD'a göre bu taksonların hepsinin daha önce kültür edildikleri, ancak adlandırılmamış *Streptococcus* sp. türlerinden HOT 061

adlı taksonun kültür statüsünün kayıp olarak geçtiği görüldü. HOMD veritabanında bulunan taksonlar ile <98.5 oranında homoloji gösteren suşların iki tanesinin daha önce kültür edilmemiş *Kocuria* sp. HOT 189 taksonu ile diğerlerinin *A. bolidensis*, *B. anthracis*, *C. diphtheria* ve *N. bacilliformis* taksonları ile homoloji gösterdikleri tespit edildi. Ancak, bu taksonların homoloji oranları <98.5 olduğu için diziler NCBI'nin gen bankasında bulunan taksonlar ile de karşılaştırıldı. Buna göre sekiz suşun ≥ 98 oranlarında iki tanesi daha önce kültür edilmemiş bakteri klonları ile, diğerleri *Bacillus* sp., *C. flaccumfaciens*, *C. argentoratense*, *Micrococcus* sp. ve *Kocuria rhizophila* ile homoloji gösterdikleri tespit edildi.

8. Oluşturulan filogenetik ağaçta suşların homoloji gösterdikleri taksonlar ile olan yakınlıkları gösterildi. Ancak, HOMD'a göre *S. australis* ile 99 oranında homoloji gösteren OM2-1-43 kodlu suşun *S. australis* ile farklı dalda bulunması ve bulunduğu dalda başka taksonların olmaması bu suşun *Streptococcus* cinsi altında yeni bir tür veya alt tür olma ihtimalini göstermektedir. Bunun yanında *R. aeria* ile 99 ve *C. durum* ile 98.1 oranında homoloji gösteren OM2-2-33 ve OM5-2-31 kodlu suşların filogenetik ağaçtaki konumlarına göre yeni bir alt tür olma olasılıkları vardır. Bunların teyit edilmesi için 23s rRNA, ITS (Internal transcribed sequences), *groE1*, *rpoB*, *recA* ve *gyrB* gibi bölgelerin ve hatta tüm kromozomal DNA'nın dizilenmesi önerilir.
9. Bu çalışmada sadece QS inhibitörlü besiyerlerinde izole olan ve 16S rRNA dizi analizine göre *R. aeria* ile homoloji gösteren beş suşun farklı zamanlarda çalışılan dört bireyden izole olması ve *R. aeria*'nın HOMD'a göre ağız boşluğunda bulunma oranının 0.0602 olması göze çarpmaktadır. Bu sonuçtan dolayı *R. aeria* türlerinin izolasyonu için QS inhibitörleri ile seçici bir besiyeri geliştirilmesine yönelik çalışmaların yapılması önerilir.
10. QS inhibitörlü besiyerlerinden izole edilen ve dizi analizi gerçekleştirilmeyen 93 suşun 16S rRNA dizi analizlerinin yapılması ve homoloji gösterdikleri taksonların belirlenmesi önerilir. Böylece bu tez çalışmasının ön gördüğü hipotezin yerine ulaşması adına bu taksonların daha önce kültür edilip edilmediklerinin tespit edilmesi gerekir.

11. Herhangi bir örnekten yapılacak bakteri izolasyonu çalışmalarında biyoçeşitliliği artırmak adına kullanılan standart besiyerlerine ilave olarak QS inhibitörleri ile hazırlanmış besiyerlerinin de kullanılması önerilir.



9. KAYNAKLAR

1. Kuhner CH, Marrs B, Romesser JA. (2009). Method for accessing microbial diversity. United States Patent No: 7,494,810.2.
2. McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P (1997). Dec. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143 (12): 3703-3711.
3. Gonzalez JE, Keshavan ND (2006). Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(4): 859-875.
4. Williams P (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 15 (12): 3923-3938.
5. Lade H, Paul D, Kweon JH (2014). Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling. *Int J Biol Sci* 10(5): 550-565.
6. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43(11): 5721-5732.
7. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG (2010). The human oral microbiome. *J Bacteriol* 192(19): 5002-5017.
8. Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE (2010). The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database* 2010.
9. Arathi K, Prasad G, Shetty SJ, Iype AK (2015). Uncultivable bacteria in the oral cavity: A review. *Int J Adv Med Health Res* 11(1): 16-19.
10. Siqueira Jr JF, Rôças IN (2013). As-yet-uncultivated oral bacteria: breadth and association with oral and extra-oral diseases. *J Oral Microbiol* 5(1): 21077.
11. Puspita ID, Kamagata Y, Tanaka M, Asano K, Nakatsu CH (2012). Are uncultivated bacteria really uncultivable? *Microbes Environ* 27(4): 356-366.
12. Bhat KG (2014). Recent advances in periodontal microbiology: An update on cultivation techniques. *J Int Clin Dent Res Organ* 6(1): 16.
13. Saraçlı MA (2006). "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Gülhane Tıp Derg* 48(4): 244-250.

14. Loh J, Carlson RW, York WS, Stacey G (2002). Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proc Natl Acad Sci* 99(22): 14446-14451.
15. Morohoshi T, Kato M, Fukamachi K, Kato N, Ikeda T (2008). N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol Lett* 279(1): 124-130.
16. Kalia M, Yadav VK, Singh PK, Sharma D, Pandey H, Narvi SS, Agarwal V (2015). Effect of cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 10(8): e0135495.
17. Swift S, Karlyshev AV, Fish L, Durant EL, Winson MK, Chhabra SR, Williams P, Macintyre S, Stewart G (1997). Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. *J Bacteriol* 179(17): 5271-5281.
18. Callahan SM, Dunlap PV (2000). LuxR-and Acyl-Homoserine-Lactone-Controlled Non-luxGenes Define a Quorum-Sensing Regulon in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* 182(10): 2811-2822.
19. Sokol P, Sajjan U, Visser M, Gingues S, Forstner J, Kooi C (2003). The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. *Microbiology* 149(12): 3649-3658.
20. Sperandio V, Torres AG, Girón JA, Kaper JB (2001). Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *J Bacteriol* 183(17): 5187-5197.
21. Wood TK (2009). Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. *Environ Microbiol* 11(1): 1-15.
22. Rader BA, Wreden C, Hicks KG, Sweeney EG, Ottemann KM, Guillemin K (2011). *Helicobacter pylori* perceives the quorum-sensing molecule AI-2 as a chemorepellent via the chemoreceptor TlpB. *Microbiology* 157(9): 2445-2455.
23. Ahmed NA, Petersen FC, Scheie AA (2007). AI-2 quorum sensing affects antibiotic susceptibility in *Streptococcus anginosus*. *J Antimicrob Chemother* 60(1): 49-53.

24. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP (2004). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186(6): 1838-1850.
25. Ni N, Li M, Wang J, Wang B (2009). Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Med Res Rev* 29(1): 65-124.
26. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R (2013). Quorum sensing and phytochemicals. *Int J Mol Sci* 14(6): 12607-12619.
27. Adak S, Upadrasta L, Kumar SJ, Soni R, Banerjee R (2011). Quorum quenching— an alternative antimicrobial therapeutics. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* (Ed: Mendez-Vilas, A). Badajoz: 586-593.
28. Guo M, Gamby S, Zheng Y, Sintim HO (2013). Small molecule inhibitors of AI-2 signaling in bacteria: state-of-the-art and future perspectives for anti-quorum sensing agents. *Int J Mol Sci* 14(9): 17694-17728.
29. Ivanova K, Fernandes M, Tzanov T (2013). Current advances on bacterial pathogenesis inhibition and treatment strategies. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (Ed: Mendez-Vilas, A). Badajoz: 322-336.
30. Kalia VC (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol Adv* 31(2): 224-245.
31. Vasavi HS, Arun AB, Rekha PD (2013). Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by *Syzygium cumini* L. and *Pimenta dioica* L. *Asian Pac J Trop Biomed* 3(12): 954-959.
32. Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M, Kristoffersen P, Kote M, Nielsen J, Eberl L, Givskov M (2005). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol* 187(5): 1799-1814.
33. Huber B, Eberl L, Feucht W, Polster J (2003). Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Z Naturforsch C* 58(11-12): 879-884.
34. Paul D, Kim YS, Ponnusamy K, Kweon JH (2009). Application of quorum quenching to inhibit biofilm formation. *Environ Eng Sci* 26(8): 1319-1324.

35. Watson WT, Minogue TD, Val DL, von Bodman SB, Churchill ME (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell* 9(3): 685-694.
36. Dagorn A, Hillion M, Chapalain A, Lesouhaitier O, Poc CD, Vieillard J, Chevalier S, Taupin L, Le Derf F, Feuilloley MG (2013). Gamma-aminobutyric acid acts as a specific virulence regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 159(2): 339-351.
37. Chevrot R, Rosen R, Haudecoeur E, Cirou A, Shelp BJ, Ron E, Faure D (2006). GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci* 103(19): 7460-7464.
38. Hanzelka BL, Greenberg E (1996). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J Bacteriol* 178(17): 5291-5294.
39. Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Greenberg E (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci* 96(8): 4360-4365.
40. Bodini S, Manfredini S, Epp M, Valentini S, Santori F (2009). Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. *Lett Appl Microbiol* 49(5): 551-555.
41. Brackman G, Celen S, Hillaert U, Van Calenbergh S, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T (2011). Structure-activity relationship of cinnamaldehyde analogs as inhibitors of AI-2 based quorum sensing and their effect on virulence of *Vibrio* spp. *PLoS One* 6(1): e16084.
42. Niu C, Afre S, Gilbert E (2006). Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Lett Appl Microbiol* 43(5): 489-494.
43. Bandara MB, Zhu H, Sankaridurg PR, Willcox MD (2006). Salicylic acid reduces the production of several potential virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with microbial keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(10): 4453-4460.
44. Mukherji R, Joshi-Navare K, Prabhune A (2013). Crystalline xylitol production by a novel yeast, *pichia caribbica* (HQ222812), and its application for quorum sensing inhibition in gram-negative marker strain *chromobacterium violaceum* CV026. *Appl Biochem Biotechnol* 169(6): 1753-1763.

45. Bjarnsholt T, Jensen PO, Rasmussen TB, Christophersen L, Calum H, Hentzer M, Hougen HP, Rygaard J, Moser C, Eberl L, Hoiby N, Givskov M (2005). Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology* 151(12): 3873-3880.
46. Norizan SN, Yin WF, Chan KG (2013). Caffeine as a potential quorum sensing inhibitor. *Sensors (Basel)* 13(4): 5117-5129.
47. Ponnusamy K, Paul D, Kweon JH (2009). Inhibition of quorum sensing mechanism and *Aeromonas hydrophila* biofilm formation by vanillin. *Environ Eng Sci* 26(8): 1359-1363.
48. Choo J, Rukayadi Y, Hwang JK (2006). Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Lett Appl Microbiol* 42(6): 637-641.
49. Yadav MK, Chae S-W, Song J-J (2012). Effect of 5-azacytidine on in vitro biofilm formation of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* 53(5): 219-226.
50. Vikram A, Jayaprakasha G, Jesudhasan P, Pillai S, Patil B (2010). Suppression of bacterial cell–cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *J Appl Microbiol* 109(2): 515-527.
51. Girenavar B, Cepeda ML, Soni KA, Vikram A, Jesudhasan P, Jayaprakasha G, Pillai SD, Patil BS (2008). Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *Int J Food Microbiol* 125(2): 204-208.
52. Ni N, Choudhary G, Li M, Wang B (2009). A new phenothiazine structural scaffold as inhibitors of bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Biochem Biophys Res Commun* 382(1): 153-156.
53. Cugini C, Calfee M, Farrow JM, Morales DK, Pesci EC, Hogan DA (2007). Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 65(4): 896-906.
54. Brackman G, Breyne K, De Rycke R, Vermote A, Van Nieuwerburgh F, Meyer E, Van Calenbergh S, Coenye T (2016). The quorum sensing inhibitor hamamelitannin increases antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms by affecting peptidoglycan biosynthesis and eDNA release. *Sci Rep* 6: 20321.

55. Kiran MD, Adikesavan NV, Cirioni O, Giacometti A, Silvestri C, Scalise G, Ghiselli R, Saba V, Orlando F, Shoham M (2008). Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. *Mol Pharmacol* 73(5): 1578-1586.
56. Durán N, Justo GZ, Durán M, Brocchi M, Cordi L, Tasic L, Castro GR, Nakazato G (2016). Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnol Adv* 34(5): 1030-1045.
57. Kwan JC, Meickle T, Ladwa D, Teplitski M, Paul V, Luesch H (2011). Lyngbyoic acid, a “tagged” fatty acid from a marine cyanobacterium, disrupts quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Biosyst* 7(4): 1205-1216.
58. Külekçi G (2013). Ağız sağlığının yeni tanımı: Ağız mikrobiyomu. *Ankem Derg* 27(3): 167-172.
59. Ruby J, Goldner M (2007). Nature of symbiosis in oral disease. *J Dent Res* 86(1): 8-11.
60. Külekçi G, Gökbuget A (2009). Ağız mikroflorasının genel sağlığa etkisi. *Ankem Derg* 23(3): 137-145.
61. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W (2009). Defining the healthy" core microbiome" of oral microbial communities. *BMC microbiol* 9(1): 259.
62. Jenkinson HF (2011). Beyond the oral microbiome. *Environ Microbiol* 13(12): 3077-3087.
63. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000 42(1): 80-87.
64. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43(11): 5721-5732.
65. Ahn J, Yang L, Paster BJ, Ganly I, Morris L, Pei Z, Hayes RB (2011). Oral microbiome profiles: 16S rRNA pyrosequencing and microarray assay comparison. *PloS One* 6(7): e22788.
66. Sizova M, Hohmann T, Hazen A, Paster B, Halem S, Murphy C, Panikov N, Epstein S (2012). New approaches for isolation of previously uncultivated oral bacteria. *Appl Environ Microbiol* 78(1): 194-203.

67. Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG (2010). Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 309(1): 1-7.
68. Oliver JD (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34(4): 415-425.
69. Juven B, Cox N, Bailey J, Thomson J, Charles O, Shutze J (1984). Recovery of *Salmonella* from artificially contaminated poultry feeds in non-selective and selective broth media. *J Food Prot* 47(4): 299-302.
70. Tian Y, He X, Torralba M, Yooseph S, Nelson KE, Lux R, McLean JS, Yu G, Shi W (2010). Using DGGE profiling to develop a novel culture medium suitable for oral microbial communities. *Mol Oral Microbiol* 25(5): 357-367.
71. Kiliç AO, Pavlova SI, Alpay S, Kiliç SS, Tao L (2001). Comparative Study of Vaginal *Lactobacillus* Phages Isolated from Women in the United States and Turkey: Prevalence, Morphology, Host Range, and DNA Homology. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(1): 31-39.
72. Chen WP, Kuo TT (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 21(9): 2260.
73. Dante D, Gebru E, Lee S, Suh J, Park S (2013). Evaluation of anti-quorum sensing activity of 97 indigenous plant extracts from Korea through bioreporter bacterial strains *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microb Biochem Technol* 5(2): 42-46.
74. Rudrappa T, Bais HP (2008). Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *J Agric Food Chem* 56(6): 1955-1962.
75. Adonizio A, Kong KF, Mathee K (2008). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrob Agents Chemother* 52(1): 198-203.
76. Tan LY, Yin WF, Chan KG (2013). *Piper nigrum*, *Piper betle* and *Gnetum gnemon*-natural food sources with anti-quorum sensing properties. *Sensors (Basel)* 13(3): 3975-3985.

77. McInnes P, Cutting M (2010). Manual of procedures for human microbiome project: Core microbiome sampling, protocol A, HMP protocol no. 07–001, version 11. 2010. Current version: http://hmpdacc.org/doc/HMP_MOP_Version12_0_072910.pdf.
78. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30(12): 2725-2729.
79. Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4): 406-425.
80. Smith KM, Bu Y, Suga H (2003). Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chem Biol* 10(1): 81-89.
81. Jones SM, Dang TT, Martinuzzi R (2009). Use of quorum sensing antagonists to deter the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 34(4): 360-364.
82. Kim J, Park W (2013). Indole inhibits bacterial quorum sensing signal transmission by interfering with quorum sensing regulator folding. *Microbiology* 159(12): 2616-2625.
83. Brackman G, Hillaert U, Van Calenbergh S, Nelis HJ, Coenye T (2009). Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*. *Res Microbiol* 160(2): 144-151.
84. Defoirdt T, Brackman G, Coenye T (2013). Quorum sensing inhibitors: how strong is the evidence? *Trends Microbiol* 21(12): 619-624.
85. Truchado P, Tomás-Barberán FA, Larrosa M, Allende A (2012). Food phytochemicals act as quorum sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*. *Food Control* 24(1): 78-85.
86. Park SY, Kang HO, Jang HS, Lee JK, Koo BT, Yum DY (2005). Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol* 71(5): 2632-2641.

87. Lee J, Attila C, Cirillo SL, Cirillo JD, Wood TK (2009). Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microb Biotechnol* 2(1): 75-90.
88. Vasavi HS, Arun AB, Rekha PD (2014). Anti-quorum sensing activity of *Psidium guajava* L. flavonoids against *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiol Immunol* 58(5): 286-293.
89. Sadovski A (1977). Acid sensitivity of freeze injured salmonellae in relation to their isolation from frozen vegetables by pre-enrichment procedure. *J Fd Technol*. 12(1): 85-91.
90. Thomason BM, Dodd DJ, Cherry WB (1977). Increased recovery of salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. *Appl Environ Microbiol* 34(3): 270-273.
91. Reasoner DJ, Geldreich E (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49(1): 1-7.
92. Kul S (2014). Uygun İstatistiksel Test Seçim Kılavuzu. İstatistik Köşesi 28.
93. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* 69(2): 330-339.
94. Li Y, Kawamura Y, Fujiwara N, Naka T, Liu H, Huang X, Kobayashi K, Ezaki T (2004). *Rothia aeria* sp. nov., *Rhodococcus baikonurensis* sp. nov. and *Arthrobacter russicus* sp. nov., isolated from air in the Russian space laboratory Mir. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(3): 827-835.
95. Haraszthy VI, Zambon JJ, Sreenivasan PK, Zambon MM, Gerber D, Rego R, Parker C (2007). Identification of oral bacterial species associated with halitosis. *The J Am Dent Assoc* 138(8): 1113-1120.
96. Nebuka K, Tsuzukibashi O (2013). A Novel Selective Medium for the Isolation of *Rothia aeria* in Oral Cavities. *J Microbiol Methods* 12(2): 79-84.
97. Tsuzukibashi O, Uchibori S, Kobayashi T, Umezawa K, Mashimo C, Nambu T, Saito M, Hashizume-Takizawa T, Ochiai T (2017). Isolation and identification methods of *Rothia* species in oral cavities. *J Microbiol Methods* 134: 21-26.

10. EKLER

Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ!!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Bu çalışmada Quorum Sensing olarak bilinen bakteriler arası haberleşme sisteminin çeşitli kimyasal, doğal madde ve enzimler ile kesilerek ağız içinde bulunan ve daha önce laboratuvar şartlarında üretilemeyen bakterilerin üretilmesi amaçlanmaktadır.

KATILMA KOŞULLARI NEDİR?

Bu çalışmaya dahil edilebilmeniz için;

- 18-60 yaş aralığında olmanız gerekir.
- Sigara ve/veya alkol kullanmamış olmanız gerekir.
- Son 6 ay içerisinde herhangi bir nedenle sistemik bir antibiyotik kullanmamış olmanız gerekir.
- Kemoterapi ve/veya ışın tedavisi almamış olmanız gerekir.
- Gebelik durumunuzun olmaması gerekir.
- Diyabet, böbrek yetmezliği gibi metabolik bir hastalığınızın olmaması gerekir.

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

Bu araştırma kapsamında tükürük örneği, ağız içinizden sürüntü örneği ve dış plak örneği alınacaktır.

Tükürük toplanması için, ağız içinizde biriken tükürüğünüzü 1 dak boyunca yutmanınız ve temin edilen kaba tükürmeniz istenecektir. Bu işlem yeterli miktarda tükürük örneği toplanana kadar bir kaç defa tekrarlanabilir.

Ek 1. (Devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Sürüntü örneği için, ucunda pamuk bulunan çubuklar ağız içinizde yanak, dil, damak ve dişeti bölgelerinize sürülecektir.

Plak örneği ise belirli dişlerinizin üst kısmı hafif hava ile kurutularak, el aleti dişinizin üzerinden plak örneğini sıyrarak alacaktır. Toplam 6 dişinizden plak örneği alınacaktır.

SORUMLULUKLARIM NEDİR?

Araştırma ile ilgili olarak sorulacak sorulara doğru cevap vermek, ağız içinizden sürüntü, tükürük ve diş plak örneği alınması esnasında hekiminizin talimatlarına uymak sizin sorumluluklarınızdır.

Bu koşullara uymadığınız durumlarda araştırmacı sizi uygulama dışı bırakabilme yetkisine sahiptir.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 3 kadın, 3 erkek olmak üzere toplam 6 kişidir.

KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR?

Araştırma toplam 2 yıllık bir araştırmadır. Ancak sizin bu araştırmada yer almanız bir kereye mahsustur. Ayıracağınız zaman ise yaklaşık yarım saattir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Bu araştırmada vereceğiniz örnekler kaynak olarak kullanılarak ağız boşluğunda varlığı bilinen fakat *in vitro* ortamlarda üretilemeyen bakterilerin üretilmesine yönelik yeni bir yöntem geliştirilmeye çalışılacaktır. Eğer yöntem başarılı olursa varlığı bilinen ama üretilmemiş ve tanımlanmamış birçok bakterinin tanımlanmasına imkan doğacak ve bunların hastalık oluşturmadaki rollerinin araştırılması için yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacaktır.

Ek 1. (Devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Bu araştırmada ağız içinizden sürüntü örneği, diş plak örneği ve tükürük örneğiniz alınacaktır. Bu uygulamanın istenmeyen bir etkisi bulunmamaktadır.

GEBELİK

Bu uygulamanın doğmamış fetüs ya da anne sütü emen çocuk için riskleri bulunmamaktadır. Ancak araştırma sonuçlarını etkileyebileceğinden gebe ya da çocuk emziren kadınlar bu çalışmaya katılamazlar. En iyisi gebe olmadığınızdan ve çalışma boyunca gebe kalmamaya niyetli olduğunuzdan emin olmalısınız. Çocuk doğurma potansiyeliniz varsa çalışma doktoru sizinle uygun doğum kontrol yöntemlerini konuşacaktır. Çalışma sırasında gebe kaldığınızdan şüphelenirseniz, hemen çalışma doktoruna haber vermelisiniz. Gebe iseniz izniniz alınmadan araştırmadan çıkarılacaksınız.

HANGİ KOŞULLARDA ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILABİLİRİM?

Uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız, gebelik şüphesi varsa doktorunuz sizin izniniz olmadan sizi çalışmadan çıkarabilir.

HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK/SORUMLULUK KİMDEDİR VE NE YAPILACAKTIR?

Uygulamadan kaynaklanacak herhangi bir hasar söz konusu değildir.

YENİ BULGULAR

Araştırma sürecinde yapılan tedavi/uygulamaya yönelik sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir.

Ek 1. (Devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Yapılacak her tür tetkik ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR ?

Çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmektedir.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; reddetme veya vazgeçme durumunda bile sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır. Araştırmacı, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle isteğiniz dışında ancak bilginiz dahilinde sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu durumda da sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Ek 1. (Devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MİDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Bazen işlem sonrasında doktorların yaptıkları operasyona ek olarak gerektiğinde değişik medikal/cerrahi işlemleri gerçekleştirmek zorunluluğu olabileceğini anladım. Bu gibi bir durumda Karadeniz Teknik Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Cerrahisi doktorlarının yetkili kılınmasını istiyorum. Ağızımdan alınan örneklerin gereken şekilde saklanması, patolojik örnek olarak kullanılması, manipüle edilmesi için gerekeni yapmak üzere çalışmada geçen doktorları onların yetkilendirdiği araştırma asistanlarını, doktora öğrencilerini teşhis ve tedavimin tüm aşamalarına katılmaları yönünden yetkili kılıyorum.

Tıp ve Diş Hekimliği Bilimlerinde yapılan tedavilerin kesin başarılı olacağı söylenemez. Muhtemel başarı ile ilgili bilgilendirilmiş olmama rağmen uygulanacak işlemlerin garantisi yoktur ve bu konuda kesin yargılarla söz vermek mümkün değildir. Bu durumu anlamış bulunuyorum.

"Ağız Mikrobiyotasında Bulunan Canlı Fakat Kültür Edilemeyen Bakterilerin Üretilmesinde Quorum Sensing İnhibitörlerinin Kullanılması" araştırması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin

() "Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum"

() "İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum"

() "Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum"

Ek 1. (Devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 3 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu risklerin bilincinde ek olarak gerekli görülecek her türlü işlemin yapılmasına izin veriyorum.

Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

Ek 1. (Devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİ DIŞINDAN YETKİN BİR HEKİM		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		

RIZA ALMA İŞLEMİNE BAŞINDAN SONUNA KADAR GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

11. ETİK KURUL ONAYI

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 7	Tarih: 05/10/2015
	Prof.Dr.Ali Osman KILIÇ'ın sorumluluğunda yürütülen Arş.Gör.Enis Fuat TÜFEKÇİ'ye ait "Ağız Mikrobiyomunda Bulunan Canlı Fakat Kültür Edilemeyen Bakterilerin Üretilmesinde Quorum Sensing İnhibitörlerinin Kullanılması" başlıklı 2015/107 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLİ
Prof.Dr.S.Caner KARAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLİ
Doç.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLİ
Doç.Dr. Evrim ÖZKORUMAK Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

12. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : TÜFEKÇİ, Enis Fuat
Uyruğu : T.C
Doğum tarihi ve yeri : 03/11/1988- Kastamonu
Medeni hali : Bekar
E-posta : eft88@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurum Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi	2012
Lise	Orhan Şaik Gökyay Lisesi/Kastamonu	2006

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİM

Görevi	Kurum	Süre
1. Araştırma Görevlisi	Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi	2012-2013
2. Araştırma Görevlisi	KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2013-2017

YABANCI DİL

İngilizce

BİLDİRİLER:

1. **Tüfekci E.F.**, Sağlam Ertunga N., Aydın E., Özen C., Biber A. , Altay B., et al., "Mağaralardan İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerde Beta Laktamaz Gen Varlığının PZR Yöntemi İle Araştırılması ", 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 16-20 Kasım 2016, ss.268-268
2. **Tüfekci E.F.**, Sağlam Ertunga N., Aydın E., Biber A. , Altay B., Tekkiliç İ., et al., "Antibacterial Screening of Bacteria Isolated From Three Caves In Turkey ", 3rd Congress of Baltic Microbiologists 2016, Vilnius, Litvanya, 18-21 Ekim 2016, pp.107-107.
3. Khorshidtalab M., Durukan İ., Nas S.S., **Tüfekci E.F.**, Abdurrahman M., Kiliç A.O., "Isolation and Characterization of A Lytic Bacteriophage From Wastewater Infecting Enterobacter spp. ", 3rd Congress of Baltic Microbiologists 2016, Vilnius, Litvanya, 18-21 Ekim 2016, pp.77-77.
4. Reis A., **Tüfekci E.F.**, Özgümüş O.B., Kiliç A.O., "Kan Kültürlerinden İzole Edilen Escherichia coli Suşlarında Antibiyotik Direnç Gen Kasetlerinin Moleküler Karakterizasyonu", 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 16-20 Kasım 2016, ss.277-277.
5. Khorshidtalab M., Nas S.S., Durukan İ., **Tüfekci E.F.**, Abdurrahman M., Kiliç A.O., "Atık Sulardan Litik Bakteriyofaj İzolasyonu ve Morfolojik Karakterizasyonu", 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 16-20 Kasım 2016, ss.183-183.
6. Kongur E., Kaklıkkaya N., Özkaya E., **Tüfekci E.F.**, Kasap B., Buruk C.K., et al., "Laboratuvarımızda Çalışılan Anti-dsDNA Antikorları Test Sonuçlarının Karşılaştırılması", 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 16-20 Kasım 2016, ss.373-373.
7. Tabbouche S., Palabıyık T., **Tüfekci E.F.**, Khorshidtalab M., Kiliç A.O., "Trabzon ili çevresindeki tatlı ve tuzlu sulardan izole edilecek mikroalglerin antimikrobiyal madde üretimi yönünden araştırılması", Ekoloji 2015 Sempozyumu, Sinop, Türkiye, 6-9 Mayıs 2015, ss.445-445.

8. Hamidi S., **Tufekci E.F.**, Demirbas N., Unver Y., Sokmen M., Sokmen A., et al., "Anti-quorum sensing activities of some synthetic chemicals and natural products", 6th Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection, Selanik, Yunanistan, 13-15 Kasım 2015, pp.37-37.
9. Hamidi S., **Tufekci E.F.**, Demirbas N., Unver Y., Kilic A.O., "Antimicrobial activities of some synthetic derivatives of pharmaceuticals", 6th Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection, Selanik, Yunanistan, 13-15 Kasım 2015, pp.37-37.
10. Durukan I., Khorshidtalab M., Karahan D., **Tufekci E.F.**, Bayramoglu G., Kilic A.O., "Identification of a lytic bacteriophage from waste water infecting clinical isolates of *Klebsiella* spp.", 6th Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection, Selanik, Yunanistan, 13-15 Kasım 2015, pp.39-39.
11. Khorshidtalab M., Tabbouche S., **Tufekci E.F.**, Çamurşen A., Palabiyik T. , Kiliç A.O., "Trabzon ili ve çevresi tatlı su kaynaklarından izole edilen mikroalg ekstraktlarının antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması", 36. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 12-16 Kasım 2014, ss.243-243.
12. Buruk C.K., Tosun İ., **Tufekci E.F.**, Kaklikkaya N., Bayramoğlu G., Reis A., et al., "Pneumocystis jirovecii tanısında yeni bir in-house gerçek zamanlı PCR uygulaması", 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, Türkiye 4-7 Haziran 2014, ss.125-126.
13. Tabbouche S., **Tufekci E.F.**, Samanje J., Abdurrahman M., Reis A., Kiliç A.O., "Callosobruchus maculatus (fasülye böceği) bağırsak florasından izole edilen bakterilerin morfolojik ve genetik karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanması", 36. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 12-16 Kasım 2014, ss.243-244.
14. **Tufekci E.F.**, Bayramoğlu G., Kaklikkaya N., Aydın F., "Kan kültürlerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması", 36. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 12-16 Kasım 2014, ss.194-194.

15. Cora M., **Tüfekci E.F.**, Gençoğlu Özgür Ç., Öztel Ocak H., Bayramoğlu G., Kaklıkkaya N., "Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na Gönderilen Örneklerde Toxoplasma gondii, rubella ve sitomegalovirüs antikor pozitifliği", 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 10-13 Kasım 2013, ss.394-394.
16. **Tüfekci E.F.**, Buruk C.K., Kongur E., Tosun İ., Bayramoğlu G., Kaklıkkaya N., et al., "Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi'nde 2009-2013 Yılları Arasında Saptanan Bağırsak Parazitlerinin Oranı", 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 10-13 Kasım 2013, ss.349-349.

PROJELER:

1. Doğu Karadeniz Bölgesindeki Bazı Mağaralardan Bakteri ve Mikroalg İzolasyonu ve Bu Mikroorganizmaların Antimikrobiyal Madde Üretimi Yönünden Araştırılması, BAP Araştırma Projesi, FBA-2016-5481, Araştırmacı, Devam Ediyor.
2. Ağız Mikrobiyotasında Bulunan Canlı Fakat Kültür Edilemeyen Bakterilerin Üretilmesinde Quorum Sensing İnhibitörlerinin Kullanılması, BAP Doktora, TDK-2015-5332, Araştırmacı, Devam Ediyor.
3. Canlı Fakat Kültür Edilemeyen Bakterilerin Üretilmelerinde Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama) İnhibitörlerinin Kullanılması, BAP Araştırma Projesi, 11542, Araştırmacı, 2016.

