



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLERİN HÜCRESİZ SIVILARININ
Pseudomonas ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Çise KEBABCI

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Zuhale ZEYBEK**

Haziran, 2020

İSTANBUL

Bu çalışma, 29.06.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Unvan Adı SOYADI(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fakülte

Unvan Adı SOYADI
Üniversite
Fakülte

Unvan Adı SOYADI
Üniversite
Fakülte



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 118Z923 numaralı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu 1002 Hızlı Destek projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim süresince, hem bu tez çalışmasının kararlaştırılması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması aşamalarında destek sağlayan, hem de insan ilişkileri ve akademik alandaki bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tüm bu süreçte özverisini ve sabrını eksik etmeyen hocam Sayın Doç. Dr. Zuhale ZEYBEK'e,

Tez çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'a, Sayın Prof. Dr. Ayşe Seher BİRTEKSÖZ TAN'a, Sayın Arş. Gör. Dr. Maryam HACIOĞLU'na ve Sayın Arş. Gör. Dr. Miray ONAN'a,

Yüksek lisans eğitimim sırasında tanıştığım ve bilgi alışverişinde bulunduğum sevgili çalışma arkadaşım Şevval Maral ÖZCAN'a,

Eğitim hayatım süresince maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen, her türlü özveriyi gösteren çok sevgili annem Betül KEBABCI ve babam Necmettin KEBABCI başta olmak üzere tüm aileme,

Bu süreçte manevi desteğini eksik etmeyen değerli dostum Arda Alara ULUDAĞ ve Serkan ÇELİK'e

en içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2020

Çise KEBABCI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLER VE SEBEP OLDUKLARI HASTALIKLAR	4
2.2. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLERİN BAKTERİLER İLE OLAN İLİŞKİLERİ	7
2.3. ANTİMİKROBİYAL ETKİLİ MADDELERE SAHİP OLAN CANLILAR VE ÖYA	11
2.4. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	12
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	14
3.1. ÖYA SUŞLARININ CANLANDIRILMASI	15
3.2. ÖYA SUŞLARININ AKSENİK KÜLTÜRLERİNİN ELDESİ.....	16
3.3. AKSENİK ÖYA KÜLTÜRLERİNDEKİ AMİP HÜCRE SAYILARININ TESPİTİ VE HÜCRESİZ SIVILARININ (ACM) ELDESİ.....	19
3.4. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> SUŞLARININ CANLANDIRILMASI	21
3.5. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE DENEYLERİ	22
3.6. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER.....	28
3.6.1. Non-Nutrient Agar (Biolife, İtalya).....	28
3.6.2. Nutrient Agar (Oxoid, United Kingdom)	28
3.6.3. Pepton Maya Ekstraktı Glukoz (PYG) Besiyeri.....	29
3.6.4. Penisilin Çözeltisi (Sigma Aldrich, ABD)	29
3.6.5. Streptomisin Çözeltisi (Sigma Aldrich, ABD).....	30
3.6.6. Antibiyotikli Pepton Maya Ekstraktı Glikoz (PYG) Besiyeri	30

3.6.7. Fosfat Tampon Salin (PBS) (Sigma Aldrich, ABD)	30
3.6.8. Page's Amoebal Saline (PAS) (Sigma Aldrich, ABD)	31
3.6.9. Isı İle İnaktive Edilmiş <i>E. coli</i> Süspansiyonu.....	31
3.6.10. Gliserinli Triptik Soy Broth (GTSB).....	32
3.6.11. Freezing Medium (FM)	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. AKSENİK ÖYA KÜLTÜRLERİNDEKİ AMİP HÜCRE SAYILARI.....	33
4.2 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> SUŞLARININ API TEST SONUÇLARI.....	34
4.3 ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE DENEYLERİ	34
4.3.1 <i>A. castellanii</i> ATCC 50373 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM), <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi	38
4.3.2 A10 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM), <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	39
4.3.3 A13 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM), <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	40
4.3.4 A14 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	41
4.3.5 U.GÖL suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1: İnvert mikroskop.....	15
Şekil 3.2: Petri kutusundaki NNA’da üremiş ÖYA suşlarının işaretlenme sonrası kesilmek suretiyle (üstte), taze NNA’ya yapılan pasajları (altta).....	16
Şekil 3.3: Petri kutusunda yoğun üremiş olan ÖYA kültüründen (solda), aksenik kültürlerin hazırlanması için kullanılan antibiyotikli PYG içeren T-25 doku kültürü flaskı (sağda).	17
Şekil 3.4: Eski ve taze antibiyotikli PYG içeren flasklardaki ÖYA kültürleri	17
Şekil 3.5: “Tek tabakalı üreme” gösteren ÖYA suşu. İnvert mikroskop (x100)	18
Şekil 3.6: Aksenik kültürlerde PYG besiyerinde inkübasyon süresince ÖYA hücreleri sayısındaki artış (x100).....	19
Şekil 3.7: A)Thoma lamı B) Thoma lamındaki canlı amip trofozoitlerinin mikroskopik görünümü (tripan mavisi, x100).....	20
Şekil 3.8: ACM eldesi sırasında kullanılan santrifüj ve 0.22 µm por çaplı enjektör ucu steril filtre	21
Şekil 3.9: -86 °C’den çıkartılmış kryotüplerdeki <i>P. aeruginosa</i> suşları	21
Şekil 3.10: Nutrient agara ekilmiş <i>P. aeruginosa</i> suşları.....	22
Şekil 3.11: API® 20 NE stribi (bioMérieux)	22
Şekil 3.12: A) 24 saatlik <i>P. aeruginosa</i> kültürünün PBS içerisinde süspansiyonu B) Kullanılan spektrofotometre kuvvetleri.....	23
Şekil 3.13: 10 ⁶ kob/mL bakteri süspansiyonu hazırlanması	23
Şekil 3.14: ÖYA suşlarına ait ACM’nin antibakteriyel aktivite deneyinin şematik görünümü.....	24
Şekil 3.15: Yıkama öncesi sıvısının (YÖ) antibakteriyel aktivite deneyinin şematik görünümü.....	25
Şekil 3.16: Yıkama sonrası sıvısının (YS) antibakteriyel aktivite deneyinin şematik görünümü.....	25
Şekil 3.17: Bakteri-PBS karışımının seri sulandırılmaları ve her bir sulandırım tüpünden NA’ya yapılmış ekimler	26

Şekil 3.18: Antibakteriyel aktivite deneylerinin genel görüntüsü.....	27
Şekil 4.1: <i>P. aeruginosa</i> suşlarının API test sonuçları.....	34
Şekil 4.2: <i>A. castellanii</i> ATCC 50373 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi	38
Şekil 4.3: A10 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	39
Şekil 4.4: A13 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	40
Şekil 4.5: A14 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	41
Şekil 4.6: U.GÖL suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	42
Şekil 4.7: PA3 suşunun, her bir ÖYA suşuna ait (A10, A13, A14, <i>A. castellanii</i> ATCC 50373, U.GÖL) ACM, YÖ, YS ve PYG ile birlikte 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra deney tüplerindeki görünüşleri.....	46
Şekil 4.8: PA3 suşunun, her bir ÖYA suşuna ait (A10, A13, A14, <i>A. castellanii</i> ATCC 50373, U.GÖL) ACM, YÖ, YS ve PYG ile birlikte 37 °C’de 24 saat inkübasyonunu takiben yapılan ekimlerin inkübasyon sonrasında Petri kutusundaki görünüşleri.....	47
Şekil 4.9: PA5 suşunun, her bir ÖYA suşuna ait (A10, A13, A14, <i>A. castellanii</i> ATCC 50373, U.GÖL) ACM, YÖ, YS ve PYG ile birlikte 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra deney tüplerindeki görünüşleri.....	48
Şekil 4.10: PA5 suşunun, her bir ÖYA suşuna ait (A10, A13, A14, <i>A. castellanii</i> ATCC 50373, U.GÖL) ACM, YÖ, YS ve PYG ile birlikte 37 °C’de 24 saat inkübasyonunu takiben yapılan ekimlerin inkübasyon sonrasında Petri kutusundaki görünüşleri.....	49

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Deneylerde kullanılan mikroorganizmalar.....	14
Tablo 4.1: Aksenik ÖYA kültürlerindeki hücre sayıları	33
Tablo 4.2: ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarının (ACM) <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkileri.....	35
Tablo 4.3: <i>A. castellanii</i> ATCC 50373 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM), denenen <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre)	38
Tablo 4.4: A10 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM), denenen <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre).....	39
Tablo 4.5: A13 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM), denenen <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre).....	40
Tablo 4.6: A14 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM), denenen <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre).....	41
Tablo 4.7: U.GÖL suşuna ait hücresiz sıvının (ACM), denenen <i>P. aeruginosa</i> suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre).....	42
Tablo 4.8: Bakteri inhibisyonunun en yüksekten en düşüğe göre sıralaması.....	43
Tablo 4.9: ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarının <i>P. aeruginosa</i> suşlarına karşı ortalama inhibe edici etkileri	45
Tablo 4.10: <i>P. aeruginosa</i> suşlarının ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarına karşı ortalama duyarlılıkları	45

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
cm ²	: Santimetre kare
°C	: Santigrad Derece
dk	: Dakika
g	: Gram
M	: Molar
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
pH	: Hidrojen Gücü
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
UV	: Ultraviyole
µm	: Mikrometre
µL	: Mikrolitre
%	: Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACM	: Özgür Yaşayan Amiplerin Hücresiz Sıvıları
AI	: Antibiyotik İnhibisyonu
AMP	: Antimikrobiyal Peptidler
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
API	: Analytical Profile Index
BI	: Bakteri İnhibisyonu
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ETA	: Endotrakeal Aspirat
FBS	: Fetal Sığır Serumı

FM	: Freezing Medium
GAE	: Granülomatöz Amibik Ensefalit
GTSB	: Gliserinli Triptik Soy Broth
İ.Ü.	: İstanbul Üniversitesi
kob	: Koloni oluşturan birim
MRSA	: Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Metisilin Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
NA	: Nutrient Agar
NNA	: Non-Nutrient Agar
OD	: Optik Densite
Ort.	: Ortalama
ÖYA	: Özgür Yaşayan Amipler
Pa	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAM	: Primer Amibik Meningosefalit
PAS	: Page's Amoebal Salin
PBS	: Fosfat Tampon Salin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PYG	: Pepton Yeast ekstrakt Glukoz Besiyeri
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
Tİ	: Toplam İnhibisyon
YÖ	: Yıkama Öncesi Sıvısı
YS	: Yıkama Sonrası Sıvısı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLERİN HÜCRESİZ SIVILARININ *Pseudomonas* ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Çise KEBABCI

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Zuhale ZEYBEK

Özgür yaşayan amipler (ÖYA) doğada ve insan yapımı su sistemlerinde sıklıkla rastlanan ve konağın bağışıklık sistemine bağlı olarak ölümcül de olabilen hastalıklara sebep olan mikroorganizmalardır. Ayrıca aynı ortamda yaşadıkları çeşitli bakteriler için konak olma özelliği de gösterirler. Bunun sonucu olarak bakterilerin çoğalmasına katkı sağlayabilir yada kendileri lizise uğrayabilir. Ancak ÖYA'nın bu ortamlarda hayatta kalmasını sağlayabilecek olan antimikrobiyal maddeler üretmesi konusundaki bilgiler oldukça kısıtlıdır. Bu bağlamda, bu çalışmada ÖYA suşlarına ait hücresiz sıvıların (ACM), *Pseudomonas aeruginosa* karşısında antibakteriyel etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373 suşuna ek olarak, ülkemize ait üç yüzme havuzundan ve bir göl suyundan izole edilmiş olan toplam dört çevresel ÖYA suşu (A10, A13, A14, U.GÖL) kullanılmıştır. *P. aeruginosa* suşları, ülkemizdeki hastalara ait klinik suşlardan (PA2, PA3, PA4, PA5) seçilmiş, standart suş olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. Tüm ÖYA suşları, ısı ile inaktive edilmiş *Escherichia coli* ATCC 25922

süspansiyonu yayılmış olan non-nutrient agar (NNA) içeren Petri kutularında üretilmiştir. Aksenik kültürlerinin eldesi için pepton yeast ekstrakt glukoz (PYG) besiyeri kullanılmıştır. Kültürlerdeki canlı ÖYA trofozoitlerinin sayısı (hücre/mL) Thoma lamı ve tripan mavisi kullanılarak tespit edilmiştir. Her bir ÖYA suşuna ait hücresiz sıvıların (ACM) elde edilmesi, aksenik kültür sıvısının 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmesinden sonra 0.22 µm por çaplı steril filtreden geçirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Her bir *P. aeruginosa* suşunun süspansiyonları (10^8 kob/mL) spektrofotometre (OD=595) kullanılarak ölçülmüştür. ÖYA suşlarına ait ACM’lerin, *P. aeruginosa* suşları karşısındaki antibakteriyel aktivite deneyleri nutrient agarda, koloni sayım yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Denenen ÖYA suşlarına ait ACM’lerin, denenen *P. aeruginosa* suşları karşısında değişen oranlarda (%3.9 - 91.5) antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır. En yüksek ortalama inhibe edici etkiyi A13 suşunun (%64.6), en düşük ortalama inhibe edici etkiyi A14 suşunun (%34.4) gösterdiği bulunmuştur. Ülkemize ait dört çevresel ÖYA izolatından üçünün (A13, U.GÖL, A10) ortalama olarak *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373’e göre daha yüksek inhibe edici etki gösterdiği tespit edilmiştir. ACM’lere en duyarlı *P. aeruginosa* suşunun PA5 suşu olduğu (ort: %82.64), bunu sırasıyla PA4, PA2, PA ATCC 27853 ve PA3 suşlarının izlediği saptanmıştır.

Bu çalışma, ülkemize ait ÖYA suşlarına ait ACM’lerin, *Pseudomonas aeruginosa*’ya etkili antimikrobiyal maddelere sahip olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Bununla beraber örnek sayısının artırılmasıyla yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, bu suşlara ait ACM’lerin, *P. aeruginosa* dışındaki mikroorganizmalar (diğer patojen bakteriler, virüsler vb.) karşısındaki antimikrobiyal aktivitelerini keşfetmek, ilerideki çalışmalarla mümkün olabilecektir.

Haziran 2020, 80 sayfa.

Anahtar kelimeler: Antibakteriyel aktivite, özgür yaşayan amipler, hücresiz sıvı, *Pseudomonas aeruginosa*, koloni sayım yöntemi

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION of the EFFECTS of FREE-LIVING AMOEBA

CELL-FREE SUPERNATANTS on *Pseudomonas*

Çise KEBABCI

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Zuhale ZEYBEK

Free-living amoebas (FLA) are microorganisms that are common in nature and man-made water systems, causing diseases that can also be fatal depending on the host's immune system. They also act as hosts for the various bacteria living in the same environment. As a result, they can contribute to the growth of bacteria or they may be lysed. However, the knowledge about the production of antimicrobial agents that can ensure survival of FLA in these environments is quite limited. In this context, it was aimed to investigate whether cell-free supernatants (ACM) belonging to FLA strains have an antibacterial effect against *Pseudomonas aeruginosa* in this study.

Totally four environmental FLA strains (A10, A13, A14, U.GÖL) isolated from our country's swimming pools and a lake water, in addition to the *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373 strain were used In this study. *Pseudomonas aeruginosa* strains were selected from the clinical strains (PA2, PA3, PA4, PA5) belonging to patients in our country, and *P. aeruginosa* ATCC

27853 was used as the standard strain. All FLA strains were grown in non-nutrient agar (NNA) seeded with heat-inactivated *Escherichia coli* ATCC 25922 suspension. Peptone yeast extract glucose (PYG) medium was used to obtain axenic cultures. The number of viable FLA trophozoites (cell /mL) in cultures was determined using Thoma slide and trypan blue. Obtaining the cell-free supernatants (ACM) of each FLA strain was accomplished by centrifuging of the axenic culture liquid at 3000 rpm for 5 minutes, then passing through a 0.22 µm pore diameter sterile filter. Suspensions (10^8 cfu/mL) of each *P. aeruginosa* strain were measured using a spectrophotometer (OD = 595). Antibacterial activity experiments of ACMs belonging to FLA strains against *P. aeruginosa* strains were performed on nutrient agar using colony count method.

It has been determined that ACMs of FLA strains tested showed antibacterial effect at varying rates (3.9 - 91.5 %) against *P. aeruginosa* strains tested. It was found that strain A13 (64.6 %) has the highest mean inhibitory effect and strain A14 (34.4 %) had the lowest mean inhibitory effect. It has been determined that three of the four environmental FLA isolates (A13, U.GÖL, A10) belonging to our country have higher inhibitory effect than *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373 on average. It was determined that the most sensitive *P. aeruginosa* strain to ACMs was PA5 strain (mean: 82.64 %), followed by PA4, PA2, PA ATCC 27853 and PA3 strains, respectively.

This is the first study to show that ACMs of FLA strains belonging to our country have antimicrobial agents against *P. aeruginosa*. However, new studies are needed to increase the number of samples. In addition, it will be possible with future studies to discover the antimicrobial activities of ACMs of these strains against microorganisms (other pathogenic bacteria, viruses, etc.) other than *P. aeruginosa*.

June 2020, 80 pages.

Keywords: Antibacterial activity, free-living amoeba, cell-free supernatants, *Pseudomonas aeruginosa*, colony counting method

1. GİRİŞ

Özgür yaşayan amipler (ÖYA) doğada toprak, hava, deniz, göl, akarsu ve nehirlerde, insan yapımı su sistemlerinde ise yüzme havuzları, göz yıkama üniteleri, diyaliz birimleri, dental üniteler, içme suları, kontakt lens/lens kaplarında bulunan mikroorganizmalardır (Molmeret ve diğ., 2005; Schuster, 2002; Shoff ve diğ., 2008; Saygı ve Polat, 2003; Thomas ve diğ., 2006; Trabelsi ve diğ., 2010; Trabelsi ve diğ., 2012; Üstüntürk ve Zeybek, 2014; Zeybek ve Türkmen, 2020). Yaşam döngülerinde trofozoit ve kist olmak üzere iki farklı şekilde bulunurlar (Khan, 2006; Greub ve Raoult, 2004; Thomas ve diğ., 2008; Trabelsi ve diğ., 2012). Besin miktarı, sıcaklık, nem gibi çevre faktörlerinin elverişli olduğu yerlerde metabolik olarak aktif şekil olan trofozoit halinde bulunurlar. Çevresel faktörler kötüleştiğinde ve besin kıtlığı oluştuğunda trofozoit şekli bu koşullarda uzun süre kalamaz ve metabolik olarak inaktif ve hareketsiz olan kist şekline dönüşür. Kist şekli hücrenin açlık, kuruluk, çeşitli kimyasallar, UV ışınları, antibiyotikler gibi çeşitli çevresel faktörlerden korunmasını sağlar ve tüm bu nedenlerden dolayı kistlerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşılır (Siddiqui ve Khan, 2012; Thomas ve diğ., 2008). Bugüne kadar tespit edilen ve insan sağlığı açısından önemli olan ÖYA, *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* ve *Sappinia spp.*'dir. Fırsatçı patojen olarak bilinen bu mikroorganizmalar özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda az sayıda olsalar bile amibik keratit, granülomatöz amibik ensefalit (GAE), primer amibik meningoensefalit (PAM), kutanöz yaralar gibi ciddi hastalıklar oluşturabilirler (Schuster, 2002; Trabelsi ve diğ., 2012). Bu mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıkların görülme sıklığı az olmasına rağmen teşhisleri çok zordur ve özellikle ensefalit ile ilgili olanlarda yüksek ölüm oranı bulunmaktadır (Barete ve diğ., 2007, Visvesvara ve diğ., 2007; Yünlü ve diğ., 2015).

ÖYA insanlarda hastalıklara sebep olmalarının dışında, yaşadıkları çeşitli ortamlarda bulunan bakterilere konak vazifesi görmeleri, onların çoğalmalarına katkı sağlamaları nedeniyle de bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. *Legionella pneumophila*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Bacillus cereus*, *Francisella tularensis*, *Mycobacterium avium*, *Escherichia coli* 0157 H:7, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Vibrio cholera*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi çeşitli patojen bakterilerin, ÖYA konaklarının içerisinde

çoğalma, patojenitelerini arttırma, ve amip hücrelerini parçalayarak dış ortama yayılma gibi özellikleri pek çok çalışmada gösterilmiştir (Akya ve diğ., 2009; Brown ve Barker, 1999; Cervero-Aragó ve diğ., 2015; Chekabab ve diğ., 2012; Delafont ve diğ., 2016; Greub ve Raoult, 2004; Horn ve Wagner, 2004; Khan ve Siddiqui, 2014; Lamothe ve diğ., 2004; Molmeret ve diğ., 2005; Steinert ve diğ., 1998; Schuster, 2002; Siddiqui ve diğ., 2017; Strassman ve Shu, 2017; Thomas ve diğ., 2008; Trabelsi ve diğ., 2012; Winiecka-Krusnell ve Linder, 2001; Winiecka-Krusnell ve diğ., 2002).

ÖYA'ların konak olarak, bakterileri korumalarının aksine, sahip oldukları antimikrobiyal maddeler sayesinde onların üremesini inhibe etme özellikleri ile ilgili olarak literatürde çok az bilgi bulunmaktadır (Iqbal ve diğ., 2014; Tashmukhambetov, 2016). Bilindiği gibi doğada bir arada yaşayan farklı mikroorganizma türleri çeşitli stres koşullarında yaşamlarını sürdürebilmek, kendilerini tehdit eden diğer mikroorganizmaları öldürmek veya üremesini inhibe etmek için çeşitli antimikrobiyal maddeler üretirler. Bu bağlamda mikroorganizmalar arasındaki ekolojik ilişkiler, yeni antimikrobiyal maddelerin tanımlanmasında büyük önem taşımaları sebebiyle yıllardır araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (Akbar ve diğ., 2020; Artun ve diğ., 2016; Bavin ve diğ., 1952; Bastos ve diğ., 2010; Döşler, 2017; Fleming, 1929; Lee ve diğ., 2012; Lopez ve diğ., 2007; Mah ve diğ., 2001; Mostafa ve diğ., 2018; Prashanth ve diğ., 2001; Rossi ve diğ., 2008; Schatz ve diğ., 1944; Sanchez ve diğ., 1988; Şimşek ve diğ., 2002). ÖYA'nın antibakteriyel maddeler üretip üretmediği ile ilgili yurt dışında son 5-6 yıl içerisinde, çok az sayıda suşun kullanıldığı 1-2 çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde *Acanthamoeba*'nın hücresiz sıvısının metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) karşısında %99' dan fazla, vankomisin dirençli *Enterococcus* karşısında %8 inhibe edici etki gösterdiği halde *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* karşısında herhangi bir inhibe edici etki göstermediği tespit edilmiştir (Iqbal ve diğ., 2014). Diğer bir çalışmada ise *Acanthamoeba*'nın hücresiz sıvısının *S. pneumoniae*, metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Haemophilus influenza* karşısında sırasıyla %100; %10.6; %3.4; %6.1; %11.1 ve %2.5 oranında inhibe edici etki gösterdiği bildirilmiştir (Tashmukhambetov, 2016). Ülkemizde ÖYA'nın bakteriler üzerine inhibe edici özellik gösterip göstermediği ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de antibiyotiklere dirençli enfeksiyon etkeni bakterilerin, bu enfeksiyonların tedavisinde önemli bir sorun olması yeni antibakteriyel madde/maddelerin

arayırlarına sebep olmaktadır. Bu bakterilerden birisi olan *P. aeruginosa*, Gram negatif, omak Şekilli, hareketli, sporsuz, kapsülsüz, nonfermentatif, aerob, evre koşullarına kolaylıkla uyum sağlayabilen bir bakteridir (Bergey ve diğ., 1939; Tuncer ve Akova, 1996; Yücel ve diğ., 2006). *P. aeruginosa* 'nın dünya genelinde hastane infeksiyonlarının %10-15'inden sorumlu olmasına ek olarak üriner sistem, gastrointestinal sistem, solunum sistemi, sinir sistemi, akciğer, cilt, göz, kulak infeksiyonları, pnömoni ve keratit gibi çok çeşitli hastalıklarda da etken bir mikroorganizma olduğu bilinmektedir (Cross ve diğ., 1983; Kandi, 2010; Orucu ve Geyik, 2008; Tuncer ve Akova, 1996; Tunçoğlu ve diğ., 2009; Yücel ve diğ., 2006).

Bu bağlamda, bu tez çalışmasında ülkemizden izole edilmiş olan farklı YA suşlarının hücresiz sıvılarının yine ülkemizden izole edilen klinik *P.aeruginosa* suşlarına karşı antibakteriyel etki gösterip göstermediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLER VE SEBEP OLDUKLARI HASTALIKLAR

1959 yılına kadar zararsız canlılar olarak bilinen özgür yaşayan amipler (ÖYA) doğada toprak, hava, deniz, göl, akarsu ve nehirlerde, insan yapımı su sistemlerinde ise yüzme havuzları, göz yıkama üniteleri, diyaliz birimleri, dental üniteler, içme suları, kontakt lens/lens kaplarında bulunmaktadır (Molmeret ve diğ., 2005; Schuster, 2002; Shoff ve diğ., 2008; Saygı ve Polat, 2003; Thomas ve diğ., 2006; Trabelsi ve diğ., 2010; Trabelsi ve diğ., 2012; Üstüntürk ve Zeybek, 2014; Veríssimo ve diğ., 2013; Zeybek ve Türkmen, 2020). Bu mikroorganizmalar son yıllarda hem insanlarda ölümcül hastalıklara yol açmaları, hem de pek çok bakteriye konaklık etmeleri sebebiyle oldukça dikkat çekmektedir.

ÖYA yaşam döngülerinde trofozoit ve kist olmak üzere iki farklı şekilde bulunur (Khan, 2006; Greub ve Raoult, 2004; Thomas ve diğ., 2008; Trabelsi ve diğ., 2012). Besin miktarı, sıcaklık, nem gibi çevre faktörlerinin elverişli olduğu yerlerde metabolik olarak aktif şekil olan trofozoit halindedirler. Trofozoitler, sabit bir şekle sahip olmayıp, yalancı ayaklarla hareket eder ve bakteri, alg, maya ve küçük organik partiküllerle beslenir, ikiye bölünerek ürerler. Çevresel faktörler kötüleştiğinde ve besin kıtlığı oluştuğunda uzun süre bu şekilde kalamaz ve metabolik olarak inaktif ve hareketsiz olan kist şekline dönüşür. Kist şekli hücrenin açlık, kuruluk, çeşitli kimyasallar, UV ışınları, antibiyotikler gibi çeşitli çevresel faktörlerden korunmasını sağlar. Kistlerin hücre dışında 20 yıl veya daha fazla sürede yaşayabildiği bilinmektedir ve tüm bu nedenlerden dolayı kistlerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşılır. (Siddiqui ve Khan, 2012; Thomas ve diğ., 2008).

Bugüne kadar tespit edilen ve insan sağlığı açısından önemli olan ÖYA, *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* ve *Sappinia spp.*'dir. Fırsatçı patojen olarak bilinen bu mikroorganizmalar özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda az sayıda olsalar bile ciddi enfeksiyonlar oluşturabilirler (Schuster, 2002; Trabelsi ve diğ., 2012). Bu mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların görülme sıklığı az olmasına rağmen teşhisleri çok zor olmakta ve özellikle ensefalit ile ilgili olanlarda yüksek ölüm oranı bulunmaktadır (Barete ve diğ., 2007, Visvesvara ve diğ., 2007)

Acanthamoeba cinsinin trofozoit şekli, tek nükleus ve yüzeyden çıkan akantapodlar ile karakterize edilir. Akantapod parazitin yüzeylere tutunmasını, hücresel hareketini ve avını yakalamasını sağlar. Kist şekli ise çift duvarlı yapıdadır (Trabelsi ve diğ., 2012). Bu cins özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda, granümatöz amibik ensefalit (GAE), amibik keratit, kütanöz yaralar, nazofarenjiyal, pulmoner ve renal enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Horn ve Wagner, 2004; Schuster, 2002; Siddiqui ve Khan, 2012; Trabelsi ve diğ., 2012; Ugonabo ve Gugnani, 1989; Visvesvara ve diğ., 2007). *A. castellanii*, *A. keratitis*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. astroonyxix*, *A. divionensis* ve *A. polyphaga*, insanlarda enfeksiyonlara sebep olan önemli *Acanthamoeba* türleridir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Trabelsi ve diğ., 2012). Kutanöz acanthamoebiasis *Acanthamoeba* hücrelerini içeren nodül oluşumları ve deri lezyonları ile karakteristiktir. Lezyonlardan en çok etkilenen bölgeler yüz, kollar ve bacaklardır. Patojen vücuda girer ve kan yoluyla çeşitli dokulara yayılır. Haftalar sonra merkezi sinir sistemine ulaşması ölüme sebebiyet verir. Nekrotik ülserasyon bölgelerindeki trofozoit ve kistlerin biyopsi ile tespit edilmesi sayesinde teşhis sağlanır (Trabelsi ve diğ., 2012). GAE ise immün sistemi baskılanmış kişilerde ölümcül olan bir hastalıktır (Trabelsi ve diğ., 2012). Amiplerin vücuda giriş yolu çeşitlilik gösterir. Bu giriş burun içinden, direkt merkezi sinir sistemine geçerek, derideki bir açıklıktan giriş yaparak ya da solunum sisteminden girip kan yoluyla merkezi sinir sistemine taşınması ve yayılması ile gerçekleşebilir (Schuster, 2002). Merkezi sinir sistemi dışında etkilenen diğer organlar deri, karaciğer, akciğer, böbrekler, pankreas, lenf bezleridir. Kutanöz ve solunum enfeksiyonları birkaç ayda oluşabilir fakat merkezi sinir sisteminde gelişimi birkaç gün veya hafta sonra ölümle sonuçlanmaktadır. Patojenik mekanizması hala tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Çoğunlukla bazal gangliyada, orta beyinde, beyin kökünde gözlenen lezyonlar kronik granüler ensefalit ile sonuçlanmaktadır (Trabelsi ve diğ., 2012). Teşhis çoğunlukla beyin dokusunun ölümden sonraki incelemesi ile yapılır (Schuster, 2002). *A. keratitis* türünün sebep olduğu amibik keratit ilk kez, kornea yüzeyi zedelenmesi nedeniyle amipler ile enfekte olmuş ve kornea travmasına maruz kalmış kişilerde görülmüştür (Schuster, 2002). Genellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda gelişen bu korneal mikrobiyal enfeksiyonun temel risk faktörleri, kişilerin uzun süreli ya da steril olmayan kontakt lens kullanması, kontakt lenslerde oluşabilen biyofilmde bulunması ve kontakt lens kullananların kontamine sularda yüzmesidir. *Acanthamoeba*'nın korneaya geçişi onun virülansına ve korneanın fizyolojik durumuna bağlıdır. Gelişmekte olan ülkelerde kontakt lens kullananların sayısının artışıyla amibik keratit

vakası sayısının arttığı görülmüştür. Son yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde milyonda 1.36, İngiltere'de milyonda 17-21, Fransa'da ise 30.000'de bir vaka kaydedilmiştir ve bu oranlar her geçen gün yükselmektedir. *Acanthamoeba*'nın kornea epitel hücrelerine bağlanması için trofozoit formda olması gerekmektedir. Trofozoit form, hücrelere bağlandığında çeşitli proteazlar salgılar. Hastalığın klinik belirtileri acı, fotofobi, fazla gözyaşı üretimi, gözlerde kızarıklık ve epiteliyal düzensizlikler ile başlar. Son evrede ise kornea yapısı iyice bozulur ve sonunda körlük meydana gelir. Tanısı kornea biyopsisi ya da kornea kazıntısının mikroskopik incelenmesiyle yapılır (Trabelsi ve diğ., 2012).

İnsanlarda hastalık yapan diğer ÖYA *N. fowleri* 'dir. *N. fowleri* göllerde, yüzme havuzlarında, nehirlerde, sulama kanallarında ve termal sularda yaşamaktadır. pH, kuruluk gibi bazı çevre şartlarına karşı oldukça hassastır ve denizlerde yaşayamaz. *N. fowleri* termofilik bir türdür ve 45 °C'ye kadar sıcak ortamlarda gelişimlerini sürdürebilir. Yaşam döngüsünde trofozoit veya kist formunda bulunur. Trofozoit aktif şeklidir, bakteri ve organik maddelerle beslenir, eşeysiz üremeyele çoğalır, distile suda iki flagellalı flagellat formuna dönüşebilir. Trofozoit şekli olumsuz koşullarda ve besin yokluğunda ise kist şekline geçer. Kistler genellikle küresel, porlu ve çift duvarlıdır. Bütün evreler büyük karyozomlu ama periferik olmayan kromatine sahip tek nükleusla karakterize edilmektedir (Trabelsi ve diğ., 2012; Ugonabo ve Gughani, 1989; Visvesvara ve diğ., 2007). *N. fowleri*, merkezi sinir sisteminde aniden oluşan ve ölümcül bir enfeksiyon olan primer amibik meningoensefalit (PAM)'a sebep olur. Kişiler, bu patojeni içeren sularda yüzerken amiplerin burun deliklerinden girmesi, sonrasında koku sinirleri boyunca ilerleyerek beynin kribriiform plakasına göç etmesi ve merkezi sinir sistemine giriş fırsatı yakalaması vasıtasıyla enfekte olurlar. Amipler hızlıca artarlar ve nöral dokularda yaygın zarar oluştururlar. Hastalığın hızlı seyretmesi nedeniyle teşhisi oldukça zordur ve omurilik sıvısındaki amip hücrelerinin tanımlanmasına bağlıdır. Ek olarak antimikrobiyal ajanların kıtlığından dolayı ölüm hastalığın değişmez sonucudur (Schuster, 2002; Trabelsi ve diğ., 2012; Ugonabo ve Gughani, 1989; Visvesvara ve diğ., 2007).

İnsanlarda ve hayvanlarda hastalığa neden olan bir diğer ÖYA *Balamuthia* cinsidir (Bakardjiev ve diğ., 2003; Pritzker ve diğ., 2004; Riestra-Castaneda ve diğ., 1997). Yaşam döngüsü birden fazla nükleus içeren trofozoit şekli ve gevşek dış duvarlı kist şekli ile karakterizedir (Niyiyati ve diğ., 2009; Siddiqui ve Khan, 2015). Bu cinse ait ilk tanımlama zoolojik bir parkta ölmüş olan hamile bir mandril babununun beyninden yapılan izolasyondur (Schuster, 2002). İnsanda ve

hayvanda bilinen enfeksiyon yapan tek tür *B. mandillaris*'tir. Genellikle toprakta yaşar, insanlarda ciddi kutanoz enfeksiyonlara ve merkezi sinir sistemi hastalıklarına sebep olur (Horn ve Wagner, 2004). *Acanthamoeba*'nın aksine izole edilmesi ve kültüre alınması oldukça zordur (Trabelsi ve diğ., 2012). Çoğu vakada teşhis otopsi ile yapılmıştır. Amip hücrelerinin vücuda giriş yolu tam olarak bilinmemesine rağmen *Acanthamoeba* gibi muhtemelen burun yoluyla ya da doğrudan deri üzerindeki bir lezyondan girerek kan yoluyla yayıldığı düşünülmektedir (Schuster, 2002).

Bir diğer ÖYA olan *Sappinia* cinsi, *S. pedata* ve *S. diploidea* olmak üzere iki farklı tür içermektedir. Bu mikroorganizmalar doğada yaygın halde bulunmakta, topraktan, sudan ve memeli dışkısından izole edilebilmektedir. Trofozoit şekli iki nükleusla karakterizedir. Bazı hücreleri sitoplazmik vakuollerinde endosimbiyotik bakterilere barınak sağlamaktadır. Kist şekli gastrik sıvılarda ve midede yaşayabilmektedir (Schuster, 2002; Trabelsi ve diğ., 2012). Önceleri *Sappinia* cinsinin insan veya hayvanlarda öldürücülüğü gösterilememiştir. Ancak daha sonra Gelman ve diğ. (2001) bir insanda amibik ensefalit nedeni olarak *Sappinia diploidea*'yı tespit etmiş ve vücuda giriş noktasının solunum yolları olduğunu ve hastanın iyileşmesi nedeniyle bu amibin muhtemelen yukarıda tarif edilen diğer amiplere kıyasla daha az öldürücü olduğunu ileri sürmüşlerdir.

2.2. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLERİN BAKTERİLER İLE OLAN İLİŞKİLERİ

Yukarıda belirtildiği gibi ÖYA'nın insanlarda enfeksiyonlara sebep olmalarının dışında, yaşadıkları çeşitli ortamlarda bakterilerle olan ilişkileri ve bu sayede patojen bakterilerin yayılmasındaki rolleri ile ilgili çalışmalar da uzun yıllardır dikkat çekmektedir. Yapılan pek çok çalışmada, bazı bakterilerin ÖYA hücreleri içerisine girerek yaşadıkları ve bu amipleri konak olarak kullandıkları gösterilmiştir (Akya ve diğ., 2009; Brown ve Barker, 1999; Cervero-Aragó ve diğ., 2015; Chekabab ve diğ., 2012; Delafont ve diğ., 2016; Greub ve Raoult, 2004; Horn ve Wagner, 2004; Khan ve Siddiqui, 2014; Lamothe ve diğ., 2004; Molmeret ve diğ., 2005; Steinert ve diğ., 1998; Schuster, 2002; Siddiqui ve diğ., 2017; Strassman ve Shu, 2017; Thomas ve diğ., 2008; Trabelsi ve diğ., 2012; Winiecka-Krusnell ve Linder, 2001; Winiecka-Krusnell ve diğ., 2002).

ÖYA'ların bakteriler ile olan ilişkileri ve bunların sonuçları oldukça çeşitlidir ve şu şekilde özetlenebilir:

- 1- Gerek doğada, gerek insan yapımı su sistemlerinde yaşayan bazı bakteriler, aynı ortamdaki bazı ÖYA tarafından hücre içerisine alınarak, onların temel besin kaynağını oluştururlar. Bu nedenle amipler doğada bazı bakterilerin sayısında azalmalara sebep olmaları nedeniyle mikrobiyal komünite açısından önemli bir role sahiptirler (Şenler ve Yıldız, 2010).
- 2- Bazı bakteriler, konak hücreler olan bazı ÖYA içine girerek yaşayabilir ve çoğalabilirler. Böylece bu bakteriler antibiyotikler, dezenfektanlar, UV ışın, yüksek ısı, pH değişimi gibi kötü çevre şartlarından kendilerini koruyabilirler ve bu ilişki bakterilerin lehine/sayısında artışlar şeklinde sonuçlanır (Brown ve Barker, 1999; Delafont ve diğ., 2016; Molmeret ve diğ., 2005; Winiecka-Krusnell ve Linder, 2001).
- 3- ÖYA içerisinde yaşayan/üreyebilen bakterilerin patojenitelerini arttırması da söz konusudur. Örneğin amipler içerisinde üreyen bakterilerin antibiyotiklere karşı 1500 kat direnç kazandıkları gösterilmiştir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003)
- 4- ÖYA içerisinde çoğalan bazı bakteriler ÖYA'yı lizise uğrattırır ve böylece bakteriler sayıca artmış olarak dış ortama yayılırlar (Horn ve Wagner, 2004).
- 5- “ÖYA içerisinde gelişmekte olan birçok hücre içi bakterinin, insanlar için patojen olan bakterilerle ortak bir atayı paylaştığı” fikri öne sürülmüştür. Yani “günümüzde patojen olarak bilinen bakteriler bu yeteneklerini belki de ÖYA içerisindeki yaşamları sayesinde kazanmışlardır. ÖYA olmasaydı belki de patojen türler ortaya çıkmayacaktı” diye düşünülmektedir. Bu ortak yaşam sürecinde bakteriler amiplerin fagositozundan kaçmak ve yaşamlarını sürdürebilmek için fagozom-lizozom oluşumunu engelleme, fagozomal membrana zarar verme, fagozomal pH değiştirme gibi çeşitli mekanizmaları kullanmaktadır. Fagositozdan kaçan bakteriler çoğunlukla amiplerin sitosolündeki vakuol içine girmekte ve burada yaşamaktadır. Nadir de olsa bazı türler nukleusu işgal edebilmektedir (Molmeret ve diğ., 2005; Strassmann ve Shu, 2017).
- 6- Son yıllardaki çalışmalar, dar kapsamlı ve çok az sayıda olsalar bile, göstermiştir ki *Acanthamoeba* cinsi ÖYA'nın hücresiz sıvısı antimikrobiyal özelliğe sahiptir, bazı bakterilerin üremesini engellemekte ya da onları öldürmektedir (Iqbal ve diğ., 2014; Tashmukhambetov, 2016).

Bu bilgiler ışığında ÖYA-bakteri ilişkisinde ÖYA'nın bakterilerin çoğalmasına katkı sağlamak veya onların üremelerini engellemek gibi 2 temel fonksiyonunun olduğunu söylemek yanlış olmayacaktır. Yapılan literatür taraması sonucunda çalışmaların çoğunun “ÖYA'nın 1. Fonksiyonu” yani bakterilerin çoğalmasına katkı sağlaması ile ilgili olduğu saptanmıştır.

Bugüne kadar yayınlanmış birçok çalışmanın sonuçları, pek çok patojen bakterinin ÖYA hücreleri içerisinde (çoğunlukla *Acanthamoeba* cinsi) çoğaldığını göstermiştir. Bu patojen bakteriler arasında *L. pneumophila*, *B. cepacia*, *B. pseudomallei*, *B. cereus*, *F. tularensis*, *M. avium*, *E. coli* 0157 H:7, *L.monocytogenes*, *H. pylori*, *C. pneumoniae*, *V. cholerae*, *S. pyogenes* ve *S. pneumoniae* bulunmaktadır (Akya ve diğ., 2009; Chekabab ve diğ., 2012; Greub ve Raoult, 2004; Horn ve Wagner, 2004; Lamothe ve diğ., 2004; Molmeret ve diğ., 2005; Rowbotham, 1980; Schuster, 2002; Steinert ve diğ., 1998; Siddiqui ve diğ., 2017; Thomas ve diğ., 2008; Trabelsi ve diğ., 2012; Winiecka-Krusnell ve diğ., 2002).

ÖYA hücreleri içerisinde patojen olarak çoğalan bakterilerin varlığı ilk kez Rowbotham tarafından *L. pneumophila* bakterisi ile gösterilmiştir (Rowbotham, 1980). Bu bakteri insanda akciğer ve üst solunum yolu enfeksiyonu olan lejyoner hastalığına sebep olur, özellikle insan yapımı su sistemleri ve havalandırma sistemleri aracılığıyla yayılır. Yapılan çalışmalarda bakterinin özellikle su sistemlerinde *Acanthamoeba* cinsini konak seçerek klor ve diğer dezenfektanlar, sıcaklık değişimi gibi faktörlerden kendini koruduğu gösterilmiştir (Anacarso ve diğ., 2010; Molmeret ve diğ., 2005; Wang ve diğ., 2014). Brown ve Barker (1999), amipler içerisinde üreyen *L. pneumophila'* nın sıcaklık, ozmolarite, pH ve oksitleyici ajanlar v.b. sert çevresel koşullara direncinde dikkate değer bir artış gösterdiğini tespit etmiştir. Böyle hücre içi yaşama adapte olmuş *L. pneumophila* ile özgür yaşayan *L. pneumophila'* nın kullanıldığı karşılaştırmalı çalışmalarda özgür yaşayan *L. pneumophila'* nın çevresel koşullara daha duyarlı olduğu, biyosit ve dezenfektan varlığında kendini koruyamadığı saptanmıştır (Barker ve diğ., 1992; Barker ve diğ., 1995; Molmeret ve diğ., 2005). *Acanthamoeba* cinsinin yanı sıra diğer bir ÖYA olan *Balamuthia* cinsinin de *Legionella* gibi patojenik mikroorganizmalar için konak hücre olduğu da gösterilmiştir (Horn ve Wagner, 2004). *Legionella* ve ÖYA arasındaki etkileşim, memeli hücrelerinin *Legionella* ile enfeksiyonu sırasında ortaya çıkan süreçlerle önemli derecede benzerlik göstermektedir ve *L. pneumophila'* nın ÖYA içi çoğalmasının, insanlarda enfeksiyonun ön aşaması olduğuna dair ikna edici kanıtlar vardır. Dolayısıyla, bu hücre içi bakteriyel patojenlerin, ökaryotik konakçı hücrelerde kullandıkları hayatta kalma

mekanizmalarını, ÖYA ile etkileşimleri sırasında geliştirdikleri düşünülmektedir ve bu durum bakterilerin insanlarda sebep olduğu enfeksiyonlarda ÖYA'nın diğer bir rolünü açıkça ortaya koymaktadır (Molmeret ve diğ., 2005). Literatürdeki diğer çalışmalarda *M. avium*'un *Acanthamoeba* içerisine girerek kuruluk ve yüksek klor konsantrasyonundan kendini koruduğu, *H. pylori* üremesinin de *Acanthamoeba* sayesinde desteklendiği belirtilmektedir (Horn ve Wagner, 2004; Thomas ve diğ., 2008; Steinert ve diğ., 1998; Winiecka-Krusnell ve diğ., 2002). *V. cholerae*'nin klinik vakalar dışında su ortamlarından da izole edilmesi amiplerin su ortamlarında bu mikroorganizmaların hayatta kalmasına yardımcı olabileceğini düşündürmüştür (Brown ve Barker, 1999). Yapılan diğer çalışmalarda *Mobilincus curtisii*'nin anaerobik koşullarda hayatta kalabilmek için amipleri konak hücre olarak kullandıkları, ciddi akciğer enfeksiyonları oluşturan *B. cepacia*'nın özellikle *A. polyphaga*'nın asidik vakuolünde replikasyon yapmadan yaşayabildiği, *F. tularensis*'in *A. castellanii* trofozoitleri içinde hayatta kaldığı ve çoğaldığı, *L. monocytogenes*'in amip hücrelerinden salınan materyaller üzerinde saprofit olarak geliştiği ve bu durumun bakterilerin farklı çevresel koşullar altında hayatta kalma yeteneğini artırabileceği, solunum yoluyla bulaşarak insanlarda pnömoni gibi akciğer enfeksiyonlarına sebep olan *C. pneumoniae*'nin ÖYA içine girerek bağışıklık sisteminin bakterisidal etkilerinden ve antibiyotiklerden korunduğu, ayrıca bu bakterinin amip endosimbiontu olduğu ve amipleri enfekte etme mekanizmaları ile makrofajları enfekte etme mekanizmalarının çok benzer olduğu gösterilmiştir (Akya ve diğ., 2009; Chekabab ve diğ., 2012; Horn ve Wagner, 2004; Lamothe ve diğ., 2004; Molmeret ve diğ., 2005; Trabelsi ve diğ., 2012). Chekabab ve diğ. (2012) besin zehirlenmelerine yol açan, et ürünleri ve su aracılığıyla insanlara bulaşabilen bir patojen olan *E. coli* H:7 O:157'nin rezervuarının *Acanthamoeba* olduğunu ve bakterinin virülansını bu sayede arttırdığını bildirmişlerdir. İnsanlarda farenjit, pnömoni ve menenjitin başlıca etkeni olan *S. pyogenes* ve *S. pneumoniae*'nin *A. castellanii* hücrelerinin içinde çoğaldığı, bu sayede memeli hücreleri için *Streptococcus* enfektivitesinin arttığı, antibakteriyel maddelerin saldırılarına karşı hayatta kalmasını sağladığı ya da havaya bulaşmasının kolaylaştığı, *A. castellanii* insan makrofaj hücreleri ile benzerlikler gösterdiği için *Streptococcus* için bir eğitim alanı sağlamış olduğu fikri öne sürülmüştür (Siddiqui ve diğ., 2017). Bu bakterilere ek olarak doğada özellikle su kaynaklarında bulunan bazı *Pseudomonas* cinsi bakterilerin ÖYA için besin kaynağı olmasının (Greub ve Raoult, 2004) yanı sıra, tam tersi yani bu bakterilerin *Acanthamoeba*'yı enfekte ettiği ve trofozoitleri içerisinde çoğaldığını

gösteren çalışmalar da mevcuttur (Brown ve Barker, 1999; Michel ve diğ., 1995; Weitere ve diğ., 2005)

2.3. ANTİMİKROBİYAL ETKİLİ MADDELERE SAHİP OLAN CANLILAR VE ÖYA

Bilindiği gibi doğada bir arada yaşayan farklı mikroorganizma türleri besin kıtlığı, predatörler, ani ısı değişimleri gibi çeşitli stres koşullarında yaşamlarını sürdürebilmek için çeşitli adaptasyonlar geliştirmektedirler. Bu adaptasyonlardan en önemlisi kendilerini tehdit eden diğer mikroorganizmaları öldürmek veya üremesini inhibe etmek için çeşitli antimikrobiyal maddeler üretimleridir. Mikroorganizmalar arasında meydana gelen böyle ekolojik ilişkilerin anlaşılması, yeni antimikrobiyal maddelerin tanımlanmasında da büyük önem taşımaktadır ve bu özellikteki yeni maddelerin keşfedilmesi için yıllardan beri çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin Fleming (1929) *Penicillium notatum* adlı mantardan ilk keşfedilen antibiyotik olan penisilin'i, sonraki yıllarda Schatz ve diğ. (1944) *Streptomyces griseus* adlı toprak bakterisinden streptomisini, Sanchez ve diğ. (1988) *Acremonium chrysogenum* mantarından sefalosporinleri elde etmişlerdir. Ayrıca sayıları 12-50 aminoasit dizisi arasında değişen ve geniş etkili antibiyotikler olarak yararlanılan antimikrobiyal peptidler (AMP), laktik asit bakterileri, *Staphylococcus simulans*, *Enterobacter* gibi bakterilerden ve çeşitli ökaryotik hücrelerden elde edilmiştir (Bavin ve diğ., 1952; Bastos ve diğ., 2010; Döşler, 2017; Lopez ve diğ., 2007; Rossi ve diğ., 2008). Mah ve diğ. (2001) *Bacillus* türü bakterilerin, gıda patojenlerini ve bazı mayaları da içeren çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerine güçlü etkisi olan "bakteriyosin" adı verilen geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler salgıladığını tespit etmişlerdir. Ek olarak laktik asit bakterileri ve propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen çeşitli bakteriyosinlerin olduğu da bilinmektedir (Şimşek ve diğ., 2002). Son yıllarda özellikle doğal habitatları kirli ortamlar olan bazı hayvanların, mikrobiyal enfeksiyonlardan nasıl korunduğuyla ilgili çalışmalar da artmaktadır. Örneğin Lee ve diğ. (2012) bazı hamam böceği ve çekirge türlerinin hemolenflerinin veya beyin lizatlarının metisiline dirençli *S. aureus*, *E. coli* K1, *Staphylococcus epidermidis* gibi bakteriler üzerinde %90'a varan antimikrobiyal etki gösterdiğini, Akbar ve diğ. (2020) hamam böceği, tarantula, kırkayak, yengeç, sıçan, piton, kaplumbağa, tavuk gibi kirli ortamlarda yaşamını sürdüren çeşitli canlılardan izole ettikleri bağırsak florası bakterilerinin hücresiz sıvılarının, denenen çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı geniş ölçüde antibakteriyel etkili

olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca bitkiler de uzun yıllardır antibakteriyel etkileri açısından araştırma konusu olmuştur. Prashanth ve diğ. (2001) *Punica granatum* bitkisinin metanolik ekstraktlarının, test ettikleri tüm bakteriler üzerinde antibakteriyel etki gösterdiğini saptamışlardır. Artun ve diğ. (2016), 14 adet tıbbi bitkinin metanolik ekstraktlarının, çeşitli bakteri suşları üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada bu bitkilerden üç tanesinin metanolik ekstraktlarının *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Enteritidis, *Proteus mirabilis* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Yine birçok araştırmacı çeşitli bitkilerin ekstraktlarının ve esansiyel yağlarının, farklı mikroorganizmalar üzerinde antiseptik özellikleri olduğunu göstermiştir (Brantner ve Grein, 1994; Dorman, 2000; Faleiro ve diğ., 1997; Hili ve diğ., 1997; Klančnik ve diğ., 2010; Martindale, 1910; Mostafa ve diğ., 2018; Nanasombat ve diğ., 2018; Nascimento ve diğ., 2000).

ÖYA'nın antibakteriyel maddeler üretilip üretilmediği ile ilgili yurt dışında son 5-6 yıl içerisinde, çok az sayıda suşun kullanıldığı, küçük çaplı iki adet çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde *Acanthamoeba*'nın hücresiz sıvısının metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) karşısında %99' dan fazla, vankomisin dirençli *Enterococcus* karşısında %8 inhibe edici etki gösterdiği halde *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* karşısında herhangi bir inhibe edici etki göstermediği tespit edilmiştir (Iqbal ve diğ., 2014). Diğer bir çalışmada ise *Acanthamoeba*'nın hücresiz sıvısının *S. pneumoniae*, metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA), *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *H. influenza* karşısında sırasıyla %100; %10.6; %3.4; %6.1; %11.1 ve %2.5 oranında inhibe edici etki gösterdiği bildirilmiştir (Tashmukhambetov, 2016). Ülkemizde ÖYA'nın bakteriler üzerine inhibe edici özellik gösterip göstermediği ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamakta ve tüm dünyada olduğu gibi antibiyotiklere dirençli bakteriler tedavide sorunlara yol açtığından yeni antimikrobiyal maddelerin keşfine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Bilindiği gibi pek çok bakteri gibi *P. aeruginosa*'da antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştirmiş bir bakteridir. *Pseudomonas* cinsi bakteriler Gram negatif, çomak şekilli, hareketli, sporsuz, kapsülsüz, non-fermentatif, aerob, çevre koşullarına kolaylıkla uyum sağlayabilen bakterilerdir. Kanlı agarda hemoliz yapar, jelatini eriterek parçalar, katalaz, sitrat kullanımı, lipid hidrolizi, hidrojen sülfür üretimi reaksiyonları pozitif, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, indol üretimi, üreaz aktivitesi, nişasta hidrolizi reaksiyonları ise negatiftir ve nitriti nitrate redükte ederler (Bergey ve diğ., 1939; Tuncer ve Akova, 1996; Yücel ve diğ., 2006).

P. aeruginosa sağlıklı bireylerde vücudun çeşitli bölgelerinde geçici kolonizasyon yapar ve enfeksiyona nadiren neden olur. Ancak özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda önemli bir patojendir ve dünya genelinde hastane enfeksiyonlarının % 10-15'inden sorumlu olduğu bilinmektedir. *P. aeruginosa* üriner sistem, mide-bağırsak sistemi, solunum sistemi, sinir sisteminin yanı sıra, akciğer, cilt, göz ve kulak enfeksiyonlarına da sebep olmaktadır (Cross ve diğ., 1983; Kandi, 2010; Orucu ve Geyik, 2008; Tuncer ve Akova, 1996; Tunçoğlu ve diğ., 2009; Yücel ve diğ., 2006).

Yıllardan beri tüm bu bahsedilen hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin aşırı ve bilinçsiz kullanımı her geçen gün bu mikroorganizmalarda direnç oluşumunun hızla artmasına neden olmuştur ve bu durum *P. aeruginosa* suşlarından kaynaklanan hastalıkların tedavisini zorlaştırmaktadır. Bu bakteriler birçok antibiyotiğe karşı hızla geliştirdikleri çoklu ilaç direnci, hatta dezenfektanlar içinde bile yaşamaya devam edebilmeleri nedeni ile güncel bir sorun olarak önemlerini sürdürmektedir. Özellikle son yıllarda artan antimikrobiyal direnç oranları nedeniyle mortalitesi %31'den %61'e çıkmıştır. Bu kapsamda, ülkemizde çeşitli kaynaklardan izole edilmiş farklı *Pseudomonas* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıklarını incelemek amacıyla yapılmış çeşitli çalışmalarda, bu bakterilerin amikasin, aztreonam, gentamisin, imipenem, kolistin, levofloksasin, meropenem, netilmisin, piperasilin/tazobaktam, sefepim, sefoperazon/sulbaktam, sefotaksim, seftazidim, siprofloksasin, tobramisin, gibi çok çeşitli antibiyotiklere farklı oranlarda direnç gösterdikleri belirlenmiştir (Güney ve diğ., 2011; Kireççi ve Sevinç, 2008; Özdemir ve diğ., 2009; Tunçoğlu ve diğ., 2009; Uzun ve diğ., 2012; Yücel ve diğ., 2006). Bu nedenle antibiyotiklere direnç geliştiren pek çok bakteri gibi *P. aeruginosa* karşısında da etkili olabilecek yeni antibakteriyel madde arayışları halen devam etmektedir (Akyar, 2010; Lee ve diğ., 2012).

Bu bağlamda bu tez çalışmasında ülkemizden izole edilmiş olan farklı ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarının yine ülkemizden izole edilen klinik *P.aeruginosa* suşları karşısında antibakteriyel etki gösterip göstermediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada beş farklı özgür yaşayan amip (ÖYA) suşunun hücresiz sıvılarının (ACM) 5 adet *P. aeruginosa* suşuna karşı antibakteriyel etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan ÖYA suşlarından üç tanesi (A10, A13, A14) önceki yıllarda İ.Ü. Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalında tamamlanmış olan bir yüksek lisans tez çalışması esnasında yüzme havuzlarından (Zeybek ve Türkmen, 2020), bir tanesi doğadaki bir göl suyundan (U.GÖL) izole edilmiştir. *A. castellanii* ATCC 50373 standart suş olarak kullanılmıştır. *P. aeruginosa* suşlarının tümü (PA2, PA3, PA4, PA5) klinik suşlar olup İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir. *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suş olarak kullanılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Deneylerde kullanılan mikroorganizmalar

MİKROORGANİZMALAR (KOD)		KAYNAK
ÖYA	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	Toprak
	A10	Yüzme havuzu
	A13	Yüzme havuzu
	A14	Yüzme havuzu
	U.GÖL	Göl suyu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Kan
	PA2	ETA
	PA3	İdrar
	PA4	ETA
	PA5	Safra

ETA:Endotrakeal aspirat

-86 °C’de saklanmakta olan tüm ÖYA suşları öncelikle aşağıda belirtildiği gibi oda ısısına getirilerek canlandırılması sağlanmış, daha sonra aksenik kültürleri ve ACM’leri elde edilmiştir.

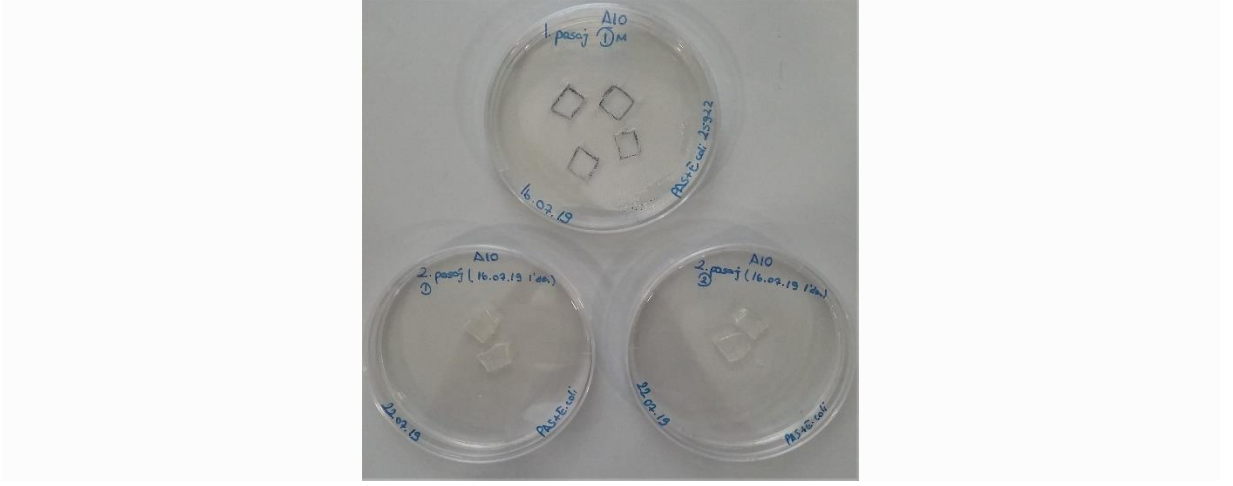
3.1. ÖYA SUŞLARININ CANLANDIRILMASI

Önceden izole edilmiş ve freezing medium (FM) içerisinde -86 °C’de saklanmış olan ÖYA suşları (A10, A13, A14, U.Göl) ve *A. castellanii* ATCC 50373 suşu öncelikle oda ısısına getirilmiştir. Daha sonra, üzerine 100 µL ısı ile inaktive edilmiş *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonu yayılmış olan non-nutrient agar (NNA) içeren Petri kutularına ekilmiş ve 30 °C’lik etüvde aerobik koşullarda 3-4 hafta inkübasyona bırakılmıştır (Axelsson ve diğ., 2009; Borin ve diğ., 2013). Her gün invert mikroskopta x10 objektifte, yoğun üreme görülene kadar incelenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: İnvirt mikroskop

Petri kutularında üreme görüldüğünde amip suşlarının pasajları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla NNA üzerinde üremenin olduğu 1-2 bölge invert mikroskopta incelenerek işaretlenmiş ve aseptik şartlarda öze ile 1 cm²’lik alanlar şeklinde kesilmiş ve yine üzerine 100 µL ısı ile inaktive edilmiş *E. coli* yayılmış olan Petri kutularındaki NNA yüzeyine ters çevrilerek koyulmuş ardından 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.2).

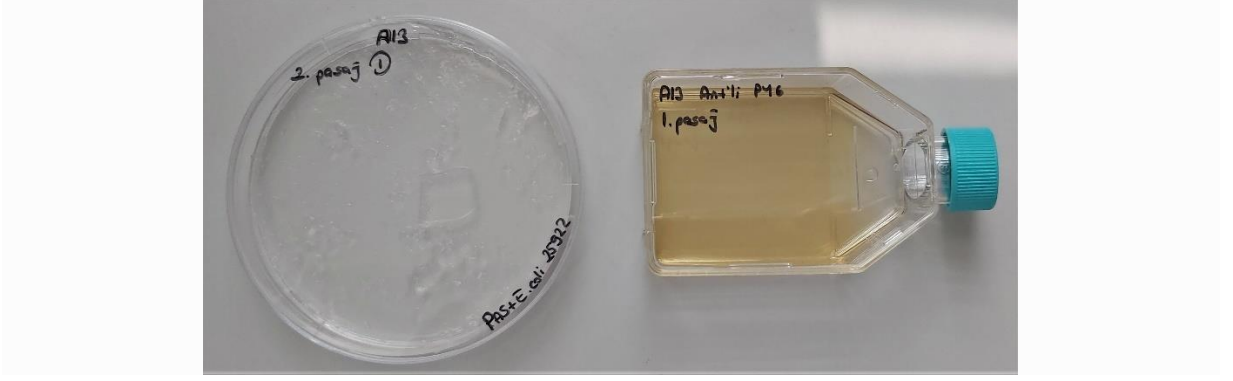


Şekil 3.2: Petri kutusundaki NNA’da üremiş ÖYA suşlarının işaretlenme sonrası kesilmek suretiyle (üstte), taze NNA’ya yapılan pasajları (altta).

Amiplerin pasajlarının yapılması amacıyla alternatif olarak, üreme görülen Petri kutularındaki NNA içerisine 2-3 mL Page’s Ameboal Saline (PAS) çözeltisi eklenmiş ve hücreler, agar yüzeyinden steril pipet yardımıyla kaldırıldıktan sonra tüm sıvı çekilerek 100 μ L ısı ile inaktive edilmiş *E. coli* yayılmış olan Petri kutularındaki taze NNA yüzeyine aktarılmış ve 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır (Jacquier ve diğ., 2013; Zeybek ve diğ., 2010).

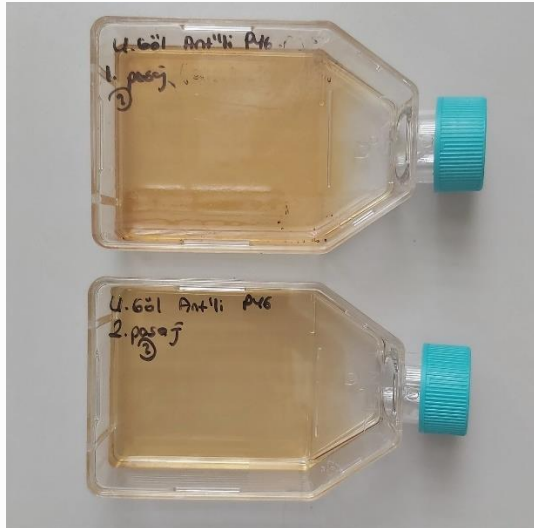
3.2. ÖYA SUŞLARININ AKSENİK KÜLTÜRLERİNİN ELDESİ

ÖYA’nın Petri kutularındaki yoğun üremesinden sonra aksenik kültürlerinin hazırlanması aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla öncelikle pepton maya ekstraktı glukoz (PYG) besiyeri hazırlanmış ve olası diğer mikroorganizmaların kültürü kontamine etmesini önlemek amacıyla içerisine 0.5 mg/mL penisilin ve 0.5 mg/mL streptomisin antibiyotikleri eklenmiştir (Akya ve diğ., 2009; Eroğlu ve diğ., 2015; Schuster 2002). Bu antibiyotikli PYG besiyeri (10 mL), ÖYA’nın aksenik kültürünün yapılacağı 25 cm²’lik T-25 doku kültürü flaskı içerisine koyulmuştur. Sonra bu flaskların içerisine, 3.1’de anlatıldığı gibi her bir NNA içeren Petri kutularındaki yoğun üremiş olan ÖYA kültürünün içerisine 2-3 mL PAS eklendikten sonra, amip hücreleri agar yüzeyinden kaldırılarak ve pipet ile bu sıvının tümü çekilerek eklenmiştir. Ardından her bir flask, 30 °C’de aerobik şartlarda inkübasyona bırakılmıştır (Heredero-Bermejo ve diğ., 2013; Iqbal ve diğ., 2014) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Petri kutusunda yoğun üremiş olan ÖYA kültüründen (solda), aksenik kültürlerin hazırlanması için kullanılan antibiyotikli PYG içeren T-25 doku kültürü flaskı (sağda).

Tüm flasklardaki üremeler invert mikroskopta x10 objektifte günlük olarak incelenmiştir. Aksenik kültür elde etme aşamasında, amiplerin ortama adaptasyon süreci ve istenen tek tabakalı görünümü oluşturmaları en az 4 hafta sürmüş olup bu süre ÖYA suşuna göre değişkenlik göstermiştir. Bu sebeple amip konsantrasyonu belirli bir yoğunluğa ulaşana kadar (tek tabakalı üreme görülene kadar) kültürlerin, taze antibiyotikli PYG kullanılarak pasajları yapılmıştır. Bu amaçla, üreme görülen flask iyice karıştırıldıktan sonra içerisinden 2-3 mL sıvı pipet ile alınmış ve taze antibiyotikli PYG (10 mL) besiyeri içeren yeni flasklara aktarılmış, 30 °C’de aerobik şartlarda inkübasyona bırakılmış ve her gün invert mikroskopta incelenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Eski ve taze antibiyotikli PYG içeren flasklardaki ÖYA kültürleri

İnkübasyon süresince amiplerin ortama adaptasyonu, flask yüzeyine tutunmaları ve invert mikroskopta “tek tabakalı üreme” şeklinde görünüm oluşturmaları (Şekil 3.5) ile anlaşılmıştır (Byers ve diğ., 1980; Ortega-Rivas ve diğ., 2016; Üstüntürk ve Zeybek, 2014).



Şekil 3.5: “Tek tabakalı üreme” gösteren ÖYA suşu. İvert mikroskop (x100)

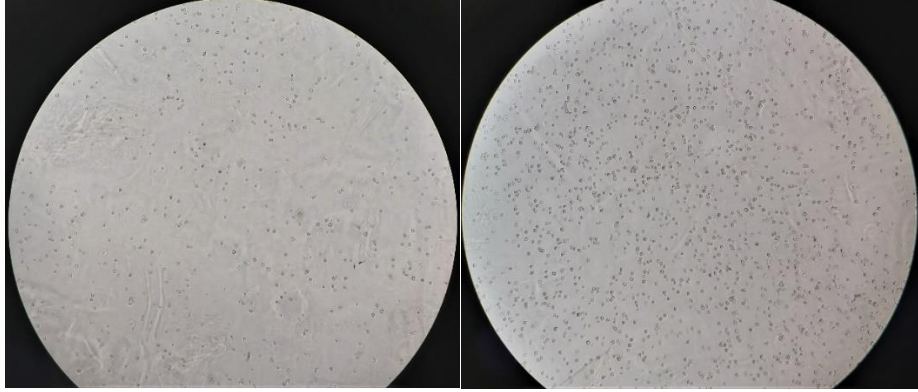
Flask içerisinde zemine yapışmış olan tek tabakalı üreme görüldüğünde kültürün içerdiği antibiyotiklerden arındırılması için, öncelikle flask içindeki antibiyotikli PYG besiyeri çalkalamadan ve dikkatlice steril santrifüj tüplerine aktarılmış, yıkama öncesi sıvısı (YÖ) olarak etiketlenmiştir. İçeriği boşaltılmış bu flaskın içerisine 8-10 mL PAS çözeltisi eklenmiş ve hafifçe çalkalanarak amip hücrelerinin zemine tutunmasını beklemek amacıyla 1-2 saat 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Amip hücrelerinin zemine tekrar tutunduğunun invert mikroskopta gözlemlenmesinin ardından flask içeriği boşaltılmış ve içerisine tekrar 8-10 mL PAS çözeltisi koyulmuştur. Kültürün antibiyotikten arındırılması için bu işlemler 3 kez tekrarlanmıştır. Son yıkama işleminden sonra flask içerisine 15 mL antibiyotiksiz PYG besiyeri aktarılmış ve 5 mL’si steril bir santrifüj tüpüne aktarılmış, yıkama sonrası sıvısı (YS) olarak etiketlenmiştir. Antibiyotikten arındırılmış PYG içerisindeki ÖYA kültürü (flask) 30 °C’de inkübasyona bırakılmış ve invert mikroskopta (x100) tek tabakalı üreme görülene kadar günlük olarak incelenmiştir (Akya ve diğ., 2009; Heredero-Bermejo ve diğ., 2013; Zeybek ve Binay, 2014).

Yıkama işleminin başlangıcında steril santrifüj tüpüne alınan ve YÖ olarak etiketlenen flask içeriği 3000 rpm’de 5 dk santrifüjlenmiş ardından 0.22 µm por çaplı steril filtreden geçirilmiş ve daha sonra antibakteriyel aktivite deneylerinde yıkama öncesi sıvısı (YÖ) olarak kullanılmak üzere -86 °C’de saklanmıştır. Ek olarak yıkama işleminin sonunda steril santrifüj tüpüne alınan ve YS olarak etiketlenen 5 mL flask içeriği, 3000 rpm’de 5 dk santrifüjlenmiş, 0.22 µm por

çaplı steril filtreden geçirilmiş ve antibakteriyel aktivite deneylerinde yıkama sonrası sıvısı (YS) olarak kullanılmak üzere -86 °C’de saklanmıştır.

3.3. AKSENİK ÖYA KÜLTÜRLERİNDEKİ AMİP HÜCRE SAYILARININ TESPİTİ VE HÜCRESİZ SIVILARININ (ACM) ELDESİ

3.2’de anlatıldığı gibi antibiyotik içermeyen PYG besiyerinde tek tabaka halinde üretilmiş olan aksenik ÖYA kültürü elde edildikten sonra ÖYA kültürlerinin hücresiz sıvılarının elde edilebilmesi için, flask içerisinden pipet ile 2-3 mL alınarak içerisinde taze antibiyotiksiz PYG (10 mL) bulunan başka bir flaska pasajı alınmıştır. 48-72 saat 30 °C’de inkübe edildikten sonra ÖYA hücreleri invert mikroskopta (x100) incelenmiş (Şekil 3.6) ve tek tabaka halinde üreyen ÖYA’ların sayımı ve canlılıklarının saptanması Thoma lamı ve tripan mavisi kullanılarak yapılmıştır (Eroğlu ve diğ., 2015; Zeibig, 2014).



Şekil 3.6: Aksenik kültürlerde PYG besiyerinde inkübasyon süresince ÖYA hücreleri sayısındaki artış (x100)

Bu amaçla her bir ÖYA kültürünü içeren flask iyice çalkalanarak içerisinden alınan sıvı Tripan mavisi (%0.4) ile karıştırılarak (1:1) 10 µL’si Thoma lamına alınmış ve adi ışık mikroskobunda (x100) amip trofozoitleri sayılmış ve aşağıdaki formül kullanılarak mL’deki amip trofozoitlerinin sayısı hesaplanmıştır (Bogitsh ve diğ., 2018; Halkman ve Ayhan 2000; Iqbal ve diğ., 2014).

- mL’deki amip trofozoitlerinin sayısı= A x 10000

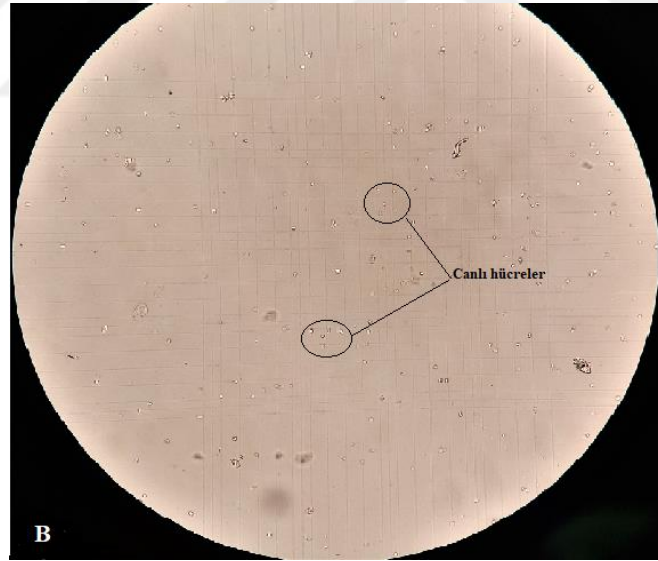
A= 16 büyük karedeki amip trofozoitlerinin sayısı

10000= 0.1 mm³ deki sayım sonucunu 1 mL’deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmez.

Boyama sonucunda mavi renkte boyanan amip hücreleri ölü, boyanmayanlar canlı amip hücreleri olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.7). Hücre sayısının ve canlılığının tespitinin ardından flask içeriği steril bir santrifüj tüpüne alınmış, 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı 0.22 µm por çaplı steril filtreden geçirilerek (Şekil 3.8) hücresiz ÖYA sıvıları (ACM) elde edilmiş ve -86 °C’de saklanmıştır (Iqbal ve diğ., 2014; Tashmukhambetov, 2016). Elde edilen her bir ACM, aşağıda belirtildiği gibi *P. aeruginosa* suşlarının canlandırılmasından sonra bu suşlar üzerindeki antibakteriyel aktivite deneylerinde kullanılmıştır.



A



B

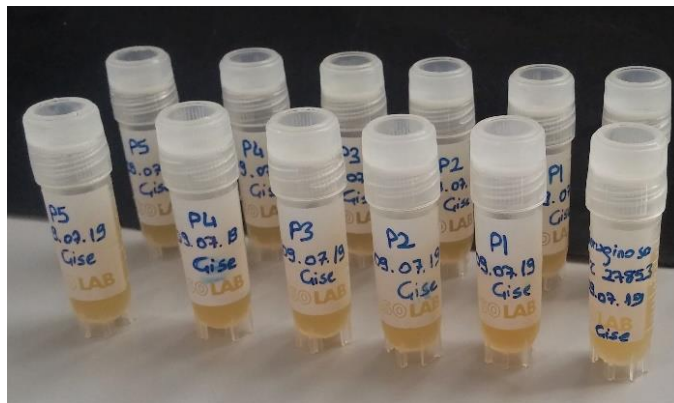
Şekil 3.7: A)Thoma lamı B) Thoma lamındaki canlı amip trofozoitlerinin mikroskopik görünümü (tripan mavisi, x100).



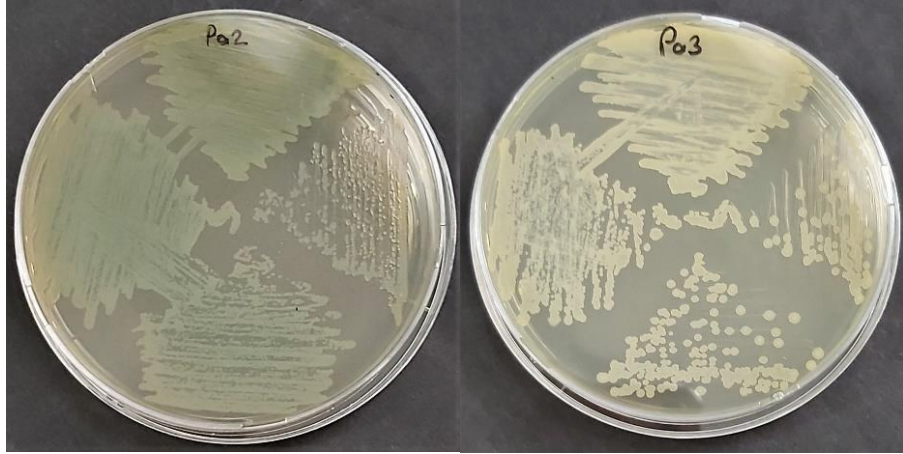
Şekil 3.8: ACM eldesi sırasında kullanılan santrifüj ve 0.22 µm por çaplı enjektör ucu steril filtre

3.4. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARININ CANLANDIRILMASI

Gliserollü Tyryptic Soya Broth (GTSB) içeren kryotüplerde, -86 °C’de saklanmakta olan *P. aeruginosa* suşlarının her biri (Şekil 3.9) kullanılmadan önce oda ısısına getirilmiş ve nutrient agar (NA) içeren Petri kutularına ekimleri yapılarak, 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tek düşen kolonilerden taze NA’ya azaltma yöntemi ile ekilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılarak her bir suş için saf koloniler (Şekil 3.10) elde edilmiştir (Çotuk, 2003; Srinivasan ve diğ., 2001; Wahba ve diğ., 1965; Yin ve diğ., 2009). Suşların *P. aeruginosa* olduğunu doğrulamak amacıyla Şekil 3.11’de görülen (bioMérieux) API® 20 NE tanımlama kiti kullanılmıştır.



Şekil 3.9: -86 °C’den çıkartılmış kryotüplerdeki *P.aeruginosa* suşları



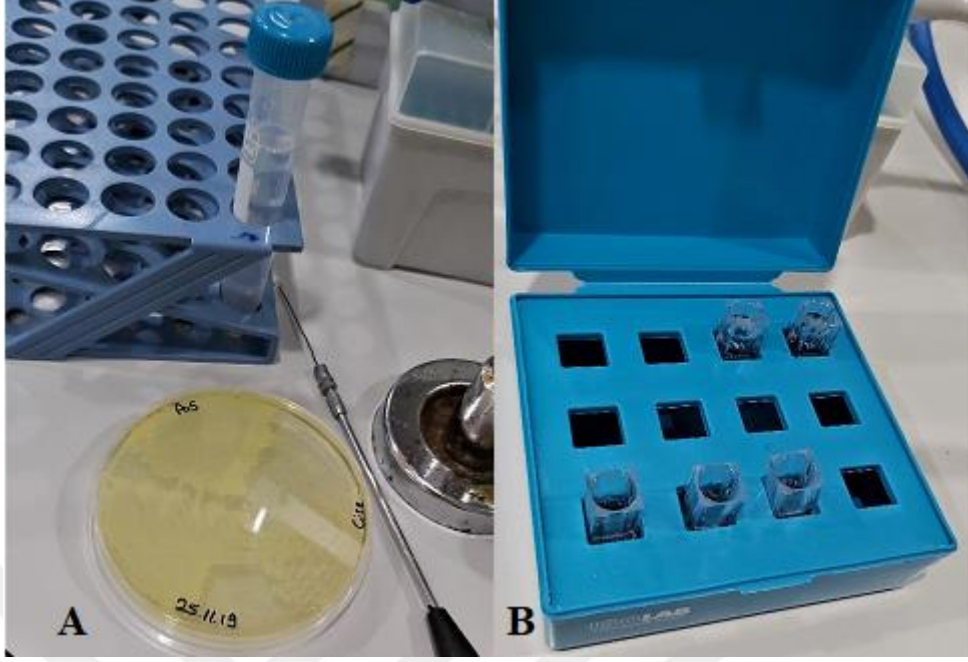
Şekil 3.10: Nutrient agara ekilmiş *P. aeruginosa* suşları



Şekil 3.11: API® 20 NE stribi (bioMérieux)

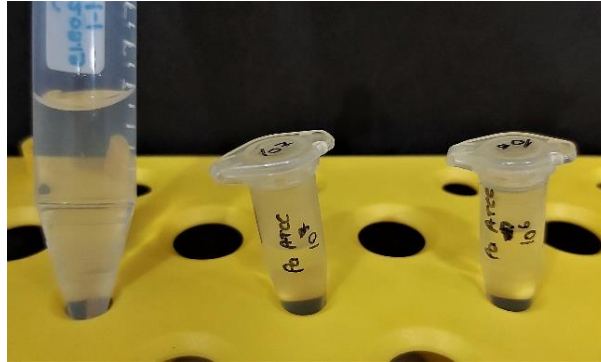
3.5 ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE DENEYLERİ

3.3’de anlatıldığı gibi elde edilen her bir ÖYA suşuna ait olan ACM’lerin, *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel aktivitelerinin test edilmesi amacıyla öncelikle *P. aeruginosa* suşlarının NA’da 24 saatlik taze kültürleri hazırlanmıştır. Bu kültürlerden öze yardımıyla 3-4 koloni alınarak steril tüpteki 5-10 mL Fosfat Tampon Salin (PBS) içerisinde süspanse edilmiş ardından bu süspansiyonun bir kısmı spektrofotometre küvetinin içerisine aktarılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: A) 24 saatlik *P. aeruginosa* kültürünün PBS içerisinde süspansiyonu B) Kullanılan spektrofotometre küvetleri

Spektrofotometre küvetindeki bakteri süspansiyonun yoğunluğu (10^8 kob/mL) spektrofotometre (OD=595) (PerkinElmer, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Daha sonra deneylerde kullanılmak üzere PBS ile 10^6 kob/mL'ye seyreltilmiştir (Şekil 3.13).

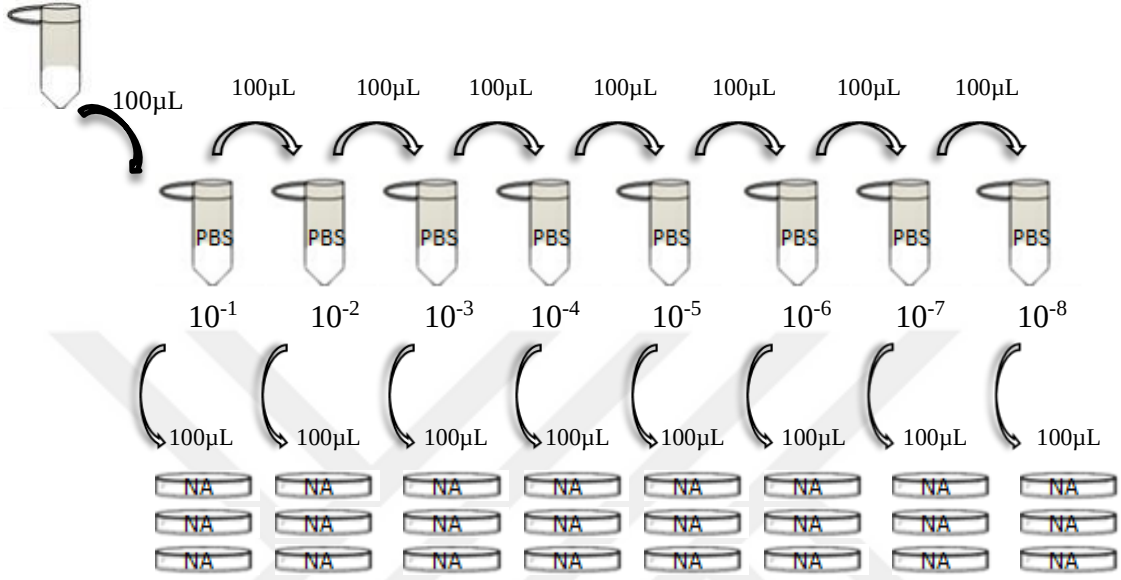


Şekil 3.13: 10^6 kob/mL bakteri süspansiyonu hazırlanması

Bu şekilde hazırlanmış olan (10^6 kob/mL) her bir bakteri süspansiyonu, her bir ÖYA'ya ait ACM ile 1:10 oranında karıştırılmış ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona kaldırılmış, inkübasyon sonrasında 10 kat seri sulandırılmaları (10^{-1} - 10^{-8}) hazırlanmıştır. Tüm sulandırım yapılan

tüplerden 100'er μL alınarak NA içeren Petri kutularına, 3'er tekrarlı ekimler yapılmış ve Petri kutuları 37°C 'de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır (Şekil 3.14).

P. aeruginosa süspansiyonu (10^6 kob/mL) + ACM (1:10)
(37°C , 24 saat)

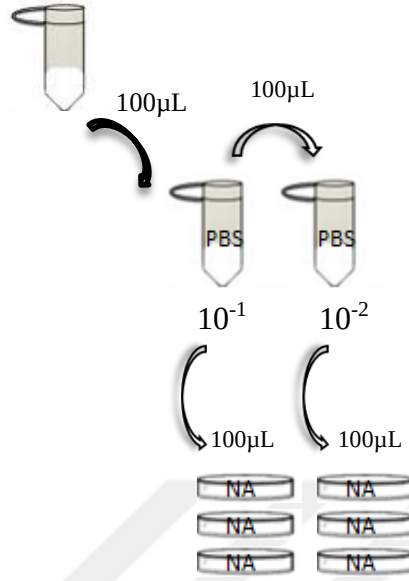


Şekil 3.14: ÖYA suşlarına ait ACM'nin antibakteriyel aktivite deneyinin şematik görünümü

İnkübasyon sonucunda değerlendirme, koloni sayım yöntemi ile yapılmıştır. 30-300 koloni görülen Petri kutularında elde edilen ortalama koloni sayısı, bu Petri kutularının ait olduğu sulandırma oranı ile çarpılmış ve mL'deki gerçek bakteri sayısı (kob/mL) hesaplanmıştır.

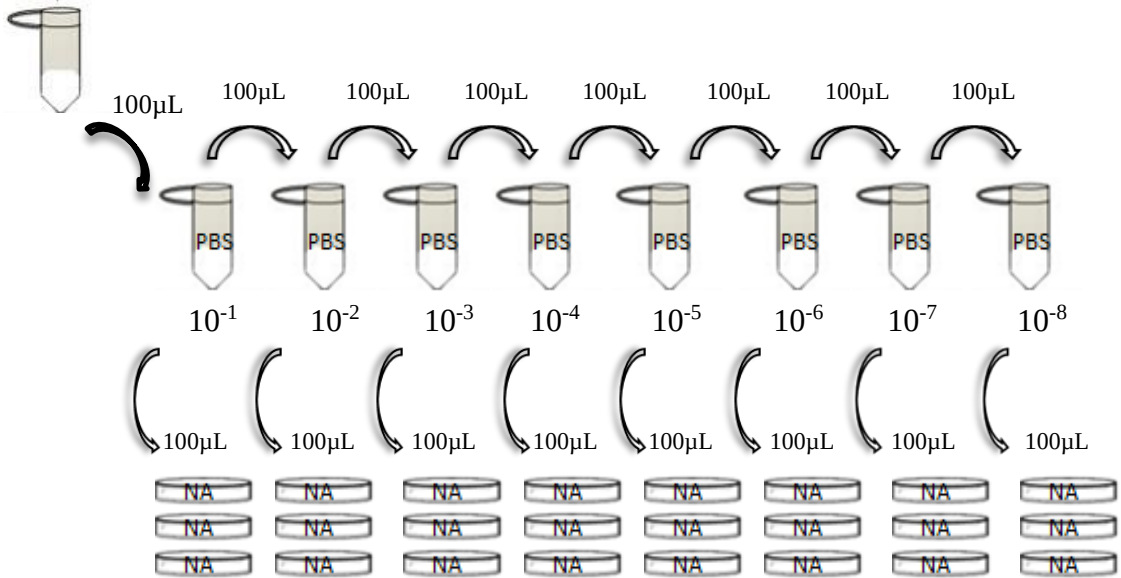
3.2 'de anlatıldığı gibi elde edilen YÖ ve YS, antibiyotikten arındırma işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini saptamak için denenmiştir. Bu amaçla, ÖYA suşlarının kültür ortamından alınmış olan her bir YÖ ve YS, 10^6 kob/mL bakteri süspansiyonu ile ayrı ayrı 1:10 oranında karıştırılmış ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrasında PBS içerisinde 10 kat seri sulandırmaları hazırlanmıştır. Tüm sulandırma yapılan tüplerinden 100'er μL alınarak NA içeren Petri kutularına, 3'er tekrarlı ekimler yapılmış ve Petri kutuları 37°C 'de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonucunda değerlendirme, koloni sayım yöntemi ile yapılmıştır. 30-300 koloni görülen Petri kutularından elde edilen ortalama koloni sayısı, bu Petri kutularının ait olduğu sulandırma oranı ile çarpılmış ve mL'deki gerçek bakteri sayısı (kob/mL) hesaplanmıştır (Şekil 3.15-Şekil 3.16)

P. aeruginosa süspansiyonu (10^6 kob/mL) + YÖ (1:10)
37°C, 24 saat



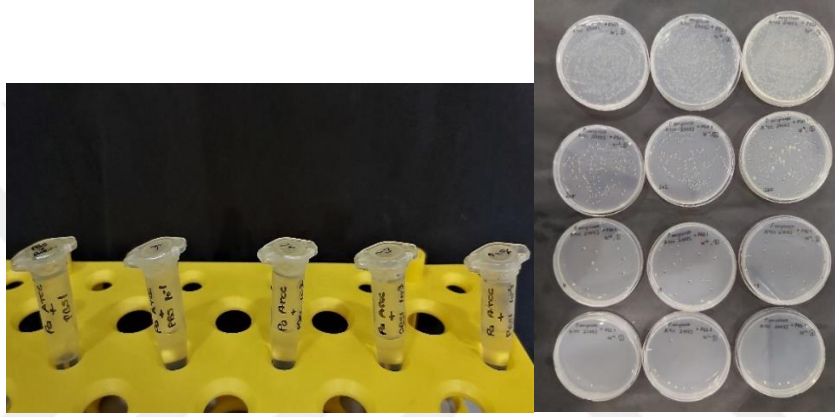
Şekil 3.15: Yıkama öncesi sıvısının (YÖ) antibakteriyel aktivite deneyinin şematik görünümü

P. aeruginosa süspansiyonu (10^6 kob/mL) + YS (1:10)
(37°C-24 saat)



Şekil 3.16: Yıkama sonrası sıvısının (YS) antibakteriyel aktivite deneyinin şematik görünümü

Spektrofotometrede yapılan ölçümün doğruluğunun test edilmesi amacıyla, 10^6 kob/mL bakteri süspansiyonu ile PBS 1:10 oranında karıştırılmış ve PBS içerisinde 10 kat seri sulandırımı (10^{-1} - 10^{-4}) hazırlanmıştır. Sulandırımın ardından tüm seyreltme tüplerinden 100'er µL alınarak NA içeren Petri kutularına, 3'er tekrarlı ekimler yapılmış ve Petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonucunda değerlendirme, koloni sayım yöntemi ile yapılmıştır. 30-300 koloni görülen Petri kutularında elde edilen ortalama koloni sayısı, bu Petri kutularının ait olduğu sulandırım oranı ile çarpılmış ve ml'deki gerçek bakteri sayısı (kob/mL) hesaplanmıştır (Şekil 3.17).



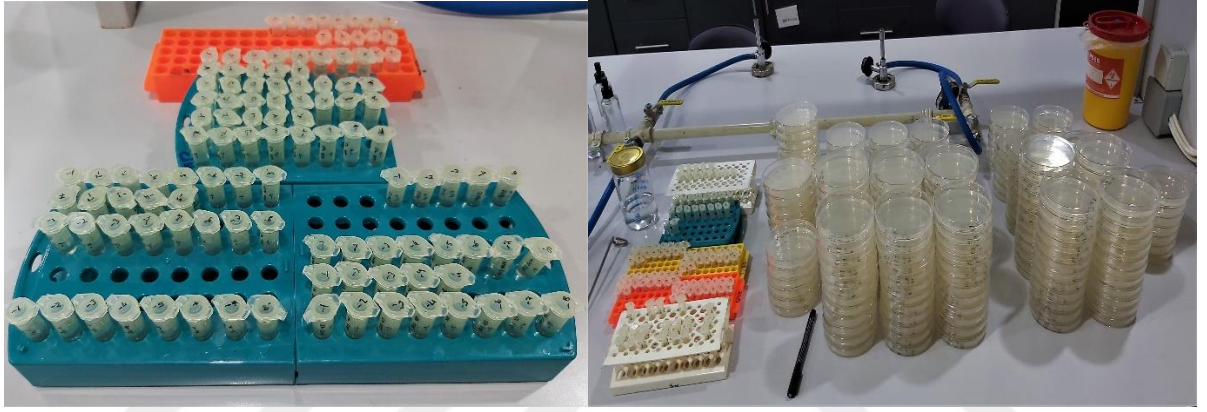
Şekil 3.17: Bakteri-PBS karışımının seri sulandırımları ve her bir sulandırım tüpünden NA'ya yapılmış ekimler

Denenen bakterilerin PYG içerisinde üreme durumlarını saptamak amacıyla, hazırlanmış olan her bir bakteri süspansiyonu (10^6 kob/mL) PYG ile 1:10 oranında karıştırılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrasında bu süspansiyonun PBS içerisinde 10 kat seri sulandırımları (10^{-1} - 10^{-8}) hazırlanmıştır. Sulandırımın ardından tüm seyreltme tüplerinden 100'er µL alınarak NA içeren Petri kutularına, 3'er tekrarlı ekimler yapılmış ve Petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonucunda değerlendirme, koloni sayım yöntemi ile yapılmıştır. 30-300 koloni görülen Petri kutularında elde edilen ortalama koloni sayısı, bu Petri kutularının ait olduğu sulandırım oranı ile çarpılmış ve mL'deki gerçek bakteri sayısı (kob/mL) hesaplanmıştır.

Denenen bakterilerin PBS içerisinde üreme durumlarını saptamak amacıyla, hazırlanmış olan her bir bakteri süspansiyonu (10^6 kob/mL) PBS ile 1:10 oranında karıştırılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrasında bu süspansiyonun PBS içerisinde 10 kat seri sulandırımları (10^{-1} - 10^{-8}) hazırlanmıştır. Sulandırımın ardından tüm seyreltme tüplerinden

100 μ L alınarak NA içeren Petri kutularına, 3'er tekrarlı ekimler yapılmış ve Petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonucunda değerlendirme, koloni sayım yöntemi ile yapılmıştır. 30-300 koloni görülen Petri kutularında elde edilen ortalama koloni sayısı, bu Petri kutularının ait olduğu sulandırım oranı ile çarpılmış ve mL'deki gerçek bakteri sayısı (kob/mL) hesaplanmıştır (Habbal ve diğ., 2011; Holloway ve diğ., 1955; Iqbal ve diğ., 2014; Srinivasan ve diğ., 2001; Tashmukhambetov, 2016).

Tüm bahsedilen deney aşamaları Şekil 3.18'de gösterilmiştir.



Şekil 3.18: Antibakteriyel aktivite deneylerinin genel görüntüsü

3.6 ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.6.1. Non-Nutrient Agar (Biolife, İtalya)

ÖYA suşlarının üretilmesi ve canlandırılması için kullanılan besiyeridir (Axelsson ve diğ., 2009; Beaver ve diğ., 1984; Borin ve diğ., 2013; Jacquier ve diğ., 2013; Zeybek ve diğ., 2010).

Agar	15 g
Distile su	1000 mL

15 g agar tartılarak üzerine 1000 mL olacak şekilde distile su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra otoklavda 121 °C’de 1.2 atmosfer basınçta 20 dk steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından 45 °C’ye soğutulduktan sonra aseptik koşullarda steril Petri kutularına 10-15 mL dökülmüştür.

3.6.2. Nutrient Agar (Oxoid, United Kingdom)

P. aeruginosa suşlarının canlandırılması ve antibakteriyel aktivite deneyleri için kullanılan besiyeridir (Srinivasan ve diğ., 2001; Wahba ve diğ., 1965; Yin ve diğ., 2009).

Agar	15 g
`Lab-Lemco’ powder	1 g
Yeast extract	2 g
Peptone	5 g
Sodium chloride	5 g
Distile su	1000 mL

pH:7.4±0.2

Tüm maddeler tartılarak üzerine 1000 mL olacak şekilde distile su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra otoklavda 121 °C’de 1.2 atmosfer basınçta 20 dk steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından 45 °C’ye soğutulduktan sonra aseptik koşullarda steril Petri kutularına 10-15 mL dökülmüştür.

3.6.3. Pepton Maya Ekstraktı Glukoz (PYG) Besiyeri

ÖYA suşlarının aksenik kültürünün eldesinde kullanılan besiyeridir (Heredero-Bermejo ve diğ., 2013; Iqbal ve diğ., 2014).

Pepton (Oxoid, United Kingdom)	7.5 g
Maya ekstraktı (Oxoid, United Kingdom)	7.5 g
D-(+)-Glikoz (Oxoid, United Kingdom)	15g
Sodyum klorür (NaCl) (Sigma Aldrich, ABD)	0.12 g
Magnezyum Sülfat Heptahidrat (MgSO ₄ . 7H ₂ O) (Sigma Aldrich, ABD)	0.003 g
Kalsiyum Klorid (CaCl ₂) (Sigma Aldrich, ABD)	0.003 g
Sodyum Fosfat Dibazik (Na ₂ HPO ₄) (Sigma Aldrich, ABD)	0.142 g
Potasyum Fosfat Monobazik (KH ₂ PO ₄) (Sigma Aldrich, ABD)	0.136 g
Distile su	1000 mL
pH:7.2±0.2	

Tüm maddeler tartılarak üzerine 1000 mL olacak şekilde distile su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra otoklavda 121 °C’de 1.2 atmosfer basınçta 20 dk steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından oda sıcaklığına getirilmiş ve buzdolabında (+4°C’de) 1 ay muhafaza edilmiştir.

3.6.4. Penisilin Çözeltisi

ÖYA suşlarının aksenik kültürünün eldesinde kullanılan antibiyotik çözeltisidir (Akya ve diğ., 2009; Eroğlu ve diğ., 2015; Schuster 2002).

Penisilin (Sigma Aldrich, ABD)	0.05 g
Distile su	10 mL

0.05 g Penisilin 10 mL distile su içerisinde çözülmüş daha sonra 0.22 µm por çaplı steril filtreden geçirilerek steril bir tüpe aktarılmıştır. Buzdolabında (+4°C’de) 1 ay muhafaza edilmiştir.

3.6.5. Streptomisin Çözeltisi

ÖYA suşlarının aksenik kültürünün eldesinde kullanılan antibiyotik çözeltisidir (Akya ve diğ., 2009; Eroğlu ve diğ., 2015; Schuster 2002).

Streptomisin (Sigma Aldrich, ABD)	0.05 g
Distile su	10 mL

0.05g Streptomisin 10 mL distile su içerisinde çözülmüş, daha sonra 0.22 µm por çaplı steril filtreden geçirilerek steril bir tüpe aktarılmıştır. Buzdolabında (+4°C'de) 1 ay muhafaza edilmiştir.

3.6.6. Antibiyotikli Pepton Maya Ekstraktı Glikoz (PYG) Besiyeri

ÖYA suşlarının aksenik kültürünün eldesinde kullanılan besiyeridir (Heredero-Bermejo ve diğ., 2013; Iqbal ve diğ., 2014).

Streptomisin çözeltisi	500 µl
Penisilin çözeltisi	500 µl
PYG	10 mL

Hazırlanan PYG besiyeri ve antibiyotik çözeltileri aseptik koşullarda steril tüplerde karıştırılmıştır.

3.6.7. Fosfat Tampon Salin (PBS)

Antibakteriyel aktivite deneylerinde seri sulandırım için kullanılan çözeltidir.

Sodyum klorür (NaCl) (Sigma Aldrich, ABD)	7.9 g
Sodyum Fosfat Dibazik (Na ₂ HPO ₄) (Sigma Aldrich, ABD)	2.828 g
Sodyum Fosfat Monobazik (NaH ₂ PO ₄) (Sigma Aldrich, ABD)	0.276 g
Distile su	1000 mL

pH:7.4±0.2

Hazırlanan çözelti 121 °C’de, 1.2 atmosfer basınçta 20 dk steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından oda sıcaklığına getirilmiş ve buzdolabında (+4°C’de) 1 ay muhafaza edilmiştir.

3.6.8. Page’s Amoebal Saline (PAS)

ÖYA suşlarının aksenik kültürlerinin eldesi, ÖYA suşlarının antibiyotikten arındırılması ve ısı ile inaktive edilmiş *E. coli* süspansiyonu hazırlanmasında kullanılan çözeltidir (Akyo ve diğ., 2009; Baron ve Finegold, 1990; Health Protection Agency, 2004; Heredero-Bermejo ve diğ., 2013; Zeybek ve Binay, 2014).

Sodyum Klorür (NaCl) (Sigma Aldrich, ABD)	0.12 g
Magnezyum Sülfat Heptahidrat (MgSO ₄ . 7H ₂ O) (Sigma Aldrich, ABD)	0.003 g
Kalsiyum Klorid (CaCl ₂ .2H ₂ O) (Sigma Aldrich, ABD)	0.003 g
Sodyum Fosfat Dibazik (Na ₂ HPO ₄) (Sigma Aldrich, ABD)	0.142 g
Potasyum Fosfat Monobazik (KH ₂ PO ₄) (Sigma Aldrich, ABD)	0.136 g
Distile su	1000 mL

pH:6.8±0.2

Hazırlanan çözelti 121 °C’de, 1.2 atmosfer basınçta 20 dk steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından oda sıcaklığına getirilmiş ve buzdolabında (+4°C’de) 1 ay muhafaza edilmiştir.

3.6.9. Isı İle İnaktive Edilmiş *E. coli* Süspansiyonu

ÖYA suşlarının üretilmesi ve canlandırılması için kullanılan süspansiyondur (Aksözek, 2001; Burak, 2007; Jacquier ve diğ., 2013; Zeybek ve diğ., 2010)

Nutrient Agar besiyerinde üretilmiş 24 saatlik *E. coli* ATCC 25922 kültürü 1000 mL PAS çözeltisi içerisine yoğun bir bulanıklık elde edilecek şekilde süspanse edilmiş ve 121 °C’de, 1.2 atmosfer basınçta 20 dk steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından oda sıcaklığına getirilmiş ve buzdolabında (+4°C’de) 1 ay muhafaza edilmiştir.

3.6.10. Gliserinli Triptik Soy Broth (GTSB)

P. aeruginosa suşlarının -86 °C’de saklanması için kullanılan besiyeridir.

Gliserin	600 mL
Triptik Soy Broth	30 g
Distile su	400 mL

Hazırlanan besiyeri 121 °C’de, 1.2 atmosfer basınçta 20 dk steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından oda sıcaklığına getirilmiş ve buzdolabında (+4°C’de) 1 ay muhafaza edilmiştir.

3.6.11. Freezing Medium (FM)

ÖYA suşlarının -86 °C’de saklanması için kullanılan besiyeridir.

Dimetilsülfoksit (DMSO)	120 mL
Fetal Bovin Serum (FBS)	200 mL
Pepton Maya ekstraktı Glikoz (PYG) Besiyeri	680 mL

DMSO ve PYG belirtilen miktarlarda karıştırılmış ve 121 °C’de, 1.2 atmosfer basınçta 20 dk steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından oda sıcaklığına getirilmiş ve içerisine belirtilen miktarda FBS aseptik koşullarda eklenmiştir. Buzdolabında (+4°C’de) 1 ay muhafaza edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. AKSENİK ÖYA KÜLTÜRLERİNDEKİ AMİP HÜCRE SAYILARI

T-25 doku kültürü flasklarındaki PYG’de tek tabaka halinde üretilen aksenik ÖYA kültürlerinde Thoma lamı ve tripan mavisi kullanılarak saptanan trofozoit şeklindeki amip hücrelerinin sayıları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Aksenik ÖYA kültürlerindeki hücre sayıları

ÖYA Suşu (Kod)	Hücre/mL
<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	8.6×10^5
A10	9.1×10^5
A13	8.4×10^5
A14	7.1×10^5
U.GÖL	4.5×10^5

4.2 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARININ API TEST SONUÇLARI

Antibakteriyel aktivite deneylerinde kullanılan *P. aeruginosa* suşlarının API test sonuçları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: *P. aeruginosa* suşlarının API test sonuçları

4.3 ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE DENEYLERİ

ÖYA suşlarının (*A. castellanii* ATCC 50373, A10, A13, A14, U.GÖL) hücresiz sıvılarının (ACM) denen en *P. aeruginosa* suşları (*P. aeruginosa* ATCC 27853, PA2, PA3, PA4, PA5) üzerindeki antibakteriyel aktivitelerinin olup olmadığı Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarının (ACM) *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkileri

Denenen mikroorganizmalar		Bakteri Sayısı (kob/mL)						İnhibisyon (%)		
<i>P.aeruginosa</i> suşları (kod)	ÖYA suşları (kod)	PBS (Sayım)	PBS (İnkübas-yon)	PYG	ACM	YÖ	YS	Aİ	Tİ	Bİ
PA ATCC 27853	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	2.1x10 ⁵	4.36x10 ⁵	2.54x10 ⁹	1.54x10 ⁹	0	2.12x10 ⁹	16.5	39.3	22.8
	A10	2.1x10 ⁵	4.36x10 ⁵	2.54x10 ⁹	2.13x10 ⁹	0	2.68x10 ⁹	-	16.1	16.1
	A13	2.1x10 ⁵	4.36x10 ⁵	2.54x10 ⁹	1.12x10 ⁹	0	2.39x10 ⁹	5.9	55.9	50
	A14	2.1x10 ⁵	4.36x10 ⁵	2.54x10 ⁹	2.13x10 ⁹	0	2.12x10 ⁹	16.5	16.1	-
	U.GÖL	2.1x10 ⁵	4.36x10 ⁵	2.54x10 ⁹	0.88x10 ⁹	0	2.49x10 ⁹	2	65.3	63.3
PA 2	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	1.74x10 ⁵	1.73x10 ⁵	1.41x10 ⁹	2.67x10 ⁸	0	0.43x10 ⁹	69.5	81	11.5
	A10	1.74x10 ⁵	1.73x10 ⁵	1.41x10 ⁹	0.96x10 ⁸	0	0.65x10 ⁹	53.9	93.1	39.2
	A13	1.74x10 ⁵	1.73x10 ⁵	1.41x10 ⁹	1.17x10 ⁵	0	1.07x10 ⁹	24.1	99.9	75.8
	A14	1.74x10 ⁵	1.73x10 ⁵	1.41x10 ⁹	2.16x10 ⁸	0	0.62x10 ⁹	56	84.6	28.6
	U.GÖL	1.74x10 ⁵	1.73x10 ⁵	1.41x10 ⁹	2.35x10 ⁸	0	0.71x10 ⁹	49.6	83.3	33.7
PA 3	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	1.42x10 ⁵	0.81x10 ⁶	2.34x10 ⁹	1.32x10 ⁹	0	1.99x10 ⁹	15	43.6	28.6
	A10	1.42x10 ⁵	0.81x10 ⁶	2.34x10 ⁹	1.49x10 ⁹	0	1.58x10 ⁹	32.4	36.3	3.9
	A13	1.42x10 ⁵	0.81x10 ⁶	2.34x10 ⁹	0.66x10 ⁹	0	1.70x10 ⁹	27.4	71.8	44.4
	A14	1.42x10 ⁵	0.81x10 ⁶	2.34x10 ⁹	2.77x10 ⁹	0	1.88x10 ⁹	19.6	18.4	-
	U.GÖL	1.42x10 ⁵	0.81x10 ⁶	2.34x10 ⁹	1.07x10 ⁹	0	1.81x10 ⁹	22.6	54.3	31.7

Tablo 4.2 (devam): ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarının (ACM) *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkileri

Denenen mikroorganizmalar		Bakteri Sayısı (kob/mL)						İnhibisyon (%)		
<i>P.aeruginosa</i> suşları (kod)	ÖYA suşları (kod)	PBS (Sayım)	PBS (İnkübasyon)	PYG	ACM	YÖ	YS	Aİ	Tİ	Bİ
PA 4	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	0.57x10 ⁵	0.97x10 ⁷	3.62x10 ⁹	0.95x10 ⁹	0	2.62x10 ⁹	27.6	73.7	46.1
	A10	0.57x10 ⁵	0.97x10 ⁷	3.62x10 ⁹	3.32x10 ⁸	0	2.78x10 ⁹	23.2	90.9	67.7
	A13	0.57x10 ⁵	0.97x10 ⁷	3.62x10 ⁹	1.89x10 ⁵	0	2.78x10 ⁹	23.2	99.9	76.7
	A14	0.57x10 ⁵	0.97x10 ⁷	3.62x10 ⁹	0.65x10 ⁹	0	2.61x10 ⁹	27.9	82	54.1
	U.GÖL	0.57x10 ⁵	0.97x10 ⁷	3.62x10 ⁹	0.68x10 ⁹	0	2.69x10 ⁹	25.7	81.2	55.5
PA 5	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	1.28x10 ⁵	1.36x10 ⁶	2.93x10 ⁹	2.48x10 ⁸	0	3.31x10 ⁹	-	91.5	91.5
	A10	1.28x10 ⁵	1.36x10 ⁶	2.93x10 ⁹	1.67x10 ⁵	0	2.22x10 ⁹	24.2	99.9	75.7
	A13	1.28x10 ⁵	1.36x10 ⁶	2.93x10 ⁹	0	0	2.23x10 ⁹	23.9	100	76.1
	A14	1.28x10 ⁵	1.36x10 ⁶	2.93x10 ⁹	1.61x10 ⁸	0	2.78x10 ⁹	5.1	94.5	89.4
	U.GÖL	1.28x10 ⁵	1.36x10 ⁶	2.93x10 ⁹	0.61x10 ⁸	0	2.42x10 ⁹	17.4	97.9	80.5

ÖYA: Özgür yaşayan amipler

Aİ: Antibiyotik İnhibisyonu

Tİ: Toplam İnhibisyon

Bİ: Bakteri İnhibisyonu

PBS (Sayım): Spektrofotometrede yoğunluğu ölçülen PBS'deki bakteri süspansiyonlarının agardaki bakteri sayıları- sayım kontrol deneyi

PBS (İnkübasyon): PBS'deki bakteri süspansiyonlarının 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında saptanan bakteri sayıları

PYG: PYG'deki bakteri süspansiyonlarının 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında saptanan bakteri sayıları

YÖ: Antibiyotik yikanmasından önce alınan sıvının 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında saptanan bakteri sayıları

YS: Antibiyotik yikanmasından sonra alınan sıvının 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında saptanan bakteri sayıları

ACM: ÖYA'ların aksenik kültürlerinden elde edilen hücresiz sıvılar

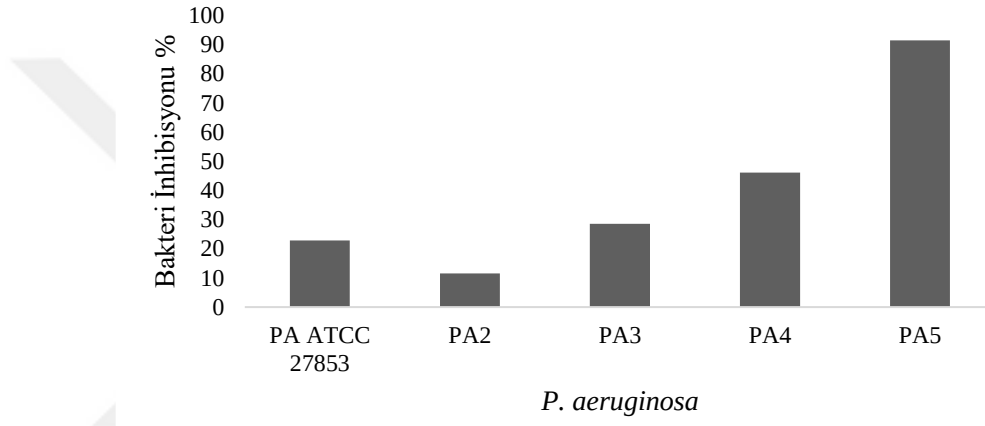
- : İnhibisyon etki yok.

Sonuçların değerlendirilmesinde aşağıdaki formüller kullanılmıştır (Kaur ve diğ., 2012; Khalilzadeh ve diğ., 2010);

- Toplam inhibisyon ($TI\%$) = $(a-b / a) \times 100$
 - a: PYG'de 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası saptanan bakteri sayısı (kob/mL)
 - b: ACM'de 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası saptanan bakteri sayısı (kob/mL)
- Antibiyotik inhibisyonu ($AI\%$) = $(a-c / a) \times 100$
 - a: PYG'de 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası saptanan bakteri sayısı (kob/mL)
 - c: YS'de 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası saptanan bakteri sayısı (kob/mL)
- Bakteri inhibisyonu ($BI\%$) = Toplam inhibisyon ($TI\%$) - Antibiyotik inhibisyonu ($AI\%$)

4.3.1 *A. castellanii* ATCC 50373 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM), *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi

A. castellanii ATCC 50373 suşuna ait hücresiz sıvı, denenen *P. aeruginosa* suşlarının (*P. aeruginosa* ATCC 27853, PA2, PA3, PA4, PA5) üremesi üzerine sırasıyla %22.8; %11.5; %28.6; %46.1 ve %91.5 oranında inhibe edici etki göstermiştir (Şekil 4.2, Tablo 4.3). Bu sonuçlara göre *A. castellanii* ATCC 50373 suşunun hücresiz sıvısı en fazla PA5 suşunda (%91.5), en az PA2 suşunda (%11.5) antibakteriyel etki göstermiştir.



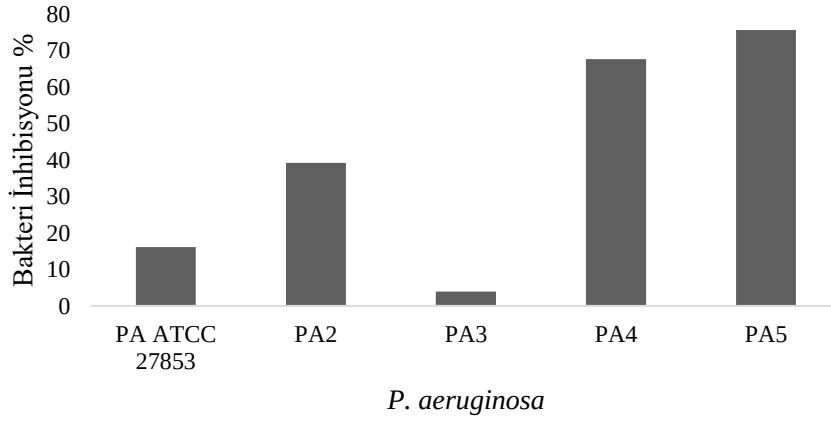
Şekil 4.2: *A. castellanii* ATCC 50373 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi

Tablo 4.3: *A. castellanii* ATCC 50373 suşuna ait hücresiz sıvının denenen *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre)

<i>P. aeruginosa</i> suşları (kod)	Bakteri inhibisyonu (%)
PA 5	91.5
PA 4	46.1
PA 3	28.6
PA ATCC 27853	22.8
PA 2	11.5

4.3.2 A10 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM), *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi

A10 suşuna ait hücresiz sıvı, denenen *P. aeruginosa* suşlarının (ATTC 27853, PA2, PA3, PA4, PA5) üremesi üzerine sırasıyla %16.1; %39.2; %3.9; %67.7 ve %75.7 oranında inhibe edici etki göstermiştir (Şekil 4.3, Tablo 4.4). Bu sonuçlara göre A10 suşunun hücresiz sıvısı en fazla PA5 suşunda (%75.7), en az PA3 suşunda (%3.9) antibakteriyel aktivite göstermiştir.



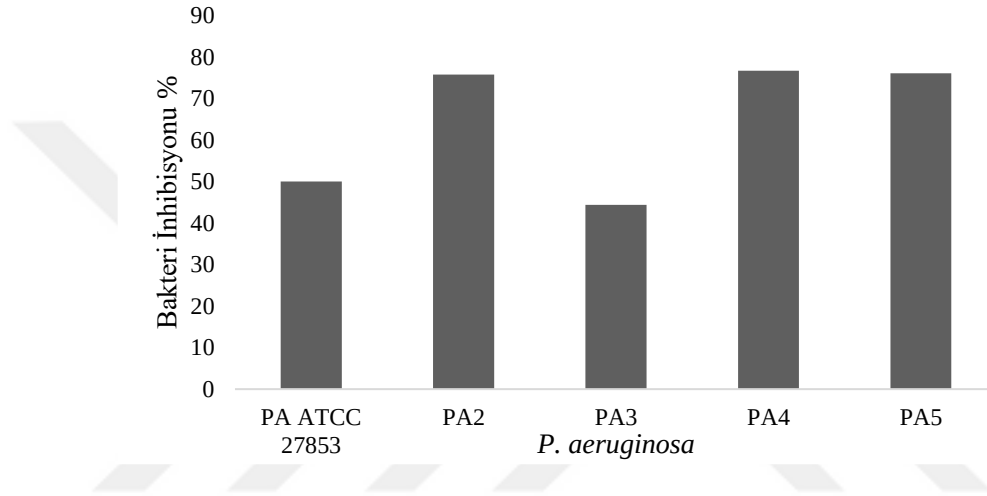
Şekil 4.3: A10 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi

Tablo 4.4: A10 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre)

<i>P. aeruginosa</i> suşları (kod)	Bakteri inhibisyonu (%)
PA 5	75.7
PA 4	67.7
PA 2	39.2
PA ATCC 27853	16.1
PA 3	3.9

4.3.3 A13 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM), *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi

A13 suşuna ait hücresiz sıvı, denenen *P. aeruginosa* suşlarının (ATTC 27853, PA2, PA3, PA4, PA5) üremesi üzerine sırasıyla %50; %75.8; %44.4; %76.7 ve %76.1 oranında inhibe edici etki göstermiştir. (Şekil 4.4, Tablo 4.5). Bu sonuçlara göre A13 suşunun hücresiz sıvısı en fazla PA4 suşunda (%76.7), en az PA3 suşunda (%44.4) antibakteriyel aktivite göstermiştir.



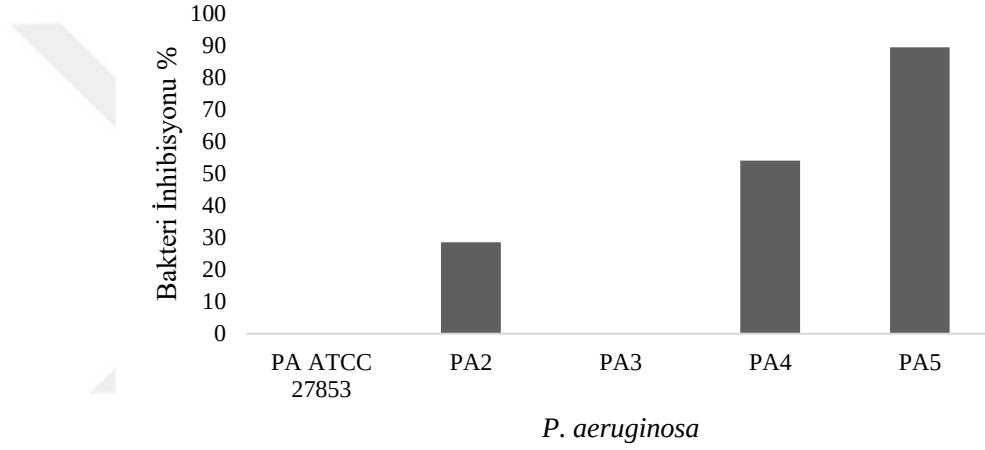
Şekil 4.4: A13 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi

Tablo 4.5: A13 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre)

<i>P. aeruginosa</i> suşları (kod)	Bakteri inhibisyonu (%)
PA 4	76.7
PA 5	76.1
PA 2	75.8
PA ATCC 27853	50
PA 3	44.4

4.3.4 A14 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi

A14 suşuna ait hücresiz sıvı, denenen *P. aeruginosa* suşlarının üç tanesinin (PA2, PA4, PA5) üremesi üzerine sırasıyla %28.6; %54.1 ve %89.4 oranında inhibe edici etki gösterirken denenen diğer iki *P. aeruginosa* suşunun (PA ATCC 27853, PA3) üremesi üzerine inhibe edici etki göstermemiştir (Şekil 4.5, Tablo 4.6). Bu sonuçlara göre A14 suşunun hücresiz sıvısı en fazla PA5 suşunda (%89.4) antibakteriyel aktivite gösterirken, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve PA3 suşlarında antibakteriyel aktivite göstermemiştir.



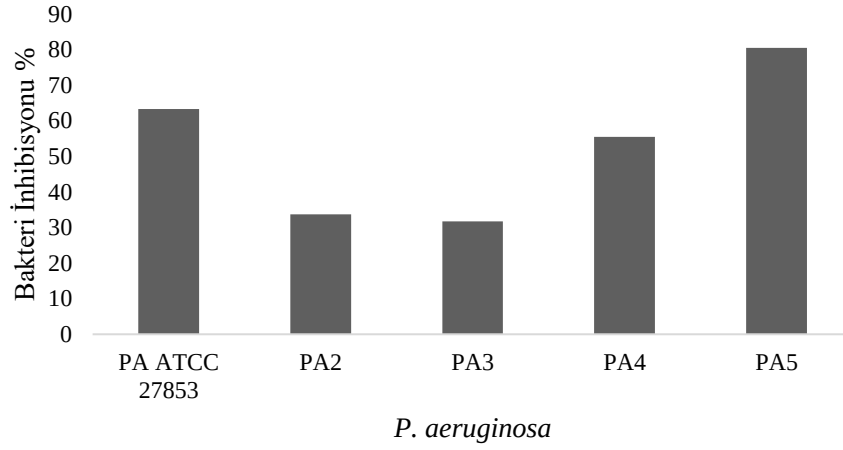
Şekil 4.5: A14 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi

Tablo 4.6: A14 suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre)

<i>P. aeruginosa</i> suşları (kod)	Bakteri inhibisyonu (%)
PA 5	89.4
PA 4	54.1
PA 2	28.6
PA 3	-
PA ATCC 27853	-

4.3.5 U.GÖL suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi

U.GÖL suşuna ait hücresiz sıvı, denenen *P. aeruginosa* suşlarının (ATTC 27853, PA2, PA3, PA4, PA5) üremesi üzerine sırasıyla %63.3; %33.7; %31.7; %55.5; %80.5 oranında inhibe edici etki göstermiştir (Tablo 4.7, Şekil 4.6). Bu sonuçlara göre U.GÖL suşunun hücresiz sıvısı en fazla PA5 suşunda (%80.5), en az PA3 suşunda (%31.7) antibakteriyel aktivite göstermiştir.



Şekil 4.6: U.GÖL suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi

Tablo 4.7: U.GÖL suşuna ait hücresiz sıvının (ACM) denenen *P. aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre)

<i>P. aeruginosa</i> suşları (kod)	Bakteri inhibisyonu (%)
PA 5	80.5
PA ATCC 27853	63.3
PA 4	55.5
PA 2	33.7
PA 3	31.7

Denenen beş ÖYA suşunun hücresiz sıvıları *P. aeruginosa* suşları üzerinde farklı oranlarda inhibe edici etki göstermiştir. Dört ÖYA'ya (*A. castellanii* ATCC 50373, A10, A13, U.GÖL) ait hücresiz sıvılar tüm *P. aeruginosa* suşları üzerinde inhibe edici etki (min.=%3.9; max.=%91.5) göstermiştir. Öte yandan A14 suşuna ait hücresiz sıvının, üç *P. aeruginosa* suşu (PA2, PA4, PA5) üzerinde inhibe edici etki göstermesine rağmen (min.=%28.6; max.=%89.4), *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve PA3 suşu üzerinde inhibe edici etki göstermediği saptanmıştır. En yüksek antibakteriyel etkiyi (%91.5), *A. castellanii* ATCC 50373 suşuna ait hücresiz sıvının (PA5 suşuna karşı) gösterdiği saptanmıştır. Suşlar arasında farklılık gösteren inhibisyonun en yüksekten en düşüğe göre sıralaması Tablo 4.8' de görüldüğü gibidir.

Tablo 4.8: Bakteri inhibisyonunun en yüksekten en düşüğe göre sıralaması

<i>P. aeruginosa</i> Suşları (kod)	ÖYA Suşları (kod)	Bakteri İnhibisyonu (%)
PA 5	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	91.5
PA 5	A14	89.4
PA 5	U.GÖL	80.5
PA 4	A13	76.7
PA 5	A13	76.1
PA 2	A13	75.8
PA 5	A10	75.7
PA 4	A10	67.7
PA ATCC 27853	U.GÖL	63.3
PA 4	U.GÖL	55.5

Tablo 4.8 (devam): Bakteri inhibisyonunun en yüksekten en düşüğe göre sıralaması

PA 4	A14	54.1
PA ATCC 27853	A13	50
PA 4	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	46.1
PA 3	A13	44.4
PA 2	A10	39.2
PA 2	U.GÖL	33.7
PA 3	U.GÖL	31.7
PA 3	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	28.6
PA 2	A14	28.6
PA ATCC 27853	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	22.8
PA ATCC 27853	A10	16.1
PA 2	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	11.5
PA 3	A10	3.9
PA ATCC 27853	A14	-
PA 3	A14	-

- : İnhibisyon etkisi yok

Denenen beş ÖYA suşunun hücresiz sıvılarının *P. aeruginosa* suşları üzerinde gösterdikleri ortalama inhibe edici etki değerleri Tablo 4.9’da gösterilmiştir. En yüksek ortalama inhibe edici etkiyi A13 suşu gösterirken (%64.6), en düşük ortalama inhibe edici etkiyi A14 suşu göstermiştir (%34.4). Denenen dört çevresel ÖYA izolatından üçünün, *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373’e göre ortalama olarak daha yüksek inhibe edici etki etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 4.9: ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarının *P. aeruginosa* suşlarına karşı ortalama inhibe edici etkileri

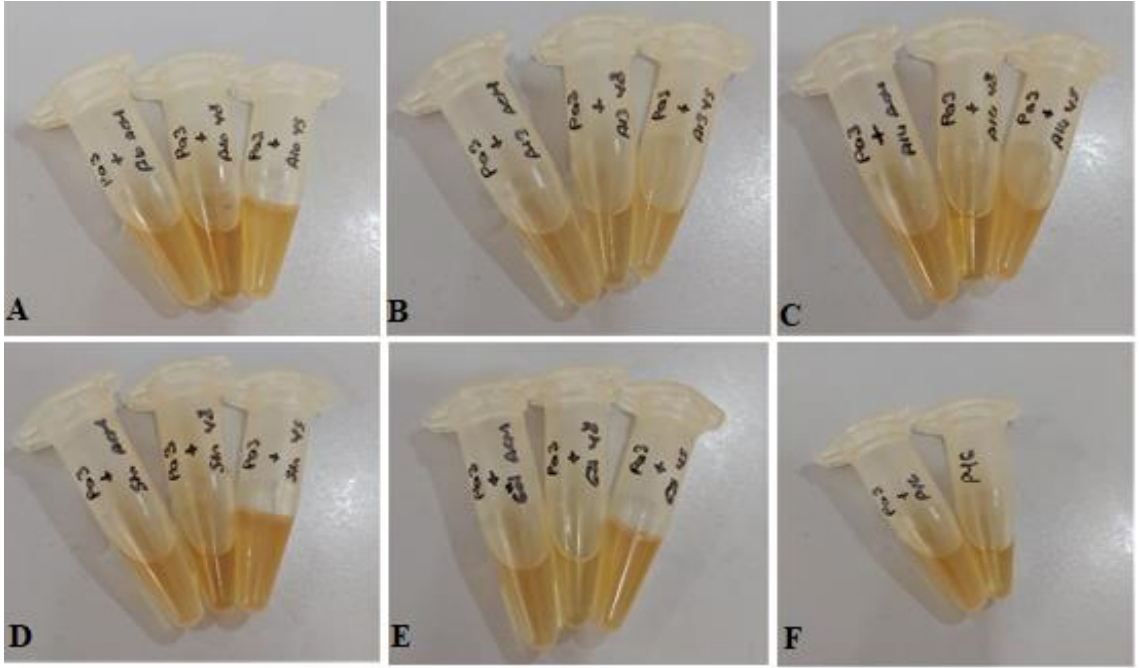
ÖYA Suşları (Kod)	Ortalama Bakteri İnhibisyonu (%)
A13	64.6
U.GÖL	52.9
A10	40.5
<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	40.1
A14	34.4

ÖYA’lardan elde edilen hücresiz sıvılara karşı en duyarlı *P. aeruginosa* suşunun PA5 olduğu (ort: %82.64), bunu sırasıyla PA4, PA2, PA ATCC 27853 ve PA3 ün izlediği saptanmıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: *P. aeruginosa* suşlarının ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarına karşı ortalama duyarlılıkları

<i>P.aeruginosa</i> Suşları (Kod)	Ortalama Duyarlılık (%)
PA 5	82.64
PA 4	60.02
PA 2	37.76
PA ATCC 27853	30.44
PA 3	21.72

Bu verilere göre, denenen ÖYA hücresiz sıvılar tarafından ortalama olarak en çok inhibe edilen suşun PA5 (%82.64), en az inhibe edilen suşun PA3 (%21.72) olduğu tespit edilmiştir ve bu iki *P. aeruginosa* suşuna ait deney aşamasındaki görünimleri Şekil 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10’da gösterilmiştir. Ayrıca *P.aeruginosa*’nın klinik izolatlarından üç tanesinin (PA5, PA4, PA2), *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşuna göre ortalama olarak daha yüksek oranda inhibe edildiği saptanmıştır.



Şekil 4.7: PA3 suşunun, her bir ÖYA suşuna ait (A10, A13, A14, *A. castellanii* ATCC 50373, U.GÖL) ACM, YÖ, YS ve PYG ile birlikte 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra deney tüplerindeki görünimleri

A) A10 (ACM) + PA3, A10 (YÖ) + PA3, A10 (YS) + PA3

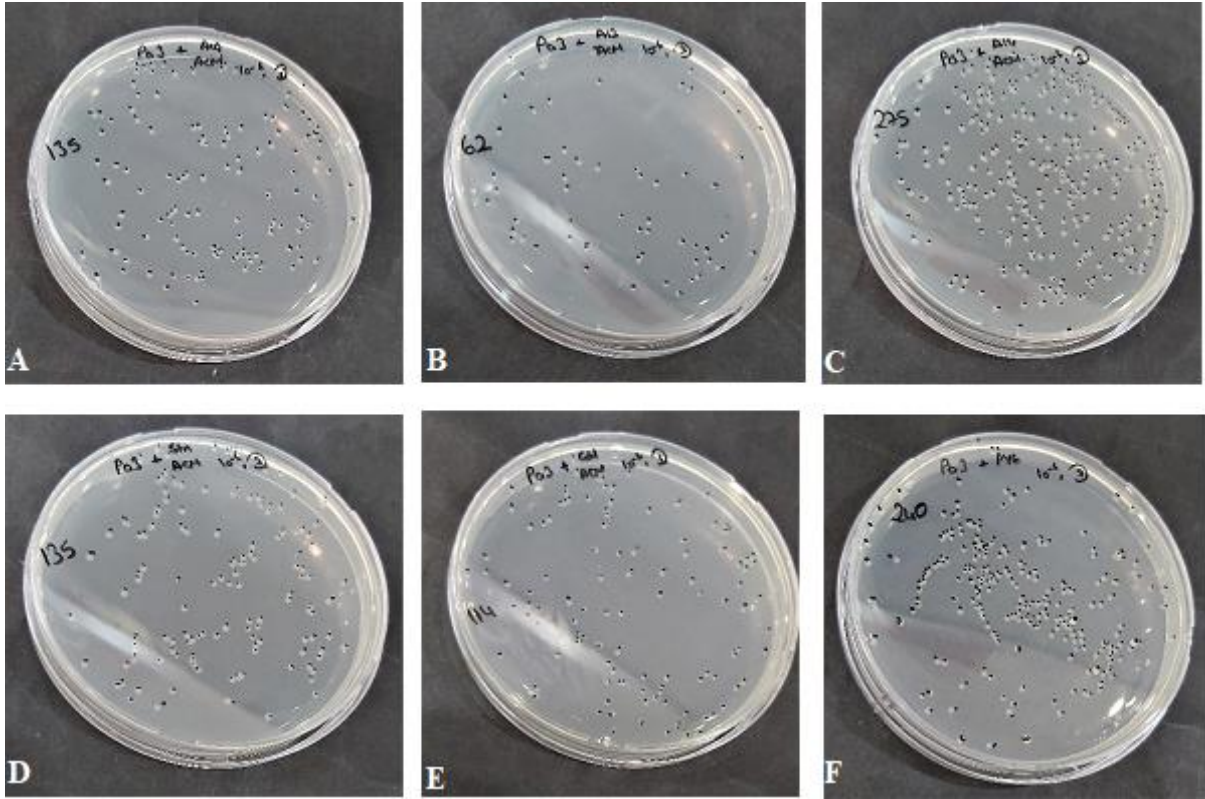
B) A13 (ACM) + PA3, A13 (YÖ) + PA3, A13 (YS) + PA3

C) A14 (ACM) + PA3, A14 (YÖ) + PA3, A14 (YS) + PA3

D) *A. castellanii* ATCC 50373 (ACM) + PA3, *A. castellanii* ATCC 50373 (YÖ) + PA3, *A. castellanii* ATCC 50373 (YS) + PA3

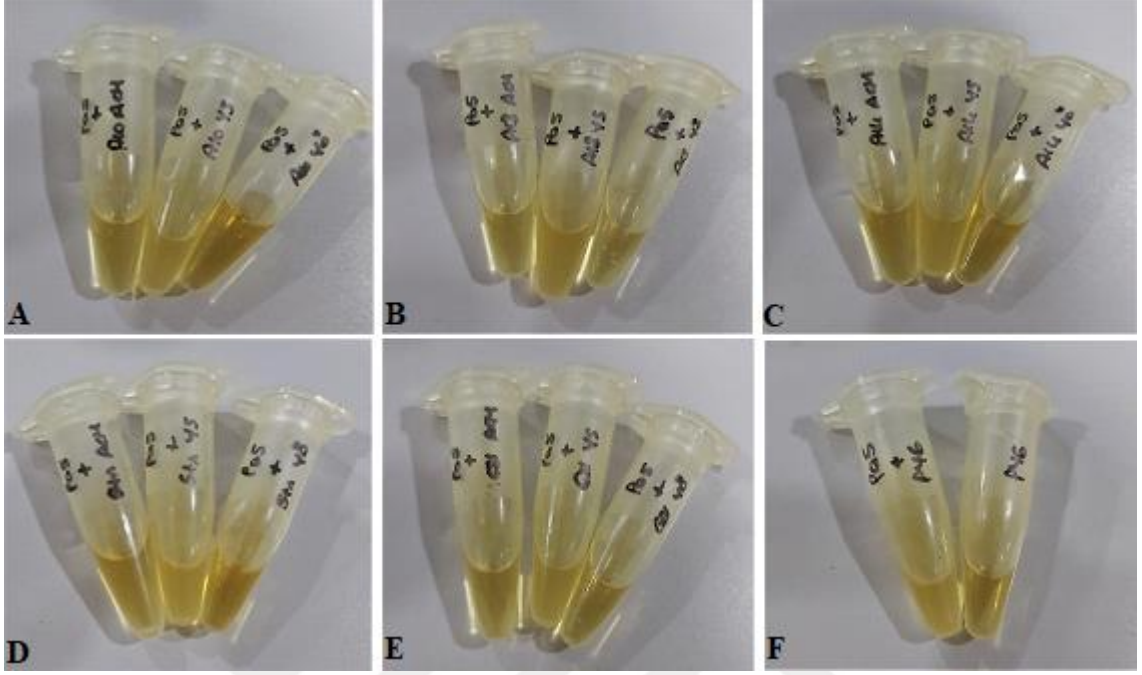
E) U.GÖL (ACM) + PA3, U.GÖL (YÖ) + PA3, U.GÖL (YS) + PA3

F) PYG + PA3, PYG



Şekil 4.8: PA3 suşunun, her bir ÖYA suşuna ait (A10, A13, A14, *A. castellanii* ATCC 50373, U.GÖL) ACM, YÖ, YS ve PYG ile birlikte 37 °C’de 24 saat inkübasyonunu takiben yapılan ekimlerin inkübasyon sonrasında Petri kutusundaki görünümleri.

- A) A10 (ACM) + PA3 (10^{-6} dilüsyon)
- B) A13 (ACM) + PA3 (10^{-6} dilüsyon)
- C) A14 (ACM) + PA3 (10^{-6} dilüsyon)
- D) *A. castellanii* ATCC 50373 (ACM) + PA3 (10^{-6} dilüsyon)
- E) U.GÖL (ACM) + PA3 (10^{-6} dilüsyon)
- F) PYG + PA3 (10^{-6} dilüsyon)



Şekil 4.9: PA5 suşunun, her bir ÖYA suşuna ait (A10, A13, A14, *A. castellanii* ATCC 50373, U.GÖL) ACM, YÖ, YS ve PYG ile birlikte 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra deney tüplerindeki görünüşleri

A) A10 (ACM) + PA5, A10 (YÖ) + PA5, A10 (YS) + PA5

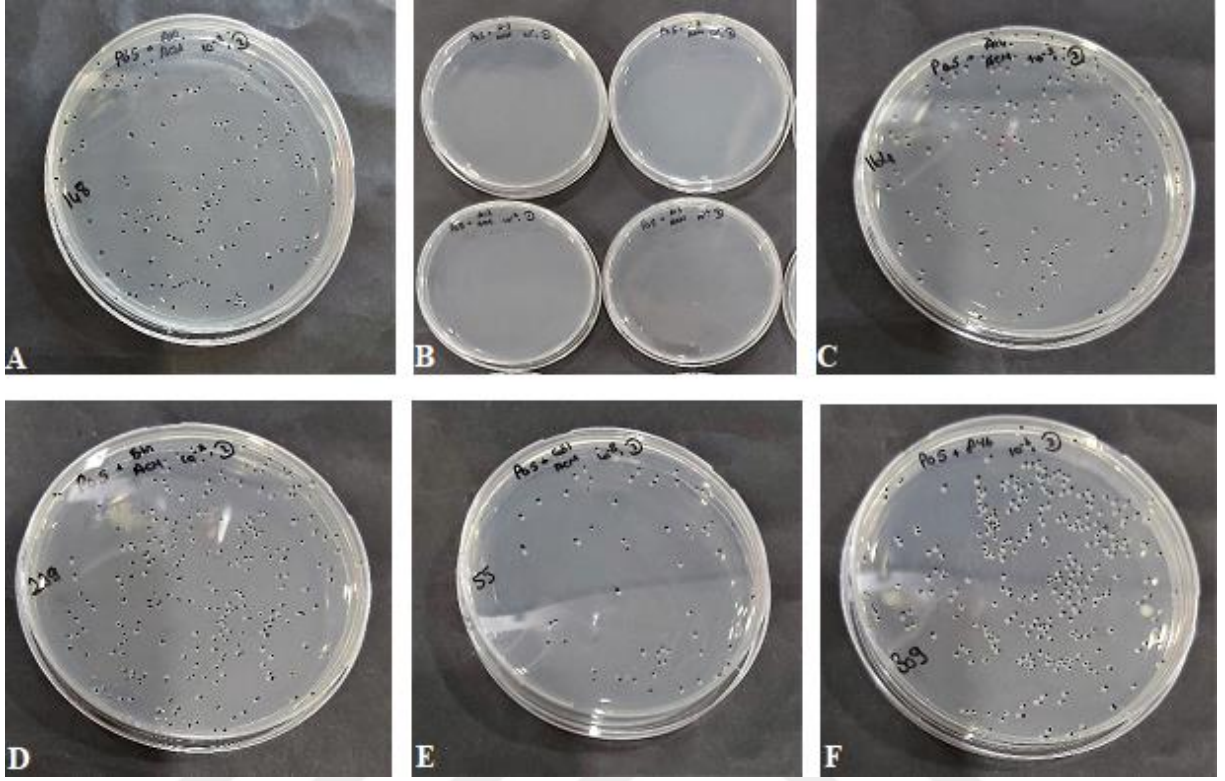
B) A13 (ACM) + PA5, A13 (YÖ) + PA5, A13 (YS) + PA5

C) A14 (ACM) + PA5, A14 (YÖ) + PA5, A14 (YS) + PA5

D) *A. castellanii* ATCC 50373 (ACM) + PA5, *A. castellanii* ATCC 50373 (YÖ) + PA5, *A. castellanii* ATCC 50373 (YS) + PA5

E) U.GÖL (ACM) + PA5, U.GÖL (YÖ) + PA5, U.GÖL (YS) + PA5

F) PYG + PA5, PYG



Şekil 4.10: PA5 suşunun, her bir ÖYA suşuna ait (A10, A13, A14, *A. castellanii* ATCC 50373, U.GÖL) ACM, YÖ, YS ve PYG ile birlikte 37 °C'de 24 saat inkübasyonunu takiben yapılan ekimlerin inkübasyon sonrasında Petri kutusundaki görünüşleri.

- A)** A10 (ACM) + PA5 (10^{-2} dilüsyon)
- B)** A13 (ACM) + PA5 (10^{-1} ve 10^{-2} dilüsyon)
- C)** A14 (ACM) + PA5 (10^{-5} dilüsyon)
- D)** *A. castellanii* ATCC 50373 (ACM) + PA5 (10^{-5} dilüsyon)
- E)** U.GÖL (ACM) + PA5 (10^{-5} dilüsyon)
- F)** PYG + PA5 (10^{-6} dilüsyon)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

ÖYA, doğada ve çeşitli insan yapımı su sistemlerinde diğer mikroorganizmalar ile bir arada yaşamakta, insanlarda ve hayvanlarda amibik keratit, granülamatoz amibik ensefalit, primer amibik meningoensafalit, kütanöz yaralar gibi ölümcül de olabilen çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır (Bakardjiev ve diğ., 2003; Barete ve diğ., 2007; Horn ve Wagner, 2004; Molmeret ve diğ., 2005; Özçelik ve diğ., 2012; Pritziker ve diğ., 2004; Riestra-Castaneda ve diğ., 1997; Saygı ve Polat, 2003; Schuster, 2002; Shoff ve diğ., 2008; Siddiqui ve Khan, 2012; Thomas ve diğ., 2006; Trabelsi ve diğ., 2010; Trabelsi ve diğ., 2012; Ugonabo ve Gugnani, 1989; Visvesvara ve diğ., 2007; Üstüntürk ve Zeybek, 2014; Zeybek ve Türkmen, 2020). Diğer mikroorganizmalarla bir arada yaşamaları esnasında özellikle bakteriler ile olan ilişkilerinin çeşitlilik gösterdiği, bu sayede ekosistemde önemli rol oynadıkları da anlaşılmıştır (Akya ve diğ., 2009; Anacarso ve diğ., 2010; Axelsson ve diğ., 2009; Barker ve diğ., 1995; Borin ve diğ., 2013; Brown ve Barker, 1999; Calvo ve diğ., 2013; Cervero-Aragó ve diğ., 2015; Chekabab ve diğ., 2012; Delafont ve diğ., 2016; Dey ve diğ., 2019; Greub ve Raoult, 2004; Horn ve Wagner, 2004; Khan ve Siddiqui, 2014; Lamothe ve diğ., 2004; Michel ve diğ., 1995; Molmeret ve diğ., 2005; Rowbotham, 1980; Schuster, 2002; Siddiqui ve diğ., 2017; Steinert ve diğ., 1998; Strassman ve Shu, 2017; Şenler ve Yıldız, 2010; Thomas ve diğ., 2008; Trabelsi ve diğ., 2012; Wang ve diğ., 2014; Weitere ve diğ., 2005; Winiecka-Krusnell ve Linder, 2001; Winiecka-Krusnell ve diğ., 2002; Zeybek ve Binay, 2014,).

Bazı bakterilerin ÖYA hücresi içerisine alınarak, onların temel besin kaynağını oluşturduğu bilinmekte olup bu özellikleri ÖYA'nın laboratuvarında üretilmelerinde de kullanılmaktadır (Axelsson ve diğ., 2009; Borin ve diğ., 2013; Health Protection Agency, 2004; Şenler ve Yıldız, 2010). Chekabab ve diğ. (2012), ÖYA'nın sıklıkla besin kaynağı olarak kullandığı *E.coli* için bir rezervuar görevi de gördüğünü ve bakterinin bu sayede virulansını arttırdığını da göstermiştir. *E. coli* dışındaki diğer bazı bakterilerin de ÖYA hücrelerinde yaşamlarını sürdürebildiği ve çoğalabildiği, bu sayede antibiyotikler, dezenfektanlar, UV ışını, yüksek ısı, pH değişimi gibi kötü çevre şartlarından kendilerini koruyabildikleri, patojenitelerini arttırdıkları ve hatta ÖYA hücresi içerisinde sayıca arttıktan sonra onları lizise uğratarak dış ortama yayıldıklarını gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Brown ve Barker, 1999; Delafont ve diğ., 2016; Horn ve Wagner, 2004; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Molmeret ve diğ., 2005; Winiecka-Krusnell ve Linder, 2001).

ÖYA ile insanlarda potansiyel patojen ve antibiyotiklere direnç kazanmış olan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin (Cross ve diğ., 1983; Güney ve diğ., 2011; Kandi, 2010; Kireççi ve Sevinç, 2008; Orucu ve Geyik, 2008; Özdemir ve diğ., 2009; Tuncer ve Akova, 1996; Tunçoğlu ve diğ., 2009; Uzun ve diğ., 2012; Yücel ve diğ., 2006) ilişkisi araştırıldığında, bu bakterilerin ÖYA için besin kaynağı olmasının yanı sıra, *Acanthamoeba* cinsi ÖYA'yı enfekte ettiğini ve trofozoitlerinin içerisinde çoğaldığını gösteren pek çok çalışmanın olduğu görülmektedir. Bu çalışmalar amiplerin su sistemlerinde *Pseudomonas*'ın dağılımından sorumlu olduğunu, hücre içi ortamın bu bakterileri klor dezenfeksiyonuna ve çeşitli antibakteriyallere karşı koruduğunu, kontakt lenslerden izole edilmiş amip hücrelerinin içerisinde *P. aeruginosa* bakterisinin saptanması nedeniyle amiplere karşı dirençli olduğunu, hatta canlı fakat kültürü yapılamayan *P. aeruginosa*'nın *A. polyphaga* içerisinde 2 saat gibi kısa bir sürede aktif forma geçtiğini göstermiştir (Brown ve Barker, 1999; Calvo ve diğ., 2013; Dey ve diğ., 2019; Greub ve Raoult, 2004; Michel ve diğ., 1995; Weitere ve diğ., 2005; Zeybek ve Binay, 2014).

Yukarıda belirtildiği gibi yıllardır yapılan pek çok çalışmadan, ÖYA ve bakteriler arasındaki ilişkinin çoğunlukla bakterilerin çoğalmasına katkı sağlayacak ve ÖYA'nın lizisine sebep olacak şekilde sonuçlandığı anlaşılmaktadır. Buna rağmen ÖYA'nın bu bakteriler ile aynı ortamı paylaşırken nasıl hayatta kaldığı, önemli bir sorudur. Bu sorunun cevabına katkı sağlayabilmek, bu tez çalışmasının da çıkış noktası olan “ÖYA, antibakteriyel etkili maddelere (bu tez çalışmasında *P. aeruginosa*'ya etkili antibakteriyel maddelere) sahip midir?” sorusunu cevaplamak ile mümkün olabilir. Bu sorunun “evet” olarak cevaplanması ile aynı zamanda yeni antibakteriyel maddelerin keşfi çalışmalarına da katkı sağlanmış olacaktır. Bugüne kadar bakteriler, mantarlar, bitkiler ve böceklerden elde edilmiş olan pek çok antibakteriyel maddenin (antimikrobiyal peptidler, bakteriyosinler, antibiyotikler) varlığı bilinmektedir (Artun ve diğ., 2016; Bastos ve diğ., 2010; Bavin ve diğ., 1952; Brantner ve Grein, 1994; Dorman, 2000; Döşler, 2017; Faleiro ve diğ., 1997; Fleming, 1929; Hili ve diğ., 1997; Klančnik ve diğ., 2010; Lee ve diğ., 2012; Lopez ve diğ., 2007; Mah ve diğ., 2001; Martindale, 1910; Mostafa ve diğ., 2018; Nanasombat ve diğ., 2018; Nascimento ve diğ., 2000; Prashanth ve diğ., 2001; Rossi ve diğ., 2008; Sanchez ve diğ., 1988; Schatz ve diğ., 1944; Şimşek ve diğ., 2002). Bu canlılara ilaveten ÖYA'nın da antibakteriyel maddelere sahip olup olmadığı ile ilgili olarak yurt dışında, son yıllarda az sayıda ve çok küçük kapsamlı çalışmalar başlatılmıştır (Iqbal ve diğ., 2014; Tashmukhambetov, 2016). Bu araştırmacılar olan Iqbal ve diğ. (2014) *A. castellanii* ATCC 50492'nin hücresiz sıvısının metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) üzerinde %99'dan fazla,

vankomisin dirençli *Enterococcus* üzerinde %8 oranında inhibe edici etki gösterdiğini, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* üzerinde herhangi bir inhibe edici etki göstermediğini saptamıştır. Tashmukhambetov (2016) ise *A. castellanii* ATCC 50492'nin *S. pneumoniae* üzerinde %100, metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) üzerinde %10.6, *S. epidermidis* üzerinde %3.4, *E. coli* üzerinde %6.1, *P. aeruginosa* üzerinde %11.1 ve *H. influenza* üzerinde %2.5 oranında inhibe edici etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Özetle bu iki çalışmada da birer adet ÖYA suşu (*A. castellanii* ATCC 50492) ve *Pseudomonas* dahil her bir klinik bakteri izolatından birer adet kullanılmış ve *A. castellanii* ATCC 50492'nin hücresiz sıvısının bir adet *P. aeruginosa* suşu karşısında %0-%11.5 oranında inhibe edici etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu inhibisyonun %0-%91.5 (Tablo 4.8) olarak saptandığı çalışmamızda ise, hem daha fazla sayıda suş (beş adet ÖYA, beş adet *P. aeruginosa*) hem de mevcut literatürdeki çalışmalardan farklı suşlar (*A. castellanii* ATCC 50373 ve ülkemizdeki sulardan izole edilmiş dört ÖYA izolatı; *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve ülkemizdeki hastalardan izole edilmiş dört klinik *P. aeruginosa* izolatı) kullanılmıştır. Çalışmamızda, en yüksek inhibe edici etkinin %91.5 olmasının yanı sıra, bazı ÖYA suşlarına ait ACM'ler bazı *P. aeruginosa* suşları üzerinde hiç inhibe edici etki göstermemiştir (Tablo 4.8). *P. aeruginosa* suşları üzerinde ortalama en yüksek inhibe edici etki (%64.6) A13 suşuna ait ACM'de görülürken, en düşük inhibe edici etki (%34.4) A14 suşuna ait ACM'de görülmüştür. ACM'lere ortalama olarak en duyarlı *P. aeruginosa* suşu ülkemize ait suşlardan olan PA5 iken (%82.6), en dirençli *P. aeruginosa* suşu PA3 (%21.7) olmuştur. ÖYA'nın hücresiz sıvılarına karşı denenen dört klinik *P. aeruginosa* suşundan üç tanesi, *P. aeruginosa* ATCC27853 suşuna göre daha yüksek oranda inhibe edilmiştir (Tablo 4.10). Çalışmamızdan elde edilen tüm bu sonuçlar ışığında ve mevcut literatürle yapılan karşılaştırmalar sonucunda ÖYA'nın hücresiz sıvılarının *P. aeruginosa* karşısında gösterdiği inhibe edici etkilerinin hem ÖYA suşlarına hem de *P. aeruginosa* suşlarına göre farklılık gösterdiği söylenebilir.

Çalışmamızda ülkemize ait dört çevresel ÖYA izolatından üç tanesine ait ACM, *A. castellanii* ATCC 50492 suşuna ait ACM'ye göre daha yüksek oranda inhibe edici etki göstermiştir (Tablo 4.9). Bu sonuçlar ülkemizden izole edilmiş ÖYA'nın antibakteriyel etkili maddeler için bir potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir. Elde edilen bu bilgi, planlanacak yeni araştırmalara temel oluşturma niteliğindedir, ülkemizdeki farklı su ortamlarından yeni ÖYA suşlarının izole edilmesi, hücresiz sıvılarının anti-*Pseudomonas* etkilerinin olup olmadığının araştırılması konusunda ihtiyaç duyulan yeni çalışmaların önünü açmaktadır. Bu sayede yüksek

anti-*Pseudomonas* aktivitesine sahip ÖYA'nın tespit edilmesi mümkün olabilecektir. Ayrıca daha sonraki çalışmalar ile bu aktiviteye sahip ÖYA hücresiz sıvılarının saflaştırılıp etken madde/maddelerin tespit edilmesiyle yeni anti-*Pseudomonas* etkili madde/maddelerin keşfi çalışmalarına da katkı sağlanabilecektir. Tüm bunlara ek olarak ÖYA kökenli maddelerin, *Pseudomonas* dışındaki patojen bakteriler için de antibakteriyel etkiye sahip olup olmadıklarının araştırılması, yapılacak diğer çalışmalar ile mümkün olacaktır.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan deneylerde PBS içerisinde süspanse edilen *P. aeruginosa* suşlarının, 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası saptanan bakteri sayıları değişkenlik göstermiştir. *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve PA2 suşlarının PBS'de 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonrası bakteri sayılarında herhangi bir artış görülmezken PA3 ve PA5 suşlarında 10 kat, PA4 suşunda ise 100 kat artış görülmüştür (Tablo 4.2). Çalışmamızın sonuçlarına benzer olarak *Pseudomonas* suşlarının çeşitli besleyici olmayan ortamlarda üreyebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Favero ve diğ. (1971) bir hastaneye ait buhar terapi ünitelerinden temin ettikleri distile suda, Botzenhart ve Kufferath (1976) steril musluk suyu, distile su ve mineral tuz solusyonunda, Legnani ve diğ. (1999) oldukça düşük miktarda organik bileşen içeren mineral sularda *P.aeruginosa*'nın rahatlıkla üreyebildiğini ve bu bakterinin çok az besleyici olan ortamlara kolaylıkla adapte olabildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Liao ve Shollenberger (2003) *P.aeruginosa* ve birçok bakterinin distile su içerisinde uzun yıllar hayatta kaldığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda denenen ülkemize ait yüzme havuzları ve göl suyundan izole edilmiş ÖYA suşlarının identifikasyonları, Page'in temel morfolojik tanımlama anahtarına göre yapılmış ve *Acanthamoeba* cinsine ait olduğu varsayılmıştır (Page, 1988). Bu mikroorganizmaların cins düzeyindeki adlandırılmasının doğrulanması ve tür düzeyindeki adlandırılmalarını belirlemek amacıyla ihtiyaç duyulan moleküler düzeydeki identifikasyonları için yeni çalışmalar planlanmaktadır.

Bu tez çalışmasından elde edilen bilgiler,

- 1- Yeni antimikrobiyal maddelerin arayışı çalışmalarına bakteriler, mantarlar ve alglere ek olarak ülkemize ait ÖYA suşlarının da dahil edilmesi fikrine dikkat çekmektedir.
- 2- "ÖYA' nın, bakteriler ile aynı ortamı paylaşırken nasıl hayatta kaldığı" sorusuna bir cevap niteliği taşımaktadır.

- 3- Ülkemizden izole edilmiş ÖYA suşlarına ait hücresiz sıvıların, *P. aeruginosa* karşısında antibakteriyel etki potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.
- 4- Daha yüksek anti-*Pseudomonas* etkiyi keşfedebilmek amacıyla, ülkemizdeki farklı su ortamlarından izole edilecek yeni ÖYA suşlarına ait hücresiz sıvıların da incelenmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.
- 5- Gerek elimizde mevcut olan, gerekse ülkemizdeki farklı su ortamlarından izole edilecek olan ÖYA izolatlarına ait hücresiz sıvıların, *P. aeruginosa* dışındaki diğer patojen bakteriler, mantarlar, virüsler (Coronavirüs, Covid-19 dahil) gibi mikroorganizmalar karşısında antimikrobiyal etkilerinin olup olmadığının ortaya koyulması için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu ortaya çıkartmaktadır.

KAYNAKLAR

- Akbar, N., Siddiqui, R., Sagathevan, K., & Khan, N. A., 2020, Gut bacteria of animals living in polluted environments exhibit broad-spectrum antibacterial activities, *International Microbiology*, 1-16.
- Aksözek, A., 2001, *Su örneklerinde Acanthamoeba'ların araştırılması, insanlarda ve deneysel hayvan modellerinde immun yanıtın incelenmesi ve Acanthamoeba kistlerinin kontakt lens dezenfektanlarına direnci*, Uzmanlık Tezi, İstanbul Tıp Fakültesi.
- Akya, A., Pointon, A., Thomas, C., 2009, Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba* spp., *FEMS microbiology ecology*, 70(1), 20-29.
- Akyar, I., 2010, Süper Bakteriler İçin Antibiyotik Arayışı, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(1), 62-67.
- Anacarso, I., Guerrieri, E., Bondi, M., de Niederhäusern, S., Iseppi, R., Sabia, C., Messi, P., 2010, Influence of *Legionella pneumophila* and other water bacteria on the survival and growth of *Acanthamoeba polyphaga*, *Archives of microbiology*, 192(10), 877-882.4
- Artun, F. T., Karagoz, A., Zeybek, Z., Ustunturk-Onan, M., Melikoglu, G., Anil, S., & Kultur, S., 2016, Evaluation of antibacterial activity of some plant methanolic extracts, *Fresenius Environmental Bulletin*, 5419.
- Axelsson-Olsson, D., Olofsson, J., Ellström, P., Waldenström, J., Olsen, B., 2009, A simple method for long-term storage of *Acanthamoeba* species, *Parasitology research*, 104(4), 935-937.
- Bakardjiev, A., Azimi, P. H., Ashouri, N., Ascher, D. P., Janner, D., Schuster, F. L., ... & Glaser, C., 2003, Amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*: report of four cases, *The Pediatric infectious disease journal*, 22(5), 447-452.
- Barete, S., Combes, A., De Jonckheere, J. F., Datry, A., Varnous, S., Martinez, V., & Gibert, C., 2007, Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* acanthamebiasis in a heart transplant patient, *Emerging infectious diseases*, 13(5), 736.
- Barker, J. O. H. N., Brown, M. R., Collier, P. J., Farrell, I., Gilbert., 1992, Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation, *Applied and environmental microbiology*, 58(8), 2420-2425.
- Barker, J., Scaife, H., Brown, M. R., 1995, Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(12), 2684-2688.
- Baron, E.J., Finegold, S.M., 1990, *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 8th edition, The C. V. Mosby Company, Missouri, 0-8016-0344-7.

- Bastos, M. C. F., Coutinho, B. G., Coelho M. L. V., 2010, Lysostaphin: a staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications, *Pharmaceuticals*, 3(4), 1139-1161.
- Bavin, E. M., Beach, A. S., Falconer, R., Fried-mann, R., 1952, Nisin in experimental tuberculosis, *Lancet*, 127-9.
- Beaver, P.C., Jung, R.C., Cupp, E.W., 1984, *Clinical parasitology*, 9th edition, Lea & Febiger, Philadelphia, 0-8121-0876-0.
- Bergey, D. H., Breed, R. S., Murray, E. G. D., & Hitchens, A. P., 1939, *Manual of determinative bacteriology*, Fifth Edn, Williams & Wilkins, Baltimore
- Bogitsh, B. J., Carter, C. E., Oeltmann, T. N., 2018, *Human parasitology*, Academic Press.
- Borin, S., Feldman, I., Ken-Dror, S., Briscoe, D., 2013, Rapid diagnosis of *Acanthamoeba keratitis* using non-nutrient agar with a lawn of *E. coli*, *Journal of ophthalmic inflammation and infection*, 3(1), 40.
- Botzenhart, K., & Kufferath, R., 1976, On the growth of various Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Alkaligenes spec.* in distilled water, de-ionized water, tap water, and mineral salt solution (author's transl), *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Erste Abteilung Originale, Reihe B: Hygiene, präventive Medizin*, 163(5-6), 470-485.
- Brantner, A., & Grein, E., 1994, Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine, *Journal of ethnopharmacology*, 44(1), 35-40.
- Brown, M. R., Barker, J., 1999, Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms, *Trends in microbiology*, 7(1), 46-50.
- Burak, D. M., & Zeybek, Z., 2011, Investigation of *Legionella pneumophila* and free living amoebas in the domestic hot water systems in İstanbul, *Turkish Journal of Biology*, 35(6), 679-685.
- Byers, T. J., Akins, R. A., Maynard, B. J., Lefken, R. A., Martin, S. M., 1980, Rapid Growth of *Acanthamoeba* In Defined Media; Induction of Encystment By Glucose-Acetate Starvation, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 27(2), 216-219.
- Calvo, L., Gregorio, I., García, A., Fernández, M. T., Goñi, P., Clavel, A., & Fillat, M. F., 2013, A new pentaplex-nested PCR to detect five pathogenic bacteria in free living amoebae, *Water research*, 47(2), 493-502.
- Cervero-Aragó, S., Rodríguez-Martínez, S., Puertas-Bennasar, A., & Araujo, R. M., 2015, Effect of common drinking water disinfectants, chlorine and heat, on free *Legionella* and amoebae-associated *Legionella*, *PloS One*, 10(8), e0134726
- Chekabab, S. M., Daigle, F., Charette, S. J., Dozois, C. M., & Harel, J., 2012, Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of *Acanthamoeba castellanii* and its dependence on Pho regulon, *MicrobiologyOpen*, 1(4), 427-437.

- Cross, A., Allen, J. R., Burke, J., Duce, G., Harris, A., John, J., Skalova, R., 1983, Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends, *Reviews of infectious diseases*, 5(Supplement_5), S837-S845.
- Çotuk, A., İlhan-Sungur, E., 2014, *Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri*, Nobel Tıp Kitabevleri, Dördüncü baskı.
- Delafont, V., Bouchon, D., Héchard, Y., & Moulin, L., 2016, Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network, *Water research*, 100, 382-392.
- Dey, R., Rieger, A. M., Stephens, C., & Ashbolt, N. J., 2019, Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* with *Acanthamoeba polyphaga* observed by imaging flow cytometry, *Cytometry Part A*, 95(5), 555-564.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G., 2000, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- Döşler, S., 2017, Antimicrobial peptides: Coming to the end of antibiotic era, the most promising agents, *Istanbul Journal of Pharmacy*, 47(2), 72-76.
- Eroğlu, F., Evyapan, G., Koltas, İ. S., 2015, The cultivation of *Acanthamoeba* using with different axenic and monoxenic media, *Middle Black Sea Journal of Health Science*, 1(3), 13-17.
- Faleiro, L., Miguel, G. M., Guerrero, C. A. C., & Brito, J. M. C., 1997, Antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L) L. ssp *mastichina* and *Thymus albicans* Hofmanns & Link. In *II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 2: Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicine, Toxicology* 501 (pp. 45-48).
- Favero, M. S., Carson, L. A., Bond, W. W., & Petersen, N. J., 1971, *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals, *Science*, 173(3999), 836-838.
- Fleming, A., 1929, On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*, *British journal of experimental pathology*, 10(3), 226.
- Gelman, B. B., Rauf, S. J., Nader, R., Popov, V., Borkowski, J., Chaljub, G., ... & Visvesvara, G. S., 2001, Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*, *Jama*, 285(19), 2450-2451.
- Greub, G., Raoult, D., 2004, Microorganisms resistant to free-living amoebae, *Clinical microbiology reviews*, 17(2), 413-433.
- Güney, M., Bedir, O., Kılıç, A., Başustaoğlu, A. C., 2011, GATA Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında hemokültür örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç durumları, *Gülhane Tıp Dergisi*, 53(2), 119-22.

- Habbal, O., Hasson, S. S., El-Hag, A. H., Al-Mahrooqi, Z., Al-Hashmi, N., Al-Bimani, Z., & Al-Jabri, A. A., 2011, Antibacterial activity of *Lawsonia inermis* Linn (Henna) against *Pseudomonas aeruginosa*, *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1(3), 173-176.
- Hadas, E., & Mazur, T., 1993, Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp., *Tropical medicine and parasitology: official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, 44(3), 197-200.
- Halkman, A. K., & Ayhan, K., 2000, Mikroorganizma Sayımı, *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, 522.
- Health Protection Agency, 2004, Isolation and identification of *Acanthamoeba* species [online], *National Standard Method*, W 17, Issue 2, http://www.hpastandardmethods.org.uk/pdf_sops.asp
- Herederro-Bermejo, I., Copa-Patiño, J. L., Soliveri, J., Gómez, R., De La Mata, F. J., & Pérez-Serrano, J., 2013, In vitro comparative assessment of different viability assays in *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites, *Parasitology research*, 112(12), 4087-4095.
- Hili, P., Evans, C. S., & Veness, R. G., 1997, Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil, *Letters in applied microbiology*, 24(4), 269-275.
- Holloway, B. W., 1955, Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, 13(3), 572-581.
- Horn, M., Wagner, M., 2004, Bacterial Endosymbionts of Free-living Amoebae, *Journal of eukaryotic microbiology*, 51(5), 509-514.
- Iqbal, J., Siddiqui, R., Khan, N. A., 2014, *Acanthamoeba* and bacteria produce antimicrobials to target their counterpart, *Parasites & vectors*, 7(1), 56.
- Jacquier, N., Aeby, S., Lienard, J., Greub, G., 2013, Discovery of new intracellular pathogens by amoebal coculture and amoebal enrichment approaches, *Journal of visualized experiments: JoVE*, (80), e51055.
- Kandi, B., 2010, *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları, *Türkiye klinikleri journal of dermatology special topics*, 3(3), 44-46.
- Kaur, A. D., Nain, P., & Nain, J., 2012, In-vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Ginkgo Biloba Bark Extract, *IRJP*, 3(6), 116-119.
- Khan, N. A., 2003, Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections, *Microbial pathogenesis*, 34(6), 277-285.
- Khan, N. A., 2006, *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health, *FEMS microbiology reviews*, 30(4), 564-595.

- Khan, N. A., Siddiqui, R., 2014, Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*, *Parasitology*, 141(7), 869-874.
- Khalilzadeh, P., Lajoie, B., El Hage, S., Furiga, A., Baziard, G., Berge, M., & Roques, C., 2010, Growth inhibition of adherent *Pseudomonas aeruginosa* by an N-butanoyl-L-homoserine lactone analog, *Canadian journal of microbiology*, 56(4), 317-325.
- Kireççi, E., Sevinç, İ., 2008, Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları, *Ankem derg.*, 22(4), 209-212.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. S., 2010, Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts, *Journal of microbiological methods*, 81(2), 121-126.
- Lamothe, J., Thyssen, S., & Valvano, M. A., 2004, *Burkholderia cepacia* complex isolates survive intracellularly without replication within acidic vacuoles of *Acanthamoeba polyphaga*, *Cellular microbiology*, 6(12), 1127-1138.
- Lee, S., Siddiqui, R., Khan, N. A., 2012, Animals living in polluted environments are potential source of antimicrobials against infectious agents, *Pathogens and global health*, 106(4), 218-223.
- Legnani, P., Leoni, E., Rapuano, S., Turin, D., & Valenti, C., 1999, Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. *International journal of food microbiology*, 53(2-3), 153-158.
- Liao, C. H., & Shollenberger, L. M., 2003, Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline, *Letters in applied microbiology*, 37(1), 45-50.
- Lopez, F. E., Vincent, P. A., Zenoff, A. M., Salomon, R. A., Farías, R. N., 2007, Efficacy of microcin J25 in biomatrices and in a mouse model of Salmonella infection, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(4), 676-680.
- Mah, J. H., Kim, K. S., Park, J. H., Byun, M. W., Kim, Y. B., & Hwang, H. J., 2001, Bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum, produced by *Bacillus* sp. isolated from Kimchi, *Journal of microbiology and biotechnology*, 11(4), 577-584.
- Marciano-Cabral, F., & Cabral, G., 2003, *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans, *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 273-307
- Martindale, W. H., 1910, Essential oil in relation to their antiseptic poweres, *Purfum. Essent. Oil Rec.*, 1, 266-274.
- Michel, R., Burghardt, H., Bergmann, H., 1995, *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital, *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin= International journal of hygiene and environmental medicine*, 196(6), 532-544.

- Mishra, S. K., Maitra, S. C., Garg, N. K., & Kidwai, A. M., 1986, Enzyme and chemical composition of plasma membranes of virulent and avirulent strains of *Acanthamoeba culbertsoni*, *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 23(1), 5.
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., Kwaik, Y. A., 2005, Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens, *Applied and environmental microbiology*, 71(1), 20-28.
- Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N., & Bakri, M. M., 2018, Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 361-366.
- Nanasombat, S., Kuncharoen, N., Ritcharoon, B., & Sukcharoen, P., 2018, Antibacterial activity of Thai medicinal plant extracts against oral and gastrointestinal pathogenic bacteria and prebiotic effect on the growth of *Lactobacillus acidophilus*, *Chiang Mai J. Sci*, 45, 33-44.
- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L., 2000, Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria, *Brazilian journal of microbiology*, 31(4), 247-256.
- Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Rezaeian, M., Martin-Navarro, C. M., Haghi, A. M., Maciver, S. K., & Valladares, B., 2009, Isolation of *Balamuthia mandrillaris* from urban dust, free of known infectious involvement, *Parasitology research*, 106(1), 279-281.
- Ortega-Rivas, A., Padrón, J. M., Valladares, B., Elsheikha, H. M., 2016, *Acanthamoeba castellanii*: A new high-throughput method for drug screening in vitro, *Acta tropica*, 164, 95-99.
- Orucu, M., Geyik, M. F., 2008, Yoğun bakım ünitesinde sık görülen enfeksiyonlar, *Düzce tıp fakültesi dergisi*, 1(1), 40-43.
- Özçelik, S., Coskun, K. A., Düzlü, Ö., Ahmet, A., & Malatyalı, E., 2012, The prevalence, isolation and morphotyping of potentially pathogenic free-living amoebae from tap water and environmental water sources in Sivas. *Türkiye parazitolojii dergisi*, 36(4), 198-203.
- Özdemir, M., Erayman, İ., Dağı, H. T., Baykan, M., Baysal, B., 2009, Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları, *Ankem dergisi*, 23(3), 122-126.
- Page, F. C., 1988, *A new key to freshwater and soil gymnamoebae: with instructions for culture*. Freshwater Biological Association, The Ferry House, Ambleside, Cumbria LA22 0LP. ISBN 1 871105 02 1
- Pelczar, M.J., Chan, ECS., Krieg, R., 1986, The World of Bacteria I: ‘‘Ordinary Gram-Negative Bacteria, Chapter 13, *Microbiology*, 267.
- Prashanth, D., Asha, M. K., & Amit, A., 2001), Antibacterial activity of *Punica granatum*, *Fitoterapia*, 72(2), 171-173.

- Pritzker, A. S., Kim, B. K., Agrawal, D., Southern Jr, P. M., & Pandya, A. G., 2004, Fatal granulomatous amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* presenting as a skin lesion, *Journal of the American academy of dermatology*, 50(2), 38-41.
- Riestra-Castaneda, J. M., Riestra-Castaneda, R., Gonzalez-Garrido, A. A., Moreno, P. P., Martinez, A. J., Visvesvara, G. S., ... & Cornejo, S. G., 1997, Granulomatous amebic encephalitis due to *Balamuthia mandrillaris* (Leptomyxiidae): report of four cases from Mexico, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 56(6), 603-607.
- Rossi, L. M., Rangasamy, P., Zhang, J., Qiu, X. Q., Wu, G. Y., 2008, Research advances in the development of peptide antibiotics, *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(3), 1060-1070.
- Rowbotham, T. J., 1980, Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae, *Journal of clinical pathology*, 33(12), 1179-1183.
- Sanchez, S., Flores, M. E., Demain, A. L., 1988, Nitrogen regulation of penicillin and cephalosporin fermentations, *Nitrogen source control of microbial processes*, CRC Press, Boca Raton, Fla, 121-136.
- Saygı, G., Polat, Z., 2003, Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitozlar (Primer Amibik Meningoensefalit - Granülomatöz Amibik Ensefalit – Keratit), *C. Ü. Tıp fakültesi dergisi*, 25 (3), 140 – 149, Sivas
- Schatz, A., Bugle, E., Waksman, S. A., 1944, Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, *Proceedings of the Society for experimental biology and medicine*, 55(1), 66-69.
- Schuster, F. L., 2002, Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas, *Clinical microbiology reviews*, 15(3), 342-354.
- Şenler, N. G., Yıldız, İ., 2010, Tatlı su protozoonları ve önemi, *Türk bilimsel derlemeler dergisi*, (1), 7-16.
- Shoff, M. E., Rogerson, A., Kessler, K., Schatz, S., Seal, D. V., 2008, Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water, *Journal of water and health*, 6(1), 99-104.
- Siddiqui, R., Khan, N. A., 2012, Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*, *Parasites & vectors*, 5(1), 6.
- Siddiqui, R., Ong, T. Y. Y., Jung, S. Y., & Khan, N. A., 2017, *Acanthamoeba castellanii* interactions with *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*, *Experimental parasitology*, 183, 128-132.
- Şimşek, B., Sağdıç, O., Karahan, A. G., 2002, Süt starter kültürleri tarafından üretilen bakteriosinlerin süt teknolojisindeki önemleri. *Pamukkale üniversitesi mühendislik bilimleri dergisi*, 8(3), 335-341.

- Snodgrass, W. R., Anderson, T., 1937, Sulphanilamide in the treatment of erysipelas, *British medical journal*, 2(4014), 1156.
- Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., & Perumalsamy, P. L., 2001, Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine, *Journal of ethnopharmacology*, 74(3), 217-220.
- Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B., Quinn, F., 1998, *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls, *Applied and environmental microbiology*, 64(6), 2256-2261.
- Strassmann, J. E., Shu, L., 2017, Ancient bacteria–amoeba relationships and pathogenic animal bacteria, *PLoS biology*, 15(5), e2002460.
- Tashmukhambetov, B., 2016, *An investigation of the effects of an antimicrobial peptide on the survival of Acanthamoeba and intracellular bacteria associated with Cystic Fibrosis* (Doctoral dissertation, University of Essex).
- Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D. S., Greub, G., 2006, Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network, *Applied and environmental microbiology*, 72(4), 2428-2438.
- Thomas, V., Loret, J. F., Jousset, M., Greub, G., 2008, Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant, *Environmental microbiology*, 10(10), 2728-2745.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Ayadi, A., 2012, Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review, *Pathologie Biologie*, 60(6), 399-405.
- Trabelsi, H., Sellami, A., Dendana, F., Sellami, H., Cheikh-Rouhou, F., Makni, F., Ayadi, A., 2010, Free-living amoebae (FLA): morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* in dental unit water, *Parasite*, 17(1), 67-70.
- Tuncer, S., & Akova, M. *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları.
- Tunçoğlu, E., Yenişehirli, G., Bulut, Y., 2009, Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci, *Ankem Derg*, 23(2), 54-8.
- Ugonabo, J. A., & Guignani, H. C., 1989, Nasal carriage of *Naegleria fowleri* and its environmental occurrence in Borno State, Nigeria, *The Journal of communicable diseases*, 21(2), 111-113.
- Uzun, B., Güngör, S., Yurtsever, S. G., Afşar, İ., Demirci, M., 2012, Yoğun bakım hastalarının kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç durumları, *Ankem Derg*, 26(2), 55-60
- Üstüntürk, M., Zeybek, Z., 2014., Amoebicidal efficacy of a novel multi-purpose disinfecting solution: first findings, *Experimental parasitology*, 145, S93-S97.

- Veríssimo, C. D. M., Maschio, V. J., Correa, A. P. F., Brandelli, A., Rott, M. B., 2013, Infection in a rat model reactivates attenuated virulence after long-term axenic culture of *Acanthamoeba* spp., *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(7), 832-835.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L., 2007, Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*, *FEMS immunology & Medical Microbiology*, 50(1), 1-26.
- Wahba, A. H., & Darrell, J. H., 1965, The identification of atypical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, 38(3), 329-342.
- Wang, H., Masters, S., Edwards, M. A., Falkinham III, J. O., Pruden, A., 2014, Effect of disinfectant, water age, and pipe materials on bacterial and eukaryotic community structure in drinking water biofilm, *Environmental science & technology*, 48(3), 1426-1435.
- Weitere, M., Bergfeld, T., Rice, S. A., Matz, C., Kjelleberg, S., 2005, Grazing resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms depends on type of protective mechanism, developmental stage and protozoan feeding mode, *Environmental microbiology*, 7(10), 1593-1601.
- Winiiecka-Krusnell, J., Linder, E., 2001, Bacterial infections of free-living amoebae, *Research in microbiology*, 152(7), 613-619.
- Winiiecka-Krusnell, J., Wreiber, K., Euler, A. V., Engstrand, L., & Linder, E., 2002, Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*, *Scandinavian journal of infectious diseases*, 34(4), 253-256.
- Yin, H., Qiang, J., Jia, Y., Ye, J., Peng, H., Qin, H., ... & He, B., 2009, Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater, *Process biochemistry*, 44(3), 302-308.
- Yücel, M., Yavuz, T., Kaya, D., Behçet, M., Öztürk, C. E., Şahin, İ., 2006, *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranlarının yıllar içinde değişimlerinin izlenmesi, *Ankem dergi*, 20(3), 152-155.
- Yünlü, Ö., Özçelik, S., & Arici, M. K., 2015, The investigation of *Acanthamoeba* and other free living amoeba in swab samples obtained from conjunctiva and eye lid. *Türkiye parazitoloji dergisi*, 39(3), 194.
- Zeibig, E., 2014, Clinical Parasitology-E-Book: A Practical Approach, *Elsevier Health Sciences*.
- Zeybek, Z., Üstüntürk, M., Binay, A. R., 2010, Morphological characteristics and growth abilities of free living amoeba isolated from domestic tap water samples in Istanbul, *IUFS journal of biology*, 69(1), 17-23.
- Zeybek, Z., Binay, A. R., 2014, Growth ability of Gram negative bacteria in free-living amoebae, *Experimental parasitology*, 145, S121-S126.

Zeybek Z., Türkmen A., 2020, Investigation of the Incidence of *Legionella* and free-living amoebae in swimming pool waters and biofilm specimens in Istanbul by different methods, *Mikrobiyoloji bülteni*, vol.54, pp.50-64.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Çise KEBABCI
Doğum Yeri	Kadıköy/İSTANBUL
Doğum Tarihi	26.12.1994
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	05343303349
E-Posta Adresi	cisekebabci@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	29.12.2016

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji