



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



Doktora Tezi

**ÖZGÜR-YAŞAYAN AMİPLERİN HÜCRESİZ SIVILARININ
STAPHYLOCOCCUS ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şevval Maral ÖZCAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Zuhale ZEYBEK**

Nisan, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 7.04.2022 tarihinde aşığıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Zuhul ZEYBEK(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayten KİMİRAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Derya DOĞANAY
Biruni Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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 abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FBA-2019-31324 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Özcan, Ş.M., Zeybek, Z., 2021, The Effect of Cell-Free Supernatants of Free-Living Amoeba against Some *Staphylococcus* Bacteria: First Findings from Turkey, *European Journal of Biology*, 80 (1), 29-34.
Özcan, Ş.M., Zeybek, Z., 2021, Effects of free-living amoeba on *Staphylococcus* strains: first findings, *2nd International Aquatic Biotechnology Symposium*, İstanbul, Türkiye.

ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim boyunca, tez çalışmamın belirlenmesinden, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasına kadar bana her aşamada destek veren, kendisinden akademik olarak çok değerli bilgiler öğrendiğim ve daima desteğini gördüğüm sayın hocam Doç. Dr. Zuhale ZEYBEK'e,

Tez çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'a, Sayın Prof. Dr. Esra Sungur'a, Sayın Prof. Dr. Ayşe Seher BİRTEKSÖZ TAN'a, sayın Doç. Dr. Miray ONAN'a, Sayın Dr. Öğretim Üyesi Maryam HACIOĞLU'na ve,

Doktora eğitimim sırasında tanıştığım, akademik alanda değerli bilgiler öğrendiğim ve daima manevi desteğini hissettiğim sayın hocam Dr. Öğretim Üyesi Derya DOĞANAY'a,

Doktora eğitimim sırasında tanıştığım, beraber çalıştığım, yardımlarını gördüğüm ve bir ekip olduğum sevgili arkadaşım Uzman Biyolog Çise KEBABCI'ya,

Hayatımın her aşamasında hep arkamda duran, eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen, her türlü özveriye gösteren çok sevgili annem Sirarpi ÖZCAN'a, babam Ömer Faruk ÖZCAN'a, sevgili teyzem ve annaneme,

Doktora eğitimim boyunca bana hep destek olan sevgili nişanlım Enis Samet AYKOL'a,

Bu süreçte benden manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşım Dr. Öğretim Üyesi Nilüfer KOÇYİĞİT'e,

en içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Nisan 2022

Şevval Maral ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ÖZET	xii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLER	4
2.2. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLERİN PATOJENİTELERİ	7
2.3. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİP-BAKTERİ İLİŞKİLERİ	8
2.4. ANTİMİKROBİYAL MADDELER VE ÖYA	11
2.5. <i>STAPHYLOCOCCUS</i> CİNSİ BAKTERİLER	14
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	17
3.1. ÖYA SUŞLARININ YENİDEN KÜLTÜRE EDİLMESİ	18
3.2. ÖYA SUŞLARININ AKSENİK KÜLTÜRLERİNİN ELDESİ.....	20
3.3. AKSENİK ÖYA KÜLTÜRLERİNDEKİ AMİP SAYILARININ/ CANLILIKLARININ BELİRLENMESİ VE AMİP HÜCRE SİZ SIVILARININ (ACM) ELDESİ	22
3.4. <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SUŞLARININ YENİDEN KÜLTÜRE EDİLMESİ.....	23
3.5. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE DENEYLERİ	24
3.5.1 KOLONİ SAYIM YÖNTEMİ	24
3.5.2 AGAR DİFÜZYON YÖNTEMİ.....	27
3.6. OSMOTOLERANS VE TERMOTOLERANS TESTLERİ.....	28
3.7. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER.....	29
3.7.1. Non-Nutrient Agar.....	29
3.7.2. 0.5 M Mannitol İçeren Non-Nutrient Agar	29
3.7.3. 1 M Mannitol İçeren Non-Nutrient Agar	29
3.7.4. Isı ile inaktive edilmiş <i>E. coli</i> süspansiyonu	30

3.7.5. Tyryptic Soya Agar (TSA)	30
3.7.6. Pepton Maya Ekstrakt Glukoz (PYG) Besiyeri.....	30
3.7.7. Penisilin Çözeltisi.....	31
3.7.8. Streptomisin Çözeltisi	31
3.7.9. Antibiyotik İçeren Pepton Maya Ekstraktı Glikoz (PYG) Besiyeri	32
3.7.10. Page's Amoebal Saline (PAS).....	32
3.7.11. Fosfat tampon Salin (PBS)	33
3.7.12. Freezing Medium (FM)	33
3.7.13. Gliserinli Triptik Soy Broth (GTSB).....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. AKSENİK KÜLTÜRLERDEKİ ÖYA SAYILARININ VE CANLILIKLARININ TESPİTİ.....	35
4.2 ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE DENEYLERİ	36
4.2.1 KOLONİ SAYIM YÖNTEMİ SONUÇLARI.....	36
4.2.1.1 <i>A. castellanii</i> ATCC 50373 suşunun hücresiz sıvısının <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi	43
4.2.1.2 <i>A10</i> suşunun hücresiz sıvısının <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi	44
4.2.1.3 <i>A14</i> suşunun hücresiz sıvısının <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi	45
4.2.1.4 <i>UG</i> suşunun hücresiz sıvısının <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi	46
4.2.2 AGAR DİFÜZYON YÖNTEMİ SONUÇLARI	54
4.3. ÖYA SUŞLARININ OSMOTOLERANS VE TERMOTOLERANS AKTİVİTELERİ	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	65
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	90

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1: UG suşuna ait NNA’da gözlenen kist (siyah) ve trofozoit formunun (kırmızı) invert mikroskop görüntüsü (x100).	19
Şekil 3.2: Petri kutusunda yoğun üreme görülen ve işaretlenen bölgelerden parça kesme yöntemiyle pasaj alınması.	19
Şekil 3.3: Aksenik kültür elde etmek için kullanılan antibiyotikli PYG içeren T-25 doku kültürü flaskları.	20
Şekil 3.4: Tek tabakalı aksenik kültürün invert mikroskop görünümü (x100).	21
Şekil 3.5: A) Thoma lamı B) Santrifüj işlemi sonrası ÖYA suşundan elde edilen hücresiz sıvıyı içeren süpernatant (kırmızı) ve çöken amip hücrelerini içeren pellet (siyah).	23
Şekil 3.6: A) -86 °C’den çıkartılan kryptotiplerdeki <i>Staphylococcus</i> suşları, B) TSA besiyerine ekilmiş <i>Staphylococcus</i> suşlarının saf kültürleri.	24
Şekil 3.7: Bakteri süspansiyonu yoğunluğunun ölçüldüğü spektrofotometre.	25
Şekil 3.8: Antibakteriyel aktivite (koloni sayım yöntemi) deney şeması.	27
Şekil 4.1: ÖYA aksenik kültürünün Thoma lamında tripan mavisi ile muamelesi sonucu ışık mikroskobu görüntüsü (x100); canlı trofozoit (beyaz işaretli) ve ölü trofozoit (mavi işaretli).	35
Şekil 4.2: <i>A. castellanii</i> ATCC 50373-ACM örneğinin <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre).	43
Şekil 4.3: A10-ACM örneğinin <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi.	45
Şekil 4.4: A14-ACM örneğinin <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi.	46
Şekil 4.5: UG-ACM örneğinin <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi.	47
Şekil 4.6: Her bir ÖYA suşuna ait (<i>A. castellanii</i> ATCC 50373, A10, A14, UG) ACM örnekleri ve PYG ile birlikte 37°C’de 24 saat inkübe edilen MRSA SA17 suşunun Petri kutusunda üreyen kolonileri.	53
Şekil 4.7: <i>A. castellanii</i> ATCC 50373 suşunun 0.5 M ve 1 M Mannitol içeren NNA- <i>E. coli</i> besiyerinde bir hafta inkübasyonu sonucu invert mikroskop görüntüsü (x100).	63
Şekil 4.8: <i>A. castellanii</i> ATCC 50373 suşunun 30°C ve 37°C NNA- <i>E. coli</i> besiyerinde bir hafta inkübasyonu sonucu invert mikroskop görüntüsü (x100).	63

- Şekil 4.9:** A14 kodlu ÖYA suşunun 0.5 M ve 1 M Mannitol içeren NNA-*E. coli* besiyerinde bir hafta inkübasyonu sonucu invert mikroskop görüntüsü (x100). 64
- Şekil 4.10:** A14 kodlu ÖYA suşunun 30°C ve 37°C NNA-*E. coli* besiyerinde bir hafta inkübasyonu sonucu invert mikroskop görüntüsü (x100). 64



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Deneylerde kullanılan mikroorganizmalar.....	17
Tablo 4.1: Aksenik ÖYA kültürlerinin hücre sayım sonuçları.....	35
Tablo 4.2: Koloni sayım yöntemine göre ÖYA-ACM örneklerinin <i>Staphylococcus</i> suşları üzerine antibakteriyel etkileri.....	36
Tablo 4.3: <i>A. castellanii</i> ATCC 50373-ACM örneğinin <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre).....	44
Tablo 4.4: A10-ACM örneğinin <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi.....	45
Tablo 4.5: A14-ACM örneğinin <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre).	46
Tablo 4.6: UG-ACM örneğinin <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre).	47
Tablo 4.7: ÖYA-ACM örneklerinin <i>Staphylococcus</i> suşları üzerindeki inhibisyon oranları (en yüksekten en düşüğe göre).....	48
Tablo 4.8: ÖYA-ACM örneklerinin <i>Staphylococcus</i> suşlarına karşı ortalama inhibe edici etkileri.	52
Tablo 4.9: <i>Staphylococcus</i> suşlarının ÖYA-ACM karşısındaki ortalama duyarlılık yüzdeleri.	52
Tablo 4.10: Agar diffüzyon yöntemine göre, antibiyotiklerin ve ÖYA-ACM örneklerinin, <i>Staphylococcus</i> suşları üzerine antibakteriyel etkileri.	54
Tablo 4.11: Antibakteriyel aktivitenin koloni sayım yöntemi ve agar difüzyon yöntemine göre karşılaştırmalı sonuçları.....	59
Tablo 4.12: ÖYA suşlarının osmotolerans ve termotolerans test sonuçları.	62

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

Atm	: Atmosfer
cm²	: Santimetre kare
°C	: Santigrad Derece
dk	: Dakika
g	: Gram
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
pH	: Hidrojen gücü
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
µL	: Mikrolitre
%	: Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

ACM	: Özgür Yaşayan Amiplerin Hücresiz Sıvıları
ADB	: Amiplere Dirençli Bakteriler
AI	: Antibiyotik İnhibisyonu
AMP	: Antimikrobiyal Peptidler
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BI	: Bakteri İnhibisyonu
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CDC	: Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
FBS	: Fetal Sığır Serumı
FM	: Freezing Medium
GAE	: Granülatöz Amibik Ensefalit

GTSB	: Gliserinli Triptik Soy Broth
İ.Ü	: İstanbul Üniversitesi
Kob	: Koloni oluşturan birim
MHA	: Mueller Hinton Agar
MRSA	: Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	: Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus epidermidis</i>
MSSA	: Metisilin Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSE	: Metisilin Duyarlı <i>Staphylococcus epidermidis</i>
NA	: Nutrient Agar
NNA	: Non- Nutrient Agar
OD	: Optik Densite
Ort.	: Ortalama
OXA	: Oksasilin
ÖYA	: Özgür Yaşayan Amip
PAM	: Primer Amibik Menngosefalit
PAS	: Page's Amoeba Saline
PBS	: Fosfat Tampon Salin
PEN	: Penisilin
PYG	: Pepton Yeast Ekstrakt Glukoz Besiyeri
Tİ	: Toplam İnhibisyon
TSA	: Triptik Soya Agar
VAN	: Vankomisin
YÖ	: Yıkama Öncesi Sıvısı
YS	: Yıkama Sonrası Sıvısı

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ÖZGÜR-YAŞAYAN AMİPLERİN HÜCRESİZ SIVILARININ STAPHYLOCOCCUS ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Şevval Maral ÖZCAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Zuhul ZEYBEK

Özgür yaşayan amipler (ÖYA'lar), toprak, hava, deniz, göl, nehir ve insan yapımı su sistemleri (musluklar, yüzme havuzları, diş üniteleri, soğutma kuleleri, vb.) gibi çeşitli ortamlarda yaşayabilen ökaryotik mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar, hem insanlarda meydana getirdikleri hastalıklar hem de doğadaki diğer mikroorganizmalarla olan ilişkileri sebebiyle oldukça dikkat çekmektedir. Bu ilişkilerden en bilineni, ÖYA'ların bazı bakteriler için konak görevi görmeleri ve bu sayede bakterilerin yayılımını arttırmaları ile ilgilidir. Bu durumun aksine ÖYA'ların doğada aynı ortamı paylaştıkları bakterilere karşı antibakteriyel maddeler salgılayarak onları inhibe etmeleri ile ilgili olarak kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada ÖYA suşlarına ait hücresiz sıvıların (ACM), *Staphylococcus* cinsi bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, dört adet ÖYA suşu (A10, A14, UG, *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373) kullanılmıştır. Bu suşlardan elde edilen ACM örneklerinin, 12 adet *Staphylococcus* bakterisi üzerinde antibakteriyel etkisi koloni sayım yöntemi ve agar difüzyon yöntemi kullanılarak

araştırılmıştır. ÖYA suşları, ısı ile inaktive edilmiş *Escherichia coli* ATCC 25922 yayılı non-nutrient agar (NNA) içeren Petri kutularında üretilmiştir. Bu suşların tek tabakalı aksenik kültürlerini elde etmek için pepton yeast ekstrakt glukoz (PYG) besiyeri kullanılmıştır. Aksenik kültürlerdeki amip sayıları (hücre/mL) Thoma lamı kullanılarak, canlılıkları tripan mavisi kullanılarak tespit edilmiştir. ÖYA suşlarının hücresiz sıvıları (ÖYA-ACM), ÖYA aksenik kültürlerinin 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 0.22 µm por çaplı steril filtreden geçirilmesiyle elde edilmiştir. *Staphylococcus* suşlarının süspansiyonları (10^8 kob/mL) spektrofotometrik yöntem kullanılarak (OD=595) hazırlanmıştır. ÖYA suşlarının patojenitelerinin belirlenmesi için osmotolerans ve termotolerans testleri kullanılmıştır.

Koloni sayım yöntemine göre, ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerindeki inhibe edici etkisinin değişkenlik gösterdiği saptanmıştır (%0- %100). *A. castellanii* ATCC 50373-ACM örneği, bir adet *Staphylococcus* suşu (MRSA-SA17) karşısında %100, yerel amip izolatından elde edilen UG-ACM örneği aynı suş karşısında yakın değerinde (%88.63) inhibe edici etki göstermiştir. Öte yandan, *A. castellanii* ATCC 50373-ACM örneğinin inhibe etmediği bir adet *Staphylococcus* suşu (MSSE- SE1), UG-ACM örneği tarafından %99.97 oranında inhibe edilmiştir. Bu değişkenliklerin, kullanılan ÖYA suşlarına ve *Staphylococcus* suşlarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Ülkemiz sularından izole edilen ÖYA-ACM örneklerinin (A10-ACM, A14-ACM, UG-ACM) *Staphylococcus* suşlarına karşı ortalama olarak sırasıyla % 0.34, %1.85, %16.35 oranında inhibe edici etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Buna karşın standart suştan elde edilen *A. castellanii* ATCC 50373-ACM örneğinin tüm *Staphylococcus* suşları üzerinde (ortalama %29.12) inhibe edici etkisinin ülkemiz sularından izole edilen ÖYA-ACM örneklerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Koloni sayım yönteminde inhibe edici etkisi saptanan ÖYA-ACM örneklerinin agar difüzyon yönteminde önemli bir inhibe edici etki göstermediği tespit edilmiştir. Denenen ÖYA suşlarının osmotolerans ve termotolerans testleri sonucunda patojenik potansiyellerinin olmadığı/düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Bu tez çalışması, ülkemizin sularından izole edilmiş ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarının *Staphylococcus* bakterilerine karşı antibakteriyel-etki potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Daha yüksek anti- *Staphylococcus* aktiviteye sahip ÖYA suşlarının tespit edilebilmesi için öncelikle daha fazla sayıda suşu içeren çalışmaların planlanması gereklidir. Ardından yüksek antibakteriyel etkiye sahip olan ÖYA-ACM örneklerinden etken madde/maddelerin tespit edilmesiyle yeni anti-*Staphylococcus* etkili madde/maddelerin keşfi çalışmalarına katkı sağlanabilecektir.

Nisan 2022, 108 sayfa.

Anahtar kelimeler: Özgür yaşayan amipler, *Staphylococcus*, antibakteriyel etki, amip-bakteri ilişkileri, koloni sayım yöntemi



SUMMARY

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FREE-LIVING AMOEBAS CELL FREE SUPERNATANTS ON *STAPHYLOCOCCUS*

Şevval Maral ÖZCAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Zuhale ZEYBEK

Free-living amoebae (FLAs) are eukaryotic microorganisms that can live in a variety of environments such as soil, air, sea, lake, river, and man-made water systems (taps, swimming pools, dental units, cooling towers, etc.). These microorganisms attract a lot of attention due to the diseases they cause in humans and their relationships with other microorganisms in nature. The most well-known of these relationships is related to the fact that FLAs increase the spread of bacteria by acting as a host for some bacteria. Contrary to this situation, there is limited information regarding the inhibition of FLAs by secreting antibacterial agents against bacteria with which they share the same environment in nature. Therefore, in this study, it was aimed to investigate whether cell-free supernatants (CFS) of FLA strains have antibacterial effects against *Staphylococcus* bacteria.

In this study, four FLA strains (A10, A14, UG, *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373) were used. The antibacterial effect of CFS samples obtained from these strains on 12 *Staphylococcus*

bacteria was investigated using colony counting method and agar diffusion method. FLA strains were grown in Petri dishes containing heat-inactivated *Escherichia coli* ATCC 25922 spread non-nutrient agar (NNA). Pepton yeast extract glucose (PYG) medium was used to obtain monolayer axenic cultures of these strains. Amoeba numbers (cells/mL) in axenic cultures were determined using a Thoma slide and viability was determined using trypan blue dye. Cell-free supernatant of FLA strains (FLA-CFS) were obtained by centrifuging the FLA axenic cultures at 3000 rpm for 5 minutes and then passing them through a sterile filter with a pore diameter of 0.22 μm . Suspensions (10^8 cfu/mL) of *Staphylococcus* strains were prepared using the spectrophotometric method (OD=595). In order to determine the pathogenicity of FLA strains, osmotolerance and thermotolerance tests were used.

According to the colony count method, it was determined that the inhibitory effect of FLA-CFS samples on *Staphylococcus* strains varied (0-100%). *A. castellanii* ATCC 50373-CFS sample showed 100% inhibitory effect against one *Staphylococcus* strain (MRSA-SA17), and UG-CFS sample obtained from the native amoeba isolate showed a close (88.63%) inhibitory effect against the same strain. On the other hand, one *Staphylococcus* strain (MSSE-SE1) that the *A. castellanii* ATCC 50373-CFS sample did not inhibit was 99.97% inhibited by the UG-CFS sample. These variations in results are thought to be due to the FLA strains and *Staphylococcus* strains used. It was determined that the FLA-CFS samples (A10-CFS, A14-CFS, UG-CFS) isolated from the waters of our country had an average inhibitory effect of 0.34%, 1.85%, and 16.35%, respectively, against *Staphylococcus* strains. However, it was determined that the inhibitory effect of *A. castellanii* ATCC 50373-CFS sample obtained from the standard strain on all *Staphylococcus* strains (average 29.12%) was higher than that of the FLA-CFS samples isolated from our country's waters.

It was determined that the FLA-CFS samples, which were found to have an inhibitory effect in the colony counting method, did not show a significant inhibitory effect in the agar diffusion method. As a result of osmotolerance and thermotolerance tests, it was concluded that the tested FLA strains had no/low pathogenic potential. This thesis study shows that cell-free supernatants of FLA strains isolated from the waters of our country have antibacterial-effect potential against *Staphylococcus* bacteria. In order to detect FLA strains with higher anti- *Staphylococcus* activity, studies involving more strains should be planned first. Then, by detecting the active substance(s) from the FLA-CFS samples with high antibacterial effect, it will be possible to contribute to the discovery of new anti-*Staphylococcus* effective substance(s).

April 2022, 108. pages.

Keywords: Free-living amoeba, *Staphylococcus*, antibacterial effect, amoeba-bacteria relationships, cell- free supernatant of amoeba, colony count method



1. GİRİŞ

Özgür yaşayan amipler (ÖYA'lar), toprakda, havada, deniz, göl, nehir gibi doğal sularda yaşayan ökaryotik canlılardır. Doğal sucul ortamlardan yüzme havuzları, soğutma kuleleri, musluk suları vb. insan yapımı su sistemlerine de geçerler (Lekkla ve diğ.,2005; Khan, 2006; Thomas ve diğ., 2007). Bu mikroorganizmaların yaşam döngülerinde trofozoit ve kist olmak üzere iki farklı form bulunur. Trofozoit formu, metabolik olarak aktif, hareket edebilen, beslenebilen formlardır. Trofozoit formları, besin kıtlığı, sıcaklık değişimleri, pH değişimleri gibi uygunsuz çevre koşulları oluştuğunda, metabolik olarak inaktif olan kist formuna dönüşmektedir (Greub ve Raoult, 2004; Fouque ve diğ.,2012). Kist formu aynı zamanda amiplerin, antibiyotikler, dezenfektanlar gibi maddelere karşı dayanıklı formlardır. Ortam koşulları normal hale geldiğinde kistler tekrar açılarak trofozoit formuna dönüşmektedirler.

İnsanlarda patojen olabilen önemli ÖYA türleri, *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* ve *Sappinia diploidea* türleridir (Trabelsi ve diğ., 2012). Bu mikroorganizmalar özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda, granülomatöz amibik ensefalit (GAE), primer amibik meningoensefalit (PAM), amibik keratit, kutanöz yaralar gibi ciddi ve ölümcül enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Lackner ve diğ., 2010; Trabelsi ve diğ., 2012; Visvesvara ve diğ., 2007).

İnsanda çeşitli hastalıklara sebep olmalarının yanısıra ÖYA'lar doğada bulundukları diğer mikroorganizmalarla olan çeşitli ilişkileri ile de dikkat çekmektedir. Bu ilişkilerden en bilineni, ÖYA'ların bazı bakteriler için konak görevi görmeleridir (Thomas ve diğ., 2010). Yapılan çalışmalarda, bazı bakterilerin ÖYA içerisine girerek, onları enfekte ettiği ve bu sayede kendilerini zararlı dış faktörlerden (antibiyotikler, kimyasallar, predatörler vb.) koruyarak hayatta kalma şanslarını artırdıkları anlaşılmıştır (Rowbotham, 1980; Greub ve Raoult, 2004; Molmeret ve diğ., 2005; Loret ve Greub, 2010). *Legionella pneumophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium leprae* ve *Mycobacterium avium* gibi patojen bakterilerin yayılımını bu sayede gerçekleştirdiği, patojenitelerini bu sayede arttırdığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (King ve diğ., 1988; Fallon ve

Rowbotham, 1990; Winiecka-Krusnell ve Linder., 2001; Tezcan-Merdol ve diğ., 2004; Rasmussen ve diğ.,2005; Thomas ve McDonell, 2007; Aky ve diğ., 2009; Thomas ve diğ., 2010; Scheid ve diğ.,2011; Cateau ve diğ., 2014; Khan ve Siddiqui, 2014).

ÖYA-bakteri ilişkileri konusunda bu bilinenlere ek olan güncel bilgiler ÖYA'ların aynı ortamı paylaştıkları bazı patojen bakterilere karşı antibakteriyel maddeler üretmesi ile ilgilidir (Nakisah ve Chandrika, 2012; Iqbal ve diğ., 2014; Tashmukhambetov, 2016). Bilindiği gibi, doğada bir arada yaşayan farklı mikroorganizma türleri yaşamlarını sürdürebilmek için çeşitli adaptasyonlar geliştirmektedirler. Bu adaptasyonlardan en önemlisi kendilerini tehdit eden diğer mikroorganizmaları öldürmek veya üremesini inhibe etmek için çeşitli antimikrobiyal maddeler (antibiyotikler, bakteriyosinler, antimikrobiyal peptidler vb.) üretmeleridir. Nitekim bugün kullandığımız birçok antibiyotik çeşitli mikroorganizmalardan elde edilmesi çok uzun yıllardan beri bilinmekte ve bunların üretimleri endüstriyel ölçekte gerçekleştirilmektedir. Mikroorganizmalar arasındaki ilişkilerin araştırılmasına yönelik çalışmalar arttıkça yeni antimikrobiyal maddelerin keşfi de mümkün olabilir (Akbar ve diğ., 2020; Moënné-Loccoz ve diğ., 2015; Artun ve diğ., 2016; Döşler, 2017; Fleming, 1929; Lee ve diğ., 2012; Rossi ve diğ., 2008).

ÖYA'ların patojen bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin olup olmadığı ile ilgili literatürde kısıtlı bilgi vardır. Örneğin *Acanthamoeba* cinsi ÖYA suşlarının sulu lizatlarının Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *S. aureus* bakterileri üzerine antibakteriyel etkisinin olduğu belirlenmiştir (Nakisah ve Chandrika, 2012). Başka bir çalışmada, *Acanthamoeba* cinsi ÖYA'dan elde edilen hücresiz sıvının MRSA üzerine %99' dan fazla, vankomisin dirençli *Enterococcus* üzerine %8 inhibisyon gösterdiği, *Acinetobacter* ve *P. aeruginosa* üzerine ise herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığı saptanmıştır (Iqbal ve diğ., 2014). Yine aynı ÖYA cinsinin hücresiz sıvısının *S. pneumoniae*, metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA), *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *H. influenza* üzerine inhibisyon etkisinin olduğu gösterilmiştir (Tashmukhambetov, 2016). Bu konuda ülkemizde de tamamlanmış bir yüksek lisans tez çalışmasında çevresel ÖYA suşlarına ait hücresiz sıvıların klinik *P. aeruginosa* suşlarına karşı değişen oranlarda (%3.9 ile 91.5) inhibe edici etkisi saptanmıştır (Kebabci, 2020).

Geçmişten günümüze antibiyotiklere dirençli bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların sayısındaki artış, tedavileri giderek zorlaştırmakta hem maddi hem de manevi kayıplara

sebepe olmaktadır. Bu nedenle yeni antimikrobiyal maddelerin keşfedilmesi önemli bir ihtiyaçtır.

Antibiyotiklere dirençli hale gelme özelliği her geçen gün artan bakteriler arasında *Staphylococcus* cins ve türleri de (*S. epidermidis*, *S. aureus* vb.) yer almaktadır (Boucher ve Corey, 2008). CDC her yıl 80.000 kişinin MRSA kökenli enfeksiyona yakalandığını ve bunlardan 11.285'nin ölümle sonuçlandığını rapor etmiştir (CDC, 2013). *Staphylococcus* cinsi bakteriler, Gram pozitif kok şeklinde, aerob veya fakültatif anaerob özellikte olup, genellikle, yumuşak doku enfeksiyonları, deri enfeksiyonları, üriner enfeksiyonlar, bakteriyemi, endokardit, pnömoni, osteomyelit, artrit, besin zehirlenmesi, toksik şok sendromu, gibi ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Akyol ve diğ., 2006; Baron ve Finegold 1990; Tong ve diğ., 2015; Taylor ve diğ., 2017).

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında ülkemizden izole edilmiş farklı ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarının yine ülkemizden izole edilen klinik *Staphylococcus* izolatlarına karşı antibakteriyel etki gösterip göstermediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLER

Özgür yaşayan amipler (ÖYA'lar) hem insanlarda meydana getirdikleri hastalıklar hem de doğadaki diğer mikroorganizmalarla olan etkileşimleri sebebiyle oldukça dikkat çekmektedir. ÖYA'lar ökaryotik hücre yapısında mikroskopik protozoonlardır ve hava ve toprağın yanı sıra deniz, göl, nehir, göz yıkama üniteleri, diyaliz birimleri, dental üniteler, içme suları ve kontak lens yıkama solüsyonları gibi çok çeşitli sucul ortamlarda yaşayabilmektedir (Thomas ve diğ., 2007; Schuster ve Visvesvara, 2004; Molmeret ve diğ., 2005; Trabelsi ve diğ., 2012; Shoff ve diğ., 2008; Trabelsi ve diğ., 2010). Bu mikroorganizmalar yaşam döngüsünde genellikle trofozoit ve kist olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır (Khan, 2006; Greub ve Raoult, 2004; Thomas ve diğ., 2008). Çevre şartları (örn: besin miktarı, sıcaklık, pH vb.) uygun olduğunda ÖYA'lar, metabolik olarak aktif olan, beslenebilen, hareket edebilen ve bölünebilen trofozoit formu halinde bulunurlar. Trofozoitler, sabit bir şekle sahip olmayıp, yalancı ayaklarla hareket eder. Çevresel faktörler uygunsuz hale geldiğinde (örn: besin kıtlığı) ise metabolik olarak inaktif ve hareketsiz olan kist formuna dönüşürler. Kist formu, hücrenin açlıktan, fiziksel ve kimyasal ajanlardan ve kuruluştan korunmasını sağlar ve çeşitli kimyasallara, UV ışınlarına, antibiyotik gibi çeşitli faktörlere karşı oldukça dirençlidir (Lee ve diğ., 2012; Thomas ve diğ., 2008). Kistler 20 yıldan daha uzun süre yaşayabilmekte, çevre şartları uygun hale geldiğinde tekrar trofozoit formuna dönüşmektedir (Trabelsi ve diğ., 2012; Yünlü ve diğ., 2015). ÖYA'lar bazı bakteriler, mantarlar, siyanobakteriler, algler, küçük protozoonlar ve organik moleküller ile beslenmektedir (Şenler ve Yıldız, 2010; Cateau ve diğ., 2014; Balczun ve Scheid, 2017).

Bazı amipler hem insanlarda hem de diğer omurgalılarda patojenlerdir. *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* ve *Sappinia* insanlarda enfeksiyonlara sebep olabilen ÖYA cinsleridir (Trabelsi ve diğ., 2012). Fırsatçı patojen olarak immün sistemi baskılanmış kişilerde enfeksiyonlar meydana getirebildiği gibi, sağlıklı kişilerde de ciddi deri, solunum ve sinir sistemi enfeksiyonlarına sebep olmaktadır (Visvesvara ve diğ., 2007).

Acanthamoeba hem klinik hem de çevresel örneklerden en çok izole edilen bir ÖYA cinsidir. Bu cinsin türleri, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda, granülomatöz amibik ensefalit (GAE), kütanöz yaralar, nazofarenjijyal, pulmoner ve böbrek enfeksiyonları gibi hastalıklara sebep olmaktadır (Trabelsi ve diğ., 2012). *Acanthamoeba castellanii*,

Acanthamoeba culbertsoni, *Acanthamoeba hatchetti*, *Acanthamoeba healyi*, *Acanthamoeba astroonyxix*, *Acanthamoeba divionensis* ve *Acanthamoeba polyphaga*, insanlarda enfeksiyonlara sebep olabilen *Acanthamoeba* türleridir (Trabelsi ve diğ., 2012; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003). *Acanthamoeba* cinsinin trofozoitleri, tek nükleuslu, 24-26 µm büyüklüğünde, yüzeyden çıkan akantapod veya lobopodlarla karakterize edilir. Akantapod parazitin yüzeylere tutunmasını, hücresel hareketini ve avını yakalamasını sağlar. Trofozoitler bakteri, alg, maya, küçük organik partiküllerle beslenir ve ikiye bölünerek ürerler. Bu yaşam formu kötü çevre koşullarına uzun süre dayanamaz ve dayanıklı bir yapı olan kist formuna farklılaşır. Kistler, tek çekirdekli ve çift cidarlı görünümündedir. Dış kist duvarı düz veya buruşuk bir görünümündedir. İç duvarı ise yıldız, beşgen veya altıgen görünümündedir. Bu kist morfolojisi tür ayırımında kullanılmaktadır (Saygı ve Polat, 2003). Bu dirençli form çevresel değişiklikleri izlemeyi sağlayan porlara sahiptir.

Acanthamoeba cinsinin sebep olduğu hastalıklardan birisi “kutanöz acanthamoebiasis” hastalığıdır. Patojen olan amip, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda, kan yoluyla vücuda girer ve çeşitli dokulara yayılır. Haftalar sonra merkezi sinir sistemine ulaşarak ölüme sebep olabilir (Trabelsi ve diğ., 2012). *Acanthamoeba*’nın insanlarda sebep olduğu diğer hastalık olan granülamatoz amibik ensefalit (GAE) immün sistemi baskılanmış hastalarda ve AIDS hastalarında, diyabetik kişilerde ve organ nakli geçiren kişilerde ölüme neden olabilmektedir. Hastalık, mikroorganizmaların derideki bir açıklıktan ya da burun yolundan, solunum sisteminden girmesi buralardan kan yoluyla merkezi sinir sistemine taşınması ve yayılması ile gerçekleşmektedir (Schuster ve Visvesvara, 2004). Merkezi sinir sistemi dışında etkilenen diğer organlar deri, karaciğer, akciğer, böbrekler, pankreas, lenf bezleridir. Mikroorganizmanın merkezi sinir sisteminde gelişimi sonucunda birkaç gün içinde ölüm meydana gelebilmektedir. Kutanöz ve solunum enfeksiyonları birkaç ayda kendini gösterebilir. Enfeksiyonlardaki patojenite mekanizması hala tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Çoğunlukla bazal gangliyada, orta beyinde, beyin kökünde gözlenen lezyonlar kronik granüler ensefalit ile sonuçlanmaktadır (Desser ve diğ., 1993; Trabelsi ve diğ., 2012). *Acanthamoeba* kaynaklı bir diğer ana enfeksiyon *A. keratitis*, *A. castellanii* ve *A. polyhaga* türlerinin sebep olduğu amibik keratittir (Bernfeld ve diğ., 2014; Lorenzo-Morales ve diğ., 2005). Amibik keratit genellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda gelişen korneal bir enfeksiyondur. Kişilerin uzun süre kontakt lens kullanımı, steril olmayan ve uygun şekilde temizliği yapılmayan kontakt lens kullanımı, kontakt lenste biyofilm oluşumu ve kontakt lens kullanırken kontamine sularda

yüzülmesi temel risk faktörleridir. Son yıllarda gelişmekte olan ülkelerde kontakt lens kullananların sayısının artışıyla amibik keratit vakası sayısının arttığı görülmüştür. Bu vakaların sayısı ABD’de milyonda 1.36 iken İngiltere’de milyonda 17-21, Fransa’da 30000’de birdir. *Acanthamoeba*’nın kornea epitel hücrelerine bağlanması için trofozit formunda olması gerekmektedir. Trofozit form, hücrelere bağlandığında çeşitli proteazlar salgılamakta ve korneanın parazit kaynaklı sitoliziyle sonuçlanmaktadır. Hastalığın son evrelerinde korneal epitel ülserasyonu, perforasyon (delinme) ve sonunda körlük meydana gelmektedir (Trabelsi ve diğ., 2012).

Önemli bir ÖYA olan *Naegleria fowleri* (*N. fowleri*) göllerde, nehirlerde, sulama kanallarında, yüzme havuzlarında 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 gelişebilmektedirler (Ugonabo ve Gugnani, 1989; Schuster ve Visvesvara, 2004; Trabelsi ve diğ., 2012). Yaşam döngüsünde flagellalı, trofozit (ameboid) veya kist formu bulunmaktadır. Trofozoit formunun sabit bir şekli yoktur, 7-20 µm büyüklüğündedir, lobopod tipi yalancı ayaklarla hareket eder. Genellikle tek çekirdeklidir, kontraktıl vaküole sahiptir ve promitozla çoğalır. Trofozoit form distile su ya da besinler bulunduğu zaman iki flagellalı ve çoğalmayan forma dönüşür ama tekrar trofozoit forma geçebilir. Kist dönemi, yuvarlak görünümde olup, 7-10 µm çapında ve tek çekirdeklidir, çift cidarlı bir duvara sahiptir (Saygı ve Polat, 2003). Bütün evreler büyük karyozomlu ama periferol olmayan kromatine sahip tek nükleusla karakterize edilir. *Naegleria* cinsine ait 30 türden yalnızca *N. fowleri* türü insanlarda hastalığa sebep olmaktadır. *N. fowleri*, birincil amibik meningosefalit (PAM) etkeni olan, merkezi sinir sisteminde aniden gelişip hızlıca ölüme sebebiyet veren oldukça tehlikeli bir ÖYA’dır. Kişiler, bu patojeni içeren sularda yüzerken, bu mikroorganizmaların burun deliklerinden girmesi sonrasında koku sinirleri boyunca kribriform plakasına göç etmesi ve merkezi sinir sistemine giriş fırsatı yakalaması ile enfekte olurlar. Bu şekilde insan vücuduna giren amipler hızlıca çoğalırlar ve nöral dokularda yaygın ve güçlü zararlar meydana getirirler (Schuster, 2002; Ugonabo ve Gugnani, 1989; Schuster ve Visvesvara 2004).

Balamuthia mandrillaris genellikle toprakta yaşayan ve insanda ciddi kütanoz enfeksiyonlara ve merkezi sinir sistemi hastalıklarına sebep olan diğer ÖYA’dır (Horn ve Wagner, 2004). “Leptomyxid amipler” denilen grup içerisinde yer alan bu amiplerin izolasyonu ve kültüre alınması oldukça zordur. Trofozoitleri, 15-60 µm boyutunda olup, dallı budaklı görünümü ve

mitozla çoğalmasıyla karakterizedir. Kistleri ise yuvarlak veya yuvarlağa yakın görünümde, tek çekirdekli ve çift cidara sahiptir (Saygı ve Polat, 2003). *Balamuthia* enfeksiyonları, sağlık durumu tehlikede olan kişilerde ve AIDS tanısı alan hastalarda olduğu gibi diğer immün yetersizliği olan kişilerde de bildirilmiştir (Trabelsi ve diğ., 2012). Amibin vücuda giriş yolu tam bilinmemekle birlikte burun yoluyla ya da doğrudan deri üzerindeki bir açıklıktan olduğu ve kan yoluyla yayıldığı düşünülmektedir. (Schuster, 2002). Yapılan çalışmalarda *Balamuthia*'nın *Legionella* gibi patojenik mikroorganizmalar için konak görevi gördüğü de gösterilmiş (Horn ve Wagner, 2004), *Simkania negevensis* ve *Chlamydia* gibi bakterilerin üremesini sağladığı fakat bu yeteneğinin kist formunda kaybolduğu gösterilmiştir (Trabelsi ve diğ., 2012).

Sappinia cinsinin *S. pedata* ve *S. diploidea* olmak üzere bilinen iki türü bulunmaktadır. Bu özgür yaşayan amipler tatlı su kaynaklarından, topraktan, memeli dışkılarından izole edilmiştir. Hayat döngüsünde trofozit ve kist olmak üzere iki farklı form bulunmaktadır. Trofozit formu (40-80 µm) iki çekirdekli ve pseudopod içermeyen görünümüyle karakterizedir. Kistleri (18-25 µm) ise çift duvarlı, nüklear porlu ve iki çekirdekli. Önceleri *Sappinia* cinsinin insan veya hayvanlarda öldürücülüğü gösterilmemiş olsa da sonradan, bir insanda amibik ensefalit nedeni olan bir toprak amibi "*Sappinia diploidea*" tespit edilmiştir (Trabelsi ve diğ., 2012, Schuster, 2002).

2.2. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİPLERİN PATOJENİTELERİ

ÖYA'ların patojenitesinde çeşitli virülans faktörleri rol oynayabilir. Bu virülans faktörler, konakçıdaki çeşitli hücre ve dokuların parçalanmasına, tahrip olmasına ve ölümüne yol açan adezinler, toksinler, amoebaporlar, fosfolipazlar ve çeşitli proteazlardır (Hurt ve diğ., 2003; Han ve diğ., 2004; Jamerson ve diğ., 2012; Serrano-Luna ve diğ., 2013). Örneğin patojen suşların yüksek konsantrasyonda serin proteaz, metalloproteaz ve sistein proteaz gibi hücre dışı proteazları ürettiği tespit edilmiştir (Khan, 2000; Khan, 2003; Sissons ve diğ., 2006; Lorenzo-Morales ve diğ., 2005; Moon ve diğ., 2018). Bu proteazların konak vücuduna girişte, dokular arası yayılımda ve patojenitenin sağlanmasında önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Patojen türlerin ürettikleri bu proteazların kollajen, fibronektin, laminin, fibrinojen, hemogloblin gibi proteinleri parçalayarak konak canlıının çeşitli hücrelerinin yıkımına sebep olduğu saptanmıştır (Serrano-Luna ve diğ., 2013). Serin proteaz aktivitesinin özellikle, amibik keratit ve GAE gibi enfeksiyonlara sebep olan *Acanthamoeba* türlerinin patojenitesinde en önemli

faktör olduğu bildirilmiştir (Lorenzo-Morales ve diğ. 2005; 2013; Khan 2006). Proteaz üretimine ek olarak patojen ÖYA türlerinde patojen olmayan türlere kıyasla konakçı hücrelere tutunma yüksek düzeyde görülmekte ve amip patojenitesi için adezyonun da çok önemli etkenlerden biri olduğu gösterilmiştir (Khan, 2001; Jamerson ve diğ., 2012). Mannoz bağlayıcı proteinler ve laminin bağlayıcı proteinler *Acanthamoeba* cinsi patojen suşların ürettiği adezinlerdendir. Bu özellikler dışında patojen türlerde, yüksek sıcaklıklara tolerans, yüksek osmolariteye tolerans, agar yüzeyinde hareket ve insan hücre hatlarındaki sitopatik etkiler gibi fizyolojik özelliklerin de patojenite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Griffin, 1972; De Jonckheere, 1977; Thong ve Ferrante 1986; Cursons ve Brown 1978).

ÖYA'ların patojenitelerinin belirlenmesi için termotolerans ve osmotolerans testleri, proteaz aktivitesi testi ve hücre kültüründe sitopatik etki testi gibi testler sıklıkla kullanılmaktadır (Walochnik ve diğ., 2000; Castro-Artavia ve diğ., 2017). Bu testlerin tümü patojenik türlerin belirlenmesinde kullanılmakta fakat patojeniteyi belirleyen tek bir test bulunmamaktadır (Walochnik ve diğ., 2000). Yapılan çalışmalarda, patojen özellik gösteren ÖYA'ların yüksek osmolaritede veya yüksek sıcaklıklarda gelişim gösterebildiği belirlenmiştir (Khan ve diğ., 2001). ÖYA suşlarının yüksek konsantrasyonda mannitol içeren besiyerlerinde (0,5 M veya 1 M) üreme gösterip göstermediği "osmotolerans testi" ile belirlenirken, yüksek sıcaklıklara karşı (37°C veya 42°C) toleransı "termotolerans testi" ile saptanmaktadır (Caumo ve diğ., 2009; Landell ve diğ., 2013; Norouzi ve diğ., 2021).

2.3. ÖZGÜR YAŞAYAN AMİP-BAKTERİ İLİŞKİLERİ

ÖYA'lar yukarıda anlatıldığı gibi, insanlarda çeşitli enfeksiyonlara sebep olmakla birlikte, yaşadıkları ortamlardaki diğer mikroorganizmalarla olan ilişkileri ve patojen bakterilerin yayılmasındaki rolleri sebebiyle de dikkat çekmektedir (Khan ve Siddiqui, 2014; Strassman ve Shu, 2017). Bu konuda yapılan çeşitli çalışmalar doğrultusunda ÖYA-bakteri ilişkileri şu şekilde özetlenebilir:

1- Doğada ve insan yapımı su sistemlerinde ÖYA'ların bazı Gram negatif bakterileri (*E. coli*, *K. pneumonia*) besin kaynağı olarak kullandığı ve mikrobiyal komünite kontrolünde önemli rolleri bulunduğu bilinmektedir (Şenler ve Yıldız, 2010; Catau ve diğ., 2014; Samba-Louaka ve diğ., 2019).

2- Bazı bakteri türlerinin ÖYA'lar içerisine girerek çoğaldığı ve kendilerini olumsuz çevre şartlarından (sıcaklık değişimi, pH değişimi, antibiyotikler vb.) koruyabildiği gösterilmiştir (Cervero- Arago ve diğ., 2015, Delafont ve diğ., 2016, Winiecka-Krusnell ve Linder 2001; Molmeret vd., 2005; Brown ve Barker, 1999).

3- İntrasellüler yaşama alışkanlığındaki çok sayıda bakteri değişik mekanizmalarla amipler içerisinde çoğalmakta ve yaşamlarını devam ettirmektedir. Bu bakteriler ÖYA'lar içerisinde çoğalarak onları lizise uğratıp serbest hale geçebilirler (Horn ve Wagner, 2004). Bu durumda ÖYA'lar, patojen bakterilerin insan ve hayvanlara taşınmasında vektör görevini üstlenmiş olur (Gómez-Couso ve diğ., 2007; Mella ve diğ., 2016).

4- ÖYA'lar-bakteriler arasındaki ilişki bakterilerin patojenitesini arttırmakta ve hücre içinde gelişimde bakterilerin yüksek ökaryotik hücrelere adaptasyonunu da sağlamaktadır (Albert-Weissenberger ve diğ., 2007). Örneğin bu amipler içerisinde üreyen bakterilerin antibiyotiklere karşı 1500 kat direnç kazandıkları gösterilmiştir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003). Özgür yaşayan amiplerle bakteriler arasındaki ilişki, bakterilerin hücre-hücre iletişimi kurması, mikro koloni oluşturması, hareket ve biyoaktif metabolitlerin oluşumu gibi önemli özellikler kazanmasına da katkı sağlamaktadır (Matz ve diğ., 2004).

5- Kısıtlı sayıdaki çalışmada bazı ÖYA'ların antibakteriyel özellik gösterdiği ve bakteri sayısında önemli bir azalmaya sebep oldukları tespit edilmiştir (Iqbal ve diğ., 2014; Tashmukhambetov, 2016).

Yukarıda da anlatıldığı gibi ÖYA- bakteri ilişkilerinin sonuçları çok çeşitli olup, literatürde bu ilişkiyle ilgili çalışmaların çoğu, bakterilerin ÖYA içerisine girip kendilerini dış faktörlerden korumaları ve çoğalmaları ile ilgilidir. Amip hücreleri içerisinde yaşayan bu bakterilere “Amiplere dirençli bakteriler (ADB)” denilmektedir (Greub ve Raoul., 2004; Thomas ve diğ., 2010). *Legionella pneumophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium leprae* ve *Mycobacterium avium* gibi bakteriler bilinen ADB'lerdendir (Tezcan-Merdol ve diğ., 2004, Thomas ve diğ., 2010; Cateau ve diğ., 2014). Bu özellikteki bakterilerin ÖYA'lar ile ilişkileri, aşağıda ayrıntılı olarak açıklandığı gibi, çoğalmalarını/yayılmalarını sağladığı için” bakterilerin lehine sonuçlanır”.

L. pneumophila "lejyoner hastalığı" denilen üst solunum yolu enfeksiyonuna sebep olan ve çeşitli su sistemlerinde, havalandırma sistemlerinde yaşayan bir bakteridir. Yapılan çalışmalarda bu bakterinin *Acanthamoeba* cinsi ÖYA'ları rezervuar olarak kullandığı, bu sayede özellikle insan yapımı su sistemlerinde bakterinin yayılımını arttırdığı belirlenmiştir (Koubar ve diğ., 2011). *Acanthamoeba castellanii* içerisinde üreyen *L. pneumophila*'nın jenerasyon süresinin daha kısa olduğu, morfolojisinin farklılıklar gösterdiği ve yeni yüzey proteinleri ürettiği bulunmuştur (Winiecka-Krusnell ve Linder 2001). *Y. enterocolitica*, kontamine gıdalar ve su ile bulaşan insanlarda enterik hastalıklara sebep olan bir bakteridir. *Y. enterocolitica* ile *A. castellanii* çeşitli sebzeler, evde kullanılan buzdolapları, bulaşık bezleri gibi aynı ekolojik nişleri paylaşmaktadırlar. ÖYA içerisine giren *Yersinia* türlerinin, özellikle su sistemlerinde dezenfeksiyon için yapılan klorlama işlemlerine karşı direnç kazandığı ve hayatta kalabildiği görülmüştür (King ve diğ., 1988). Yapılan bir çalışmada *A. castellanii* sayesinde bu bakterinin hem 25 °C gibi düşük sıcaklıklarda yaşayabildiği hem de besin yokluğu durumunda hayatta kalabilirliğinin arttığı belirtilmiştir (Lambrecht ve diğ., 2013). Yapılan başka bir çalışmada, *Burkholderia cepacia*'nın *A. polyphaga* asidik vakuolü içerisine girerek hücre içinde kendini replike edebildiği gösterilmiştir (Lamothe ve diğ., 2004). Diğer bir çalışmada *Salmonella Typhimurium* bakterisi ile *A. polyphaga* etkileşimi incelenmiş ve bakterinin bu amipin kontraktil kofuluna girerek kendini çoğalttığı bildirilmiştir (Gaze ve diğ., 2003). *S. Typhimurium* ve *S. dublin* ile yapılan çalışmalarda bu bakterilerin *A. polyphaga* ve *A. rhyodes* içerisinde endosimbiyont olarak yaşayabildikleri ve ÖYA'ları enfekte ettikleri süreçte patojenite adalarının gen regülasyonunun yeniden düzenlendiği gösterilmiştir (Bleasdale ve diğ., 2009). *V. cholerae* su ile bulaşan akut diyare ve kolera hastalığına sebep olan patojen bir bakteridir. Doğada bu bakterinin de *A. castellanii* ve *Tetrahymena pyriformis* türü protistleri konak olarak kullandığı anlaşılmıştır (Van der Henst ve diğ., 2016). Yapılan bir çalışmada *V. cholerae* ve *A. castellanii* ile yapılan bir çalışmada bakterinin konak sayesinde bazı fenotipik özelliklerinde hayatta kalmalarını arttırıcı geçici değişimlerin olduğu saptanmıştır (Hoque ve diğ., 2021). *Francisella tularensis* "Tularemî" hastalığına sebep olan fakültatif intrasellüler ve patojen bir Gram negatif bakteridir. Bu patojenin, *A. castellanii* trofozoitlerinin içerisindeki vakuollerde, dışarı salgıladığı veziküllerde ve kistlerin içerisinde yaşayabildiği ve bu simbiyotik yaşam sayesinde sulara ve çamurda aylarca canlı kalabildiği anlaşılmıştır (Abd ve diğ., 2003; Greub ve Raoult, 2004). *Helicobacter pylori* mide ve duodenum'da yerleşen ve duodenum ülseri, mide ülserine sebep olan patojen bir bakteridir. Bu bakterinin de özellikle

sucul ortamlarda *A. castellanii* vakuolüne girerek, yayılımını sağladığı literatürde gösterilmiştir (Winiecka-Krusnell ve diğ., 2009). *M. avium* sucul ve karasal hayvanlardan izole edilen ve solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan fırsatçı patojen bir bakteridir (Salgado ve diğ., 2011). Ayrıca, AIDS hastalarında *M. avium* virülans faktörlerinin salgılanmasında *Acanthamoeba*'nın önemli bir rol oynadığı ve bu bakterileri tedavide kullanılan çeşitli antibiyotiklerin zararlı etkilerinden korudukları bildirilmiştir (Miltner ve Bermudez, 2000).

ÖYA-bakteri ilişkisinin sonuçları her zaman bakterilerin lehine olmamıştır. Nitekim son yıllarda yapılan çalışmalarda ÖYA'ların farklı stratejiler geliştirerek *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* gibi bazı patojen bakterileri fagosite edebildiği gösterilmiştir (Bornier ve diğ., 2021). Başka bir çalışmada, *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*) türünün çeşitli lektinler üreterek aynı ortamı paylaştıkları bakterilerin fagositik etkilerinden korunduğu ve bu sayede gelişimine devam ettiği gösterilmiştir (Farinholt ve diğ., 2019). Long ve diğ. (2018) yaptıkları bir çalışmada, *Acanthamoeba castellanii*, *A. lenticulata*, *A. polyphaga*, *D. discoideum* ve *Vermamoeba vermiformis* türü ÖYA'ların pirinçte patojen olan *Xanthomonas oryzae* bakterisi üzerine bakteriyostatik ve bakterisidal etkileri olduğunu gözlemlemişlerdir.

2.4. ANTİMİKROBİYAL MADDELER VE ÖYA

Doğada farklı mikroorganizma grupları bir arada yaşamakta olup, yaşamsal rekabet amacıyla çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmektedirler. Bu savunma mekanizmalarından birisi de antimikrobiyal maddeler üretimleridir. Antimikrobiyal maddeler, bakteri, küf ve protozoon gibi mikroorganizmaların gelişimini inhibe eden doğal ya da sentetik maddelerdir. Doğal antimikrobiyal maddelerin, bitkiler ve hayvanların yanı sıra, mantarlar ve bakteriler gibi mikroorganizmalardan da elde edildiği bilinmektedir. Bu maddeler enfeksiyonların tedavisinde çok eski yıllardan beri kullanılmaktadır. Alexander Fleming *Penicillium notatum* adlı mantarın antimikrobiyal özelliğini göstererek antibiyotik keşfinin altın çağını başlatmıştır (Fleming, 1929). Ardından 1937'de Streptokok enfeksiyonuna sahip olan farelerin "Prontosil kırmızı" ile tedavi edilebileceği bildirilmiştir (Snodgrass ve Anderson, 1937). Bu boya bugün geniş ölçüde kullanılan sülfanomid olarak adlandırılan antimikrobiyal ilaçların yeni sınıfı için öncülük sağlamıştır. 1944'te *Streptomyces griseus* adlı toprak bakterisinden Streptomisin keşfedilmiştir (Schatz ve diğ., 1944). 1945 yılında *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* türlerinden

Basitrasin adı verilen siklik peptid karışımı antibiyotik bulunmuştur (Johnson ve diğ., 1945). İlerleyen yıllarda, 1952 yılında *Streptomyces orientalis* bakterisinden vankomisin, 1960'lı yıllarda *Acremonium chysogenum* türü fungustan sefalosporinler elde edilmiştir (Sanchez ve diğ., 1988; Levine 2006). 1978 yılında *Actinoplanes teichomyceticus* türü bakteriden glikopeptit grubu antibiyotiklerden olan teikoplanin keşfedilmiştir (Greenwood, 1988). 2000'li yıllarda *Actinomycetes* cinsi bakterilerden lipopeptidler, *Pleurotus mutilus* ve *Pleurotus passeckerianus* türü mantarlardan pleuromutilin grubu antibiyotikler saflaştırılarak enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır (Hutchings ve diğ., 2019). Yapılan son çalışmalarda ise farklı ortamlarda yaşayan mikroorganizmaların antimikrobiyal özellikleri araştırılmıştır. Örneğin deniz diplerinde yaşayan *Xestospongia testudinaria* türü süngerden izole edilen bakterilerin hücresiz sıvılarının antibakteriyel etkisinin olduğu bulunmuştur (Cita ve diğ., 2017). Diğer bir çalışmada mağaralarda yaşayan siyanobakterilerin lipit ekstraktlarının *Enterococcus* cinsi bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Lamprinou ve diğ., 2015).

Enfeksiyonların tedavisinde konak bağışıklık sisteminin bileşenleri olan ve sayıları 12-50 aminoasit dizisi arasında değişen antimikrobiyal peptidlerden (AMP) geniş etkili antibiyotikler olarak yararlanılmaktadır. AMP'ler çeşitli prokaryotik ve ökaryotik canlılardan elde edilmektedir (Marshall, 2003). AMP'lerden ilk keşfedilen grup bakteriyosinlerdir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın ürettiği "S piyosinin", *E. coli* tarafından üretilen "kolisin", *Enterobacter cloacae* tarafından üretilen "kloasinin", *Klebsiella pneumonia*'nın ürettiği "klebsin", *Serratia marcescens*'in ürettiği "marcesinin" ve halobakterilerin ürettiği "halosin" Gram negatif bakterilerin bakteriyosinleridir. Gram pozitif bakterilerden *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* cinsleri de çeşitli bakteriyosinler üretmektedir (Akkoç ve diğ., 2009).

Mikroorganizmaların yanı sıra bitkilerin de antimikrobiyal etkileri uzun yıllardan beri bilinmektedir. Pek çok bitki türünün kök, tohum, çiçek, sap ve yaprak gibi organlarının çeşitli ekstraktlarının ve uçucu yağlarının pek çok mikroorganizma üzerine yüksek antimikrobiyal etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Onbaşlı ve diğ., 2020). Bu bağlamda bitkilerin savunma sistemi bileşenlerinden olan, bitki antimikrobiyal peptitlerinden (AMP'ler) yararlanılmıştır. Örneğin ilk olarak buğdaydan (*Triticum aestivum*) "purothionin" isimli AMP bulunmuştur (De Caley ve diğ., 1972). Sonrasında bitkisel kaynaklı AMP'lere defensinler, snakinler,

puroindolinler, glisin bakımından zengin proteinler, siklotitler, hevein tipi proteinler ve lipid transfer proteinleri gibi çeşitli AMP'ler eklenmiştir (Pelegrini ve Franco, 2005). Bu AMP'lerin virüslere, bakterilere, mantarlara, parazitlere ve protozoonlara karşı güçlü antimikrobiyal aktivite sergiledikleri görülmüştür (Nawrot ve diğ., 2014). Yapılan çalışmalarda soğan tohumlarının (*Allium cepa* L.) ve mısır tohumlarının (*Zea mays*) patojen bir tür olan *Fusarium oxysporum* 'u inhibe eden peptidler (ACE-AMP1 ve zeamatin) ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca, Zeamatine benzer antifungal bir peptidin, keten tohumlarından elde edildiği ve yine patojen bir mantar olan *Candida albicans* 'ı inhibe ettiği gösterilmiştir (Vigers ve diğ., 1991).

Mikroorganizmalar ve bitkiler dışında, hayvanlarda da doğal savunma sisteminin bir elemanı olarak görev alan antimikrobiyal özellikteki çeşitli maddeler keşfedilmiştir. Örneğin böceklerden elde edilen “kekropinler”, bazı yumuşakçalar ve memelilerden izole edilen “defensinler”, örümceklerden ve solucanlardan izole edilen “oksijen bağlayıcı proteinler” çeşitli patojen bakteriler üzerine etkili olan antimikrobiyal maddelerdendir (Li ve diğ., 2002; Marshall, 2003). Örneğin *Drosophila* cinsi sineklerden ve *Hyalophora* cinsi güvelerden elde edilen kekropinlerin yüksek etkili antifungal ajan olduğu saptanmıştır (Ekengren ve Hultmark, 1999). Yine kurbağalardan izole edilen magaininin *Candida albicans* üzerine antifungal etkisi olduğu gösterilmiştir. İnsanların solunum sistemi ve gastrointestinal sisteminden izole edilen “beta- defensin-3” isimli antimikrobiyal peptidlerin *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, vankomisin dirençli *E. faecalis* gibi birçok bakteriye karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Harder ve diğ., 2001). Başka bir çalışmada, deniz kabuklularından elde edilen kitosanın *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7 patojen bakterilerine karşı yüksek antimikrobiyal etkisinin olduğu belirtilmiştir (Ibañez-Peinado ve diğ., 2020).

Günümüzde, mevcut antimikrobiyal maddelere rağmen enfeksiyonlara sebep olan bakteriler bu maddelere karşı dirençli hale gelmektedir. Bu durum enfeksiyonların tedavisinde büyük sorunlara yol açmaktadır. Özellikle antibiyotik dirençli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek doğal ve ekonomik antimikrobiyal madde araştırma çalışmaları devam etmektedir. Son zamanlarda doğal yaşam alanları kirli olan canlıların, bulunduğu ortamdaki patojen mikroorganizmalardan korunmak için antimikrobiyal maddeler açısından bir potansiyele sahip olup olmadığı ile ilgili çalışmalar öne çıkmaktadır (Winnie ve diğ., 2020; Akbar ve diğ., 2019; Akbar ve diğ., 2018). Kirli ortamlarda yaşayan çeşitli sıçan, yılan ve

kurbağaların organ lizatlarının *E. coli* K1, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* and *Klebsiella pneumonia* bakterilerine karşı yüksek antibakteriyel etkisinin olduğu gösterilmiştir (Winnie ve diğ., 2020). Akbar ve arkadaşları hamam böceklerinin bağırsak florasından elde edilen bakterilerin hücresiz sıvılarının, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, MRSA gibi birçok bakteri türüne karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini saptamıştır (Akbar ve diğ., 2018). Timsah bağırsak florasından izole edilen bakterilerin hücresiz sıvılarının da antiviral, antifungal ve antibakteriyel aktivitesinin olduğu bulunmuştur (Siddiqui ve diğ., 2021).

Antimikrobiyal madde potansiyeline sahip bahsedilen canlılara ek olarak son zamanlarda, ÖYA'ların antibakteriyel etkisi ile ilgili kısıtlı sayıda çalışmalar mevcuttur. Nakisah ve Chandrika yaptıkları çalışmada *Acanthamoeba* cinsi ÖYA suşlarının sulu lizatlarının MRSA ve *S. aureus* bakterileri üzerine antibakteriyel etkisinin olduğunu göstermiştir (Nakisah ve Chandrika, 2012). *Acanthamoeba* cinsi ÖYA'lardan elde edilen hücresiz sıvının MRSA üzerine %99'dan fazla, vankomisin dirençli *Enterococcus* üzerine %8 inhibisyon gösterdiği, *S. pneumoniae*, metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA), *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *H. influenza* bakterileri üzerine sırasıyla %100, %10.6, %3.4, %6.1, %11.1 ve %2.5 oranında inhibisyon etkisinin olduğu bildirilmiştir (Iqbal ve diğ., 2014; Tashmukhambetov, 2016). Bu konudaki araştırmalar henüz çok az ve dar kapsamlı olduğundan yeni ve geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.5. STAPHYLOCOCCUS CİNSİ BAKTERİLER

Staphylococcus cinsi bakteriler ilk kez 1878'de Koch tarafından irinde görülmüştür. İnsan ve hayvanlar için fırsatçı patojen, Gram pozitif, kok şeklinde, aerop veya fakültatif anaerob bakterilerdir. İnsan enfeksiyonlarından sorumlu olan türleri genellikle *S. epidermidis*, *S. aureus*, MRSA'dır. *S. aureus* kolonileri besiyerinde genellikle altın rengi veya sarı renklidir. Biyokimyasal tanımlama testlerinde, katalaz pozitif, koagülaz pozitif ve mannitol pozitifdir (Rasigade ve Vandenesch, 2014). *S. aureus* çoğu sağlıklı bireyin derisinde ve mukozalarında bulunan bir bakteridir. Sağlıklı ciltte enfeksiyona neden olmaz fakat kan dolaşımına veya iç dokulara girdiğinde ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Bu bakteri, insan vücudunun farklı bölgelerinde kolonize olur. Sıklıkla, deri ve müköz membran üzerinde, yumuşak dokularda, üriner sistemde enfeksiyonlar meydana getirir (Tong ve diğ., 2015). Bakteri, çeşitli toksinler

(hemolizin), bağışıklıktan kaçan yüzey faktörleri (kapsül ve protein A) ve doku istilasını destekleyen enzimler (hiyalüronidaz) gibi çok çeşitli virülans faktörlerine sahiptir (Turner ve diğ., 2019). *S. aureus*'un enfeksiyonlarının esas kaynağı, enfekte ya da kolonize hastalar ve hastane personelidir. Kişiden kişiye temas yoluyla özellikle sağlık çalışanlarının elleri ile taşınma birincil bulaşma yoludur. *S. aureus*'un yaptığı hastalıklar primer enfeksiyonlar ve toksine bağlı enfeksiyonlar olarak iki gruba ayrılmaktadır. Deri enfeksiyonları, bakteriyemi ve endokardit, pnömoni, osteomyelit ve artrit primer enfeksiyonlar grubuna girmektedir. Toksine bağlı enfeksiyonlar ise besin zehirlenmesi, toksik şok sendromu, soyulmuş deri sendromu gibi hastalıklardır ve bakterinin salgıladığı toksinler aracılığıyla meydana gelmektedir.

S. epidermidis normal deri florasının bir parçasıdır ve sıklıkla herhangi bir semptom göstermeden deri üst katmanına veya mukozaya bağlanır. Cilt yaralandığında (yaralar, yanıklar, intravenöz ilaç kullanımı vb.), bakteri cildin daha derin katmanlarına ve kana geçip enfeksiyonlara sebep olmaktadır. *S. epidermidis*, medikal aletlerin yüzeyinde meydana getirdiği biyofilm tabakası ile özellikle immün sistemi yetersiz hastalar ve sürekli kateter takılı olan hastalar için büyük bir risk oluşturmaktadır. Birçoğu ince bir salgı oluşturur ve bu sayede tıbbi protezlerin yüzeyine de yerleşir. *S. epidermidis*'in penisilin ve metisilini de içeren geniş bir antibiyotik grubuna direnç gösterdiği bilinmektedir. Özellikle, metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) gibi çoklu antibiyotik direncine sahip suşların ortaya çıkması nedeniyle tedavilerde zorluklar meydana gelmektedir (Boucher ve Corey, 2008).

MRSA, sürekli olarak yüksek morbidite ve mortalite nedeniyle klinik bir tehdit oluşturmaktadır (Turner ve diğ., 2019). MRSA taşınımında hastane içi ve yoğun bakım üniteleri en önemli kaynaklardır. Yoğun bakım ve kliniklere gidip gelen hastalar hem hastane içinde hem de hastane dışında yayılmaya yol açmaktadır. Genellikle metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) enfeksiyonlarının tedavisinde Penisilin kullanılırken, MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin kullanılmaktadır. Son yıllarda, uzun süreli veya tekrarlanan vankomisin tedavileri ile birlikte Vankomisin dirençli *S. aureus* (VRSA) ve Vankomisin azalmış duyarlı *S. aureus* (VISA) suşları da ortaya çıkmıştır (Turner ve diğ., 2019). Bu nedenle çoklu antibiyotik direnci geliştirmeye devam eden ve buna bağlı olarak tedavide önemli sorunlara sebep olan patojen *S. aureus* suşları karşısında etkili olabilecek yeni antibakteriyel maddelere ihtiyaç duyulmaktadır (Akyar, 2010; Lee ve diğ., 2012).

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında ülkemizden izole edilmiş çevresel ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarının yine ülkemizden izole edilmiş olan klinik *Staphylococcus* izolatlarına karşı antibakteriyel etki gösterip göstermediğinin araştırılması amaçlanmıştır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışma kapsamında dört adet özgür yaşayan amip (ÖYA) suşuna ait hücresiz sıvılarının (ACM) 12 adet *Staphylococcus* bakterisine karşı antibakteriyel etkisi iki farklı yöntemle (koloni sayım yöntemi ve agar difüzyon yöntemi) karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan iki adet ÖYA suşu (A10, A14) İ.Ü. Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalında önceden yapılan bir yüksek lisans tez çalışmasında (Türkmen, 2012) yüzme havuzlarından, bir adet ÖYA suşu (UG) bir göl suyundan izole edilmiştir. Bir adet ÖYA suşu (*A. castellanii* ATCC 50373) standart suş olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan *Staphylococcus* suşları, İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji kültür koleksiyonlarından temin edilmiştir. *S. aureus* ATCC 29213, MRSA ATCC 43300, *S. epidermidis* ATCC 12228 standart suşlar olarak kullanılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Deneylerde kullanılan mikroorganizmalar.

MİKROORGANİZMALAR	KOD	KAYNAK
ÖYA	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	Standart suş (Toprak)
	A10	Yüzme havuzu
	A14	Yüzme havuzu
	UG	Göl
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Standart suş (Yara)
	MSSA SA1	Klinik izolat
	MSSA SA3	Klinik izolat
	MSSA SA6	Klinik izolat
	MSSA SA7	Klinik izolat

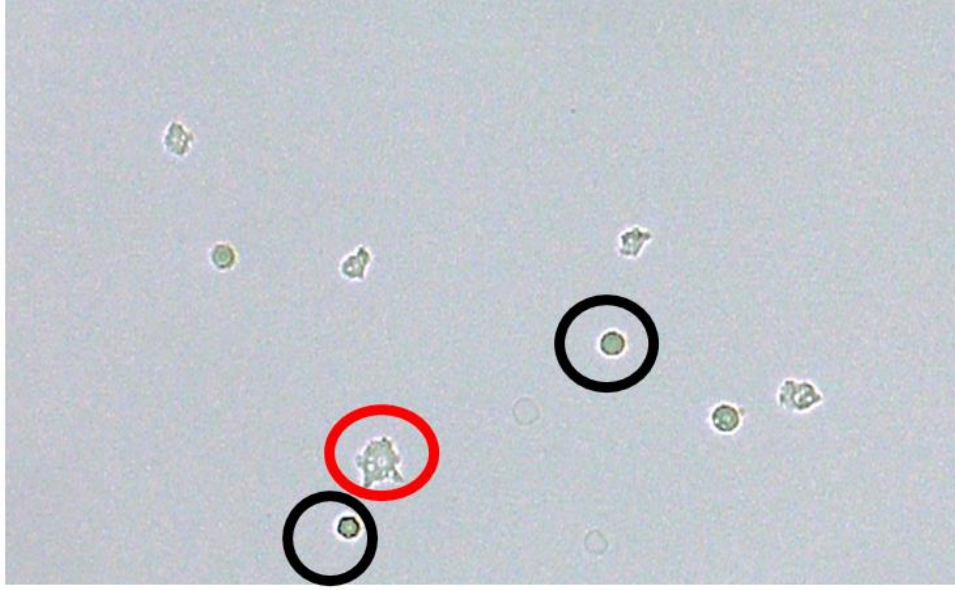
Tablo 3.1 (devam): Deneylerde kullanılan mikroorganizmalar

<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Standart suş
	MRSE SE3	Klinik izolat
	MRSE S4	Klinik izolat
	MSSE S1	Klinik izolat
MRSA	MRSA ATCC 43300	Standart suş (Klinik izolat)
	MRSA SA5	Klinik izolat
	MRSA SA17	Klinik izolat

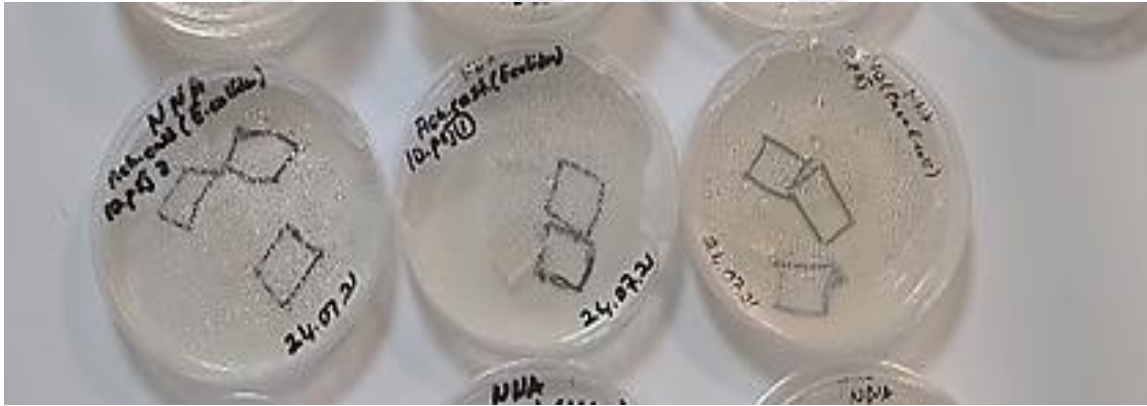
3.1. ÖYA SUŞLARININ YENİDEN KÜLTÜRE EDİLMESİ

-86 C’de freezing medium (FM) içerisinde saklanan ÖYA suşları (A10, A14, UG, *A. castellanii* ATCC 50373) oda sıcaklığına getirilmiş ve üzerine ısı ile inaktive edilmiş *E. coli* ATCC 25922 yayılı non-nutrient agar (NNA) içeren Petri kutularına yayma yöntemiyle ekilerek 30 °C etüvde 3-4 hafta inkübasyona bırakılmıştır (Garcia ve diğ., 2013; Yünlü ve diğ., 2015; Özpınar ve diğ., 2017). Ekim yapılan tüm Petri kutuları, günlük olarak invert mikroskopta (x100) incelenmiştir.

Günlük olarak yapılan invert mikroskop incelemelerinde kistlerin merkezden etrafa doğru yayılmaya başladığı ve sayılarının arttığı, daha sonra bu kistlerin trofozoitlere dönüştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 3.1). Petri kutularında yoğun üremenin görüldüğü gün her bir suş için, amip hücrelerinin görüldüğü agar bölgeleri inverte mikroskop altında işaretlenmiştir. Daha sonra işaretli bölgeden steril şartlarda 1 cm²’ lik agar parçaları kesilmiş ve üzerine ısı ile inaktive edilmiş *E. coli* ATCC 25922 yayılı taze NNA (NNA-*E. coli*) içeren Petri kutularına ters çevrili olarak yerleştirilmiştir (parça kesme yöntemi). Bu şekilde pasajları alınan amip kültürleri 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1: UG suşuna ait NNA’da gözlenen kist (siyah) ve trofozoit formunun (kırmızı) invert mikroskop görüntüsü (x100).

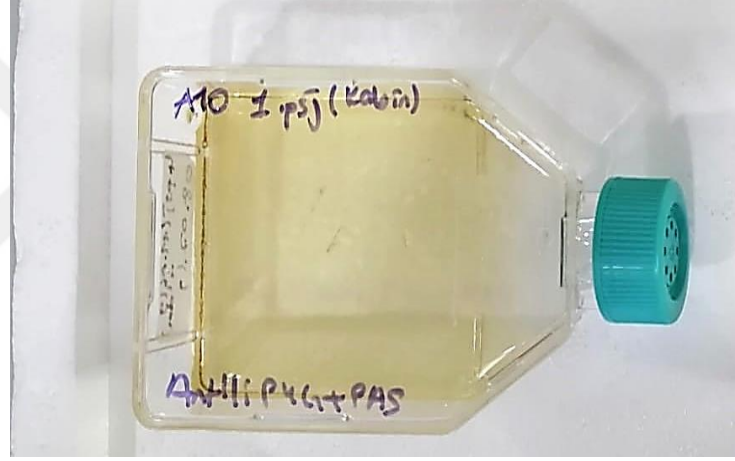


Şekil 3.2: Petri kutusunda yoğun üreme görülen ve işaretlenen bölgelerden parça kesme yöntemiyle pasaj alınması.

Amiplerin pasajlarının alınmasında yukarıda anlatılan “parça kesme yöntemi” yerine “kazıma yöntemi” de uygulanmıştır. Bu yöntemde Petri kutusundaki NNA-*E. coli*’de üremiş kültüre 2-3 mL Page’s Amoeba Saline (PAS) çözeltisi eklenerek, agar yüzeyi steril pipet yardımıyla kazınmıştır. Daha sonra bu sıvıdan 100 µl alınarak taze NNA- *E. coli* içeren Petri kutularına koyulmuş ve 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır (Zeybek ve diğ., 2010).

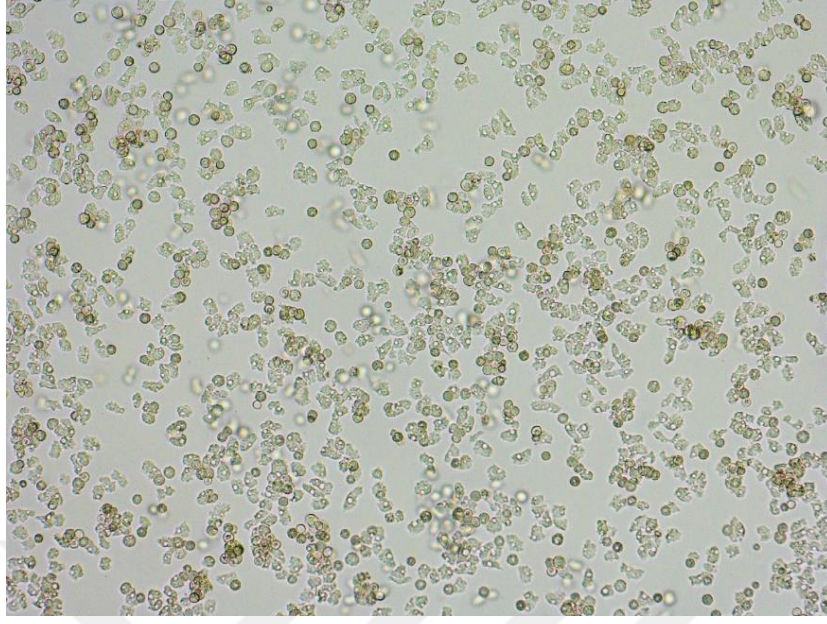
3.2. ÖYA SUŞLARININ AKSENİK KÜLTÜRLERİNİN ELDESİ

NNA-*E. coli*'de yoğun olarak üreme gösteren tüm suşların aksenik kültürlerinin elde edilmesi için proteaz pepton %0.75 (w/v), maya ekstraktı % 0.75 (w/v) ve glikoz % 1.5 (w/v) içeren sıvı besiyeri (PYG) kullanılmıştır. Bu besiyerine kültürün bakteriyel kontaminasyonunu önlemek amacıyla 0.5 mg/mL penisilin ve 0.5 mg/mL streptomisin antibiyotikleri eklenmiştir (Schuster, 2002; Akya ve diğ., 2009; Heredero-Bermejo ve diğ., 2012). NNA-*E. coli* içeren Petri kutularında üretilmiş amip hücreleri PAS ile toplanarak, 10 mL antibiyotikli PYG içeren T-25 doku kültürü flaskı içerisine inoküle edilmiştir (Şekil 3.3). Flasklar 30 °C'de aerobik koşullarda inkübasyona bırakılmış ve “tek tabakalı üreme” görünümü oluşana kadar günlük olarak invert mikroskopta (x100) incelenmiştir (Heredero-Bermejo ve diğ., 2012; Iqbal ve diğ., 2014).



Şekil 3.3: Aksenik kültür elde etmek için kullanılan antibiyotikli PYG içeren T-25 doku kültürü flaskları.

İnkübasyon boyunca her bir ÖYA suşu için “tek tabakalı üreme” görünümünün elde edilme süresi suştan suşa değişkenlik göstermiş ve en az 4-5 hafta sürmüştür. Bu nedenle bazı kültürlerden taze antibiyotikli PYG içeren flasklara pasajları yapılmıştır. Bu amaçla, flask içeriği iyice karıştırıldıktan sonra içinden 2-3 mL sıvı mikropipet yardımıyla alınarak taze antibiyotikli PYG (10 mL) içeren flasklara aktarılmış, 30 °C etüvde aerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Flaskların her gün invert mikroskop incelemesi yapılmıştır. İnkübasyon sonunda amiplerin flask yüzeyine tutunarak “tek tabakalı üreme” oluşturdukları gözlemlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Tek tabakalı aksenik kültürün invert mikroskop görünümü (x100).

Tek tabakalı üreme görüldüğünde kültürleri “antibiyotikten arındırmak için yıkama” aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada öncelikle, flask içindeki kültür ortamı (antibiyotikli PYG) çalkalanmadan steril bir falkon tüpüne aktarılmış ve antibakteriyel etki deneylerinde kullanılmak üzere “yıkama öncesi sıvı (YÖ)” olarak etiketlenmiştir. Boşaltılan flask içine 10 mL PAS çözeltisi aktarılacak fazla çalkalamadan 30 °C etüvde en az bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Flasklara bu şekilde PAS ilave edilirken yüzeye tutunmuş amiplerin yüzeyden ayrılma olasılığı vardır. Bu nedenle inkübasyon süresince, amiplerin tekrar yüzeye tutunması sağlanmış, süre sonunda flasklar mikroskopta incelenerek kontrol edilmiştir. Daha sonra flask içeriği dikkatlice dökülerek yerine taze PAS (10 ml) ilave edilmiş ve aynı işlemler tekrar edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece flasklar PAS çözeltisi ile 3 kez yıkandıktan sonra flask içine 15 mL PYG besiyeri eklenmiş, hafif çalkalandıktan sonra bu besiyerinden 5 mL alınarak steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu sıvı antibakteriyel aktivite deneylerinde kullanılmak üzere, “yıkama sonrası sıvı (YS)” olarak etiketlenmiştir. Antibiyotikten arındırılmış olan flask içeriği, aksenik kültür elde etmek amacıyla 30 °C etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. YÖ ve YS olarak etiketlenmiş tüplerin içerikleri, 3000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvıları 0.22 µm çaplı steril filtrelerden geçirildikten sonra kullanılıncaya kadar -86 °C’de muhafaza edilmiştir.

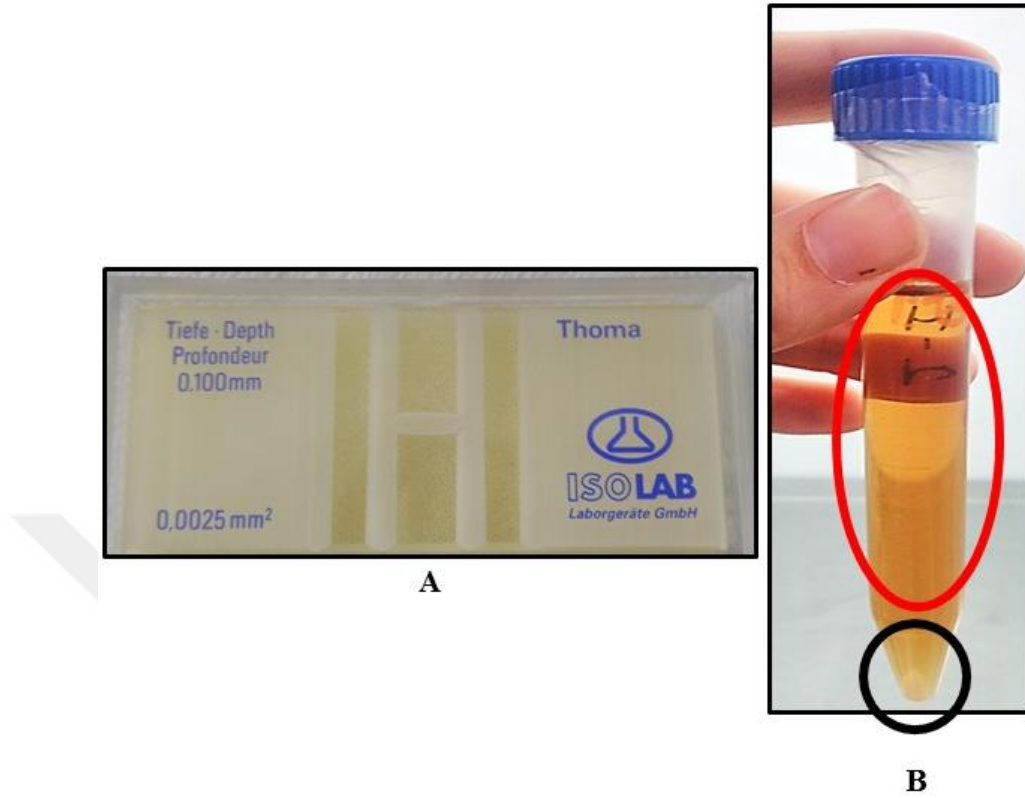
3.3. AKSENİK ÖYA KÜLTÜRLERİNDEKİ AMİP SAYILARININ/ CANLILIKLARININ BELİRLENMESİ VE AMİP HÜCRESİZ SIVILARININ (ACM) ELDESİ

Antibiyotikten arındırılmış ve 48-72 saat inkübe edilmiş aksenik ÖYA kültürlerini içeren flasklar, invert mikroskopta (x100) incelenmiştir. “Tek tabakalı amip üremesi” görülen kültürlerdeki amip sayıları (hücre/ml), Thoma lamı kullanılarak, canlılıkları ise tripan mavisi (%0.4) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Eroğlu ve diğ., 2015; Zeibig, 2014) (Şekil 3.5).

Bu amaçla öncelikle, tek tabakalı üreme gösteren ÖYA kültürlerini içeren flasklar iyice çalkalanmış, flask içeriğinden 20 µl alınarak tripan mavisi ile karıştırılmış (1:1), Thoma lamına koyulmuş ve amip hücreleri mikroskopta sayılmıştır (x100). Amiplerin sayısı aşağıdaki formül kullanılarak trofozoit/ mL olarak hesaplanmıştır (Bogitsh ve diğ., 2018; Iqbal ve diğ., 2014);

- mL’ deki amip trofozoitlerinin sayısı= $A \times 10000$
- $A = 16$ büyük karedeki amip trofozoitlerinin sayısı
- $10000 = 0.1 \text{ mm}^3$ deki sayım sonucunu 1 mL’deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmez.

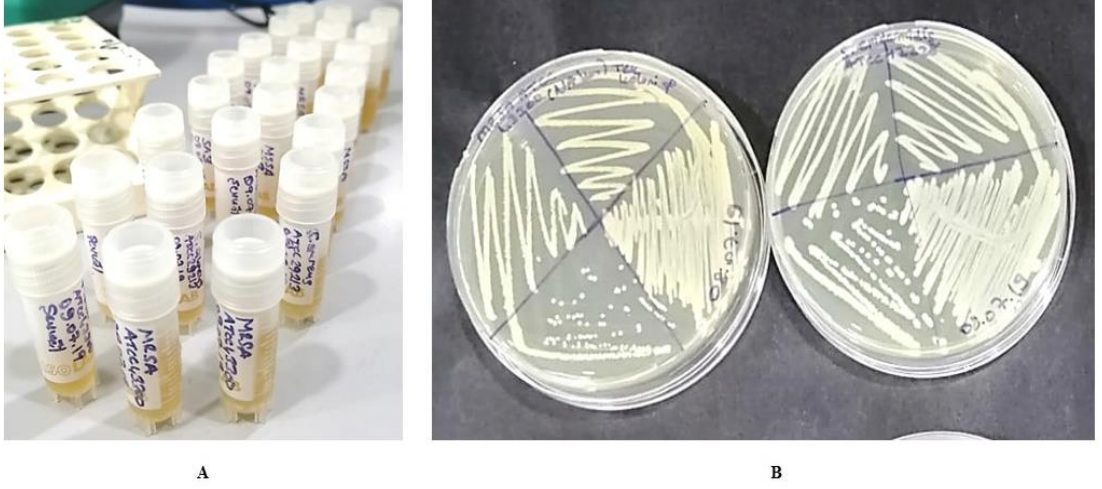
ÖYA kültürlerinin tripan mavisi ile boyanması aşamasında, mavi boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak değerlendirilmiştir. Boyaması ve sayımı yapılan ÖYA kültürlerini içeren santrifüj tüpleri 3000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş, süpernatant kısmı 0.22 µm filtreden geçirilerek amip hücresiz sıvıları (ACM) elde edilmiştir (Şekil 3.5). Elde edilen her bir ACM, antibakteriyel aktivite deneylerinde kullanılmak üzere -86 °C’ye kaldırılmıştır.



Şekil 3.5: A) Thoma lamı B) Santrifüj işlemi sonrası ÖYA suşundan elde edilen hücresiz sıvıyı içeren süpernatant (kırmızı) ve çöken amip hücrelerini içeren pellet (siyah).

3.4. STAPHYLOCOCCUS SUŞLARININ YENİDEN KÜLTÜRE EDİLMESİ

-86 °C’de Gliserollü Tyryptic Soya Broth (GTSB) içeren kryotüplerde saklanmakta olan *Staphylococcus* suşlarının her biri oda ısısına getirilerek Petri kutularındaki Tyryptic Soya Agar (TSA) besiyerine ekilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her bir suş için tek düşen kolonilerden taze TSA’ya azaltma yöntemi ile ekilmiş, 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılarak saf kolonileri elde edilmiştir (Şekil 3.6)



Şekil 3.6: A) -86 °C’den çıkartılan kryptüplerdeki *Staphylococcus* suşları, B) TSA besiyerine ekilmiş *Staphylococcus* suşlarının saf kültürleri.

3.5. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE DENEYLERİ

3.5.1 KOLONİ SAYIM YÖNTEMİ

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi elde edilen her bir ÖYA suşuna ait ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkilerinin olup olmadığının belirlenmesi için öncelikle Bölüm 3.4’te anlatıldığı gibi, *Staphylococcus* suşlarının TSA’da 24 saatlik taze kültürleri hazırlanmıştır. Bu taze bakteri kültürlerinden öze yardımıyla alınan bakteri kolonileri steril tüp içerisindeki 10 mL Fosfat Tampon Salin (PBS) ile süspanse edilmiştir. Bakteri süspansiyonlarının yoğunluğunu belirlemek amacıyla hazırlanan bu süspansiyondan alınan örnekler spektrofotometre küvetine aktarılarak, spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (OD 595) (Şekil 3.7). Hazırlanan bakteri süspansiyonun yoğunluğu spektrofotometrede (PG Instruments T80, İngiltere) 10^8 kob/mL olarak ayarlanmış, antibakteriyel aktivite deneylerinde kullanılmak üzere PBS ile 10^6 kob/mL’ye seyreltilmiştir.



Şekil 3.7: Bakteri süspansiyonu yoğunluğunun ölçüldüğü spektrofotometre.

Daha sonra, hazırlanan her bir bakteri süspansiyonu (10^6 kob/mL), her bir ÖYA-ACM örneğiyle ayrı ayrı karıştırılmış (1:10) ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir karışımın 10^{-1} - 10^{-5} arası sulandırımları yapılmıştır. Hazırlanan her bir dilüsyondan 100'er μl alınarak TSA içeren Petri kutularına 3 tekrarlı ekimleri yapılmış ve tüm ekimler 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, Petri kutularında üreyen koloniler sayılmıştır (Şekil 3.8). Koloni sayıları tespit edildikten sonra aşağıdaki formül kullanılarak mililitredeki bakteri sayısı (kob/mL) belirlenmiştir:

A: Petri kutularında üreyen ortalama koloni sayısı

B: Dilüsyon faktörü

$$\text{Bakteri sayısı (kob/mL)} = A \times B \times 10$$

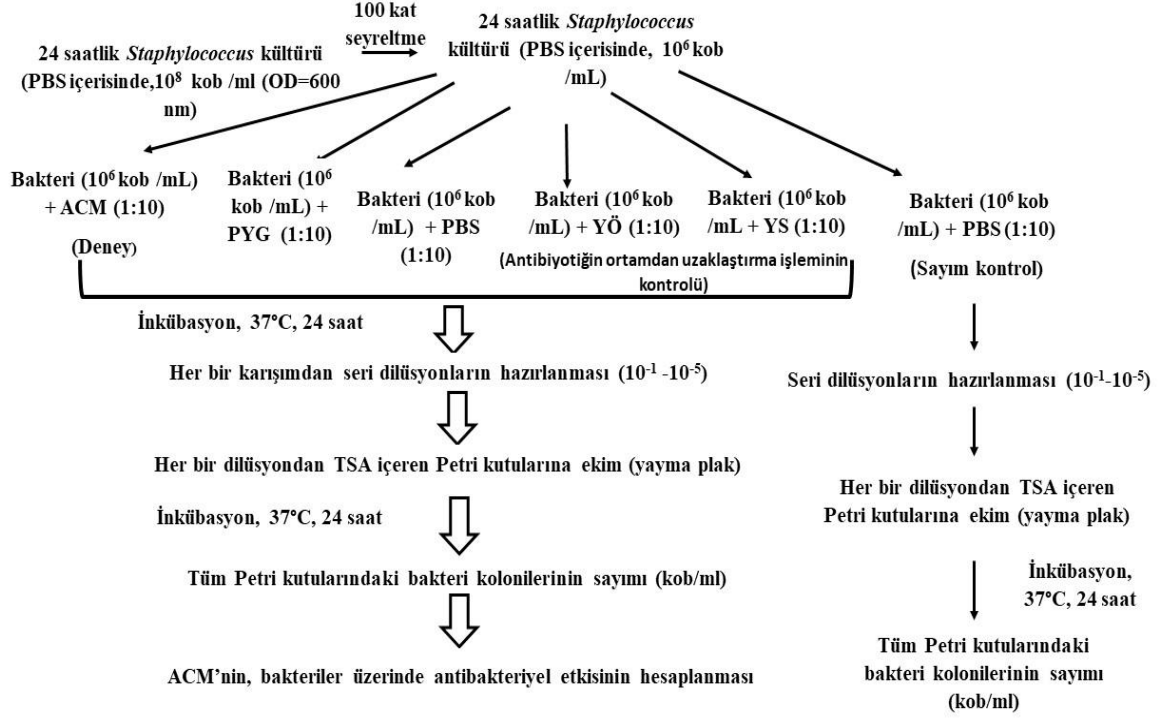
ÖYA akselik kültürlerinin eldesinde (Bölüm 3.2) PYG besiyerine katılmış olan antibiyotiklerin yıkama aşamasında alınan YÖ ve YS etiketli tüplerin içerdiği sıvılar kontrol amacıyla antibakteriyel aktivite deneylerinde kullanılmıştır. Bu amaçla, hazırlanan her bir bakteri süspansiyonu (10^6 kob/mL) her bir YÖ ve YS ile (1:10) oranında karıştırılmış, 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bu karışımlardan 10^{-1} - 10^{-5} arası sulandırımlar hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir dilüsyondan 100'er μl alınarak TSA içeren Petri kutularına 3

tekrarlı ekimleri yapılmış ve Petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üreyen koloniler sayılmış (Şekil 3.8), ve yukarıda verilen formül kullanılarak mililitredeki bakteri sayısı (kob/mL) hesaplanmıştır.

Spektrofotometrik olarak ölçülen bakteri süspansiyonlarından alınan örneklerden sayım kontrolü yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan bakteri süspansiyonu (10^6 kob/mL) ile PBS karıştırılmış (1:10) ve PBS içinde 10^{-1} - 10^{-5} arası sulandırımıları hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir dilüsyondan 100'er µl alınarak TSA içeren Petri kutularına 3 tekrarlı ekimleri yapılmış ve Petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Petri kutularında 30-300 adet koloni görülen sulandırım tüplerindeki koloniler sayılarak ortalama koloni sayıları hesaplanmıştır (Şekil 3.8). Koloni sayıları tespit edildikten sonra yukarıda verilen formül kullanılarak mililitredeki bakteri sayısı (kob/mL) belirlenmiştir.

Antibakteriyel aktivite deneylerinde kontrol grubu olarak amip hücrelerini içermeyen PYG kullanılmıştır. Bu amaçla her bir bakteri süspansiyonu (10^6 kob/mL) PYG ile karıştırılmış (1:10), 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda karışımların 10^{-1} - 10^{-5} arası sulandırımıları hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir dilüsyondan 100'er µl alınarak TSA içeren Petri kutularına 3 tekrarlı ekimleri yapılmış ve Petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üreyen koloniler sayılmıştır (Şekil 3.8). Koloni sayıları tespit edildikten sonra yukarıda verilen formül kullanılarak mililitredeki bakteri sayısı (kob/ml) belirlenmiştir.

Antibakteriyel aktivite deneylerinde test edilen bakterilerin PBS içerisinde üreme durumlarını belirlemek için, her bir bakteri süspansiyonu (10^6 kob/mL) PBS ile karıştırılmış (1:10) ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda karışımların 10^{-1} - 10^{-4} arası sulandırımıları hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir dilüsyondan 100'er µl alınarak TSA içeren Petri kutularına 3 tekrarlı ekimleri yapılmış ve Petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üreyen koloniler sayılmış (Şekil 3.8) ve yukarıda verilen formül kullanılarak mililitredeki bakteri sayısı (kob/mL) belirlenmiştir.



Şekil 3.8: Antibakteriyel aktivite (koloni sayım yöntemi) deney şeması.

3.5.2 AGAR DİFÜZYON YÖNTEMİ

Her bir ÖYA-ACM örneğinin *Staphylococcus* bakterisine karşı antibakteriyel aktivitesinin olup olmadığı 3.5.1’de anlatılan koloni sayım yöntemine ek ve eş zamanlı olarak agar difüzyon yöntemiyle de araştırılmıştır.

Bu yöntemle göre öncelikle 3.5.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan her bir bakteri süspansiyonundan (10^6 kob/mL) Mueller Hinton Agar (MHA) içeren Petri kutularına 100’er µl aktararak 3 tekrarlı ekimleri yapılmıştır. Daha sonra bu besiyerlerine steril cam pastör pipetleri ile 8 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyulara ayrı ayrı her bir ÖYA suşuna ait ACM, YÖ ve YS’lerden 100’er µl eklenmiştir. Kontrol grubu olarak, açılan kuyulara ayrı ayrı PYG ve PBS (100µl) eklenmiştir. Bakteri inhibisyonunun kontrolü amacıyla Penisilin (10 U), Vankomisin (30 µg), Oksasilin (1 µg) içeren antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

Daha sonra tüm Petri kutuları 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları cetvel yardımıyla ölçülerek ortalama zon çapları mm olarak tespit edilmiştir.

3.6. OSMOTOLERANS VE TERMOTOLERANS TESTLERİ

Tez çalışmasında antibakteriyel aktivite deneylerinde kullanılan 4 adet ÖYA suşunun (A10, A14, UG ve *A. castellanii* ATCC50373) patojenitelerini saptamak amacıyla osmotolerans ve termotolerans testleri yapılmıştır (Khan ve diğ., 2001; Caumo ve diğ., 2009; Landell ve diğ., 2013; Norouzi ve diğ., 2021).

Osmotolerans testi için, 0.5 ve 1 M Mannitol içeren Petri kutusunda NNA-*E. coli* besiyeri (%2) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu besiyerlerine her bir ÖYA hücrelerini içeren süspansiyondan (10^3 hücre/mL) ayrı ayrı ekimler yapılmış, Petri kutular 30°C 'de bir hafta inkübasyona bırakılmış ve her gün invert mikroskopta (x100) incelenmiştir. Termotolerans testi için Petri kutusunda NNA-*E. coli* besiyeri (%2) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu besiyerlerine her bir ÖYA hücrelerini içeren süspansiyondan (10^3 hücre/mL) ayrı ayrı ekimler yapılmış, Petri kutuları 37°C ve 42°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. Petri kutuları bir hafta inkübasyona bırakılmış ve her gün invert mikroskopta (x100) incelenmiştir. Osmotolerans ve termotolerans testlerinde kontrol olarak, Petri kutusundaki NNA-*E. coli* besiyerine (%2) her bir ÖYA hücrelerini içeren süspansiyondan (10^3 hücre/mL) ayrı ayrı ekimler yapıp, oda sıcaklığında bir hafta inkübasyona bırakılmış ve her gün invert mikroskopta (x100) incelenmiştir (Martín-Navarro ve diğ., 2008; Valladares ve diğ., 2015; Mohd Hussain ve diğ., 2019).

İnkübasyon sonunda tüm Petri kutularındaki ÖYA hücreleri (merkezden yaklaşık 20 mm'ye kadar olan bölge) invert mikroskop (x100) altında sayılmıştır. Sayım sonucunda hücre sayılarına göre her bir ÖYA suşunun osmotolerans ve termotolerans derecesi, sıfır hücre için “-”, bir-15 hücre için “+”, 15-30 hücre için “++” ve >30 hücre için olarak “+++” olarak değerlendirilmiştir. (Caumo ve diğ., 2009; Landell ve diğ., 2013; Norouzi ve diğ., 2021)

3.7 ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.7.1. Non-Nutrient Agar

ÖYA suşlarının üretilmesi için kullanılan besiyerdir (Jacquier ve diğ., 2013; Zeybek ve diğ., 2010).

Agar (Biolife, İtalya)	15 g
Distile su	1000 mL

15 g agar tartılıp, 1000 mL olacak şekilde distile su eklenmiş, karıştırılarak otoklavda (121 °C, 1.2 atm, 15 dk) steril edilmiştir. Sterilizasyon sonunda 45 °C'ye soğutulup, aseptik şartlarda Petri kutularına 10-15 mL paylaştırılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

3.7.2. 0.5 M Mannitol İçeren Non-Nutrient Agar

ÖYA suşlarının osmotolerans testi için kullanılan besiyeridir (Landell ve diğ., 2013; Norouzi ve diğ., 2021).

Agar (Biolife, İtalya)	15 g
D-Mannitol	91.1 g
Distile su	1000 mL

3.7.3. 1 M Mannitol İçeren Non-Nutrient Agar

ÖYA suşlarının osmotolerans testi için kullanılan besiyeridir (Landell ve diğ., 2013; Norouzi ve diğ., 2021).

Agar (Biolife, İtalya)	15 g
D-Mannitol	182.2 g
Distile su	1000 mL

3.7.4. Isı ile inaktive edilmiş *E. coli* süspansiyonu

ÖYA suşlarının kültürlerinin elde edilmesinde kullanılan süspansiyondur.

Nutrient Agar besiyerinde üretilen 24 saatlik *E. coli* ATCC 25922 kültürünün 500 mL PAS çözeltisi içerisinde yoğun süspansiyonu hazırlanmış ve otoklavda (121 °C, 1.2 atm, 15 dk) steril edilmiştir. Daha sonra süspansiyon oda sıcaklığına getirilmiş ve buzdolabına (+4°C) kaldırılmıştır.

3.7.5. Tyryptic Soya Agar (TSA)

Staphylococcus suşlarının üretilmesi için kullanılan besiyeridir.

Tyryptic Soya Broth (Biolife, İtalya)	33 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Tüm maddeler tartılarak üzerine 1000 mL olacak şekilde distile su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra otoklavda (121 °C, 1.2 atm, 15 dk) steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından 45°C'ye soğutulduktan sonra aseptik koşullarda steril Petri kutularına 10-15 mL aktarılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

3.7.6. Pepton Maya Ekstrakt Glukoz (PYG) Besiyeri

ÖYA suşlarının aksenik kültürlerinin eldesi için 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)	15 g
Sodyum klorür (NaCl) (Sigma Aldrich, ABD)	0.12 g
Magnezyum Sülfat Heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.003g

Kalsiyum Klorid (CaCl_2) (Sigma Aldrich, ABD)	0.003g
Sodyum Fosfat Dibazik (Na_2HPO_4) (Sigma Aldrich, ABD)	0.142g
Potasyum Fosfat Monobazik (KH_2PO_4) (Sigma Aldrich, ABD)	0.136g
Distile su	1000 mL

pH:7.2±0.2

Yukarıda verilen maddeler tartılarak 1000 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti karıştırılarak otoklavda (121 °C, 1.2 atm, 15 dk) steril edilmiş, oda sıcaklığına getirildikten sonra buzdolabına (+4°C) kaldırılmıştır.

3.7.7. Penisilin Çözeltisi

ÖYA suşlarının aksenik kültürlerinin eldesi için kullanılan antibiyotik çözeltisidir (Akya ve diğ., 2009; Schuster, 2002).

Penisilin (Sigma Aldrich, ABD)	0.005 g
Distile su	10 mL

Yukarıda verilen miktarda Penisilin tartılarak 10 mL distile suda çözülmüş, steril filtreden (0.22µm) geçirilerek steril bir tüpe aktarılmıştır. Hazırlanan antibiyotik çözeltisi buzdolabına (+4°C) kaldırılmıştır.

3.7.8. Streptomisin Çözeltisi

ÖYA suşlarının aksenik kültürlerinin eldesi için kullanılan antibiyotik çözeltisidir (Akya ve diğ., 2009; Schuster, 2002).

Streptomisin (Sigma Aldrich, ABD)	0.005 g
Distile su	10 mL

Yukarıda verilen miktarda Streptomisin tartılarak 10 mL distile suda çözülmüş, steril filtreden (0.22µm) geçirilerek steril bir tüpe aktarılmıştır. Hazırlanan antibiyotik çözeltisi buzdolabına (+4°C) kaldırılmıştır.

3.7.9. Antibiyotik İçeren Pepton Maya Ekstraktı Glikoz (PYG) Besiyeri

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

Streptomisin çözeltisi	500 µl
Penisilin çözeltisi	500 µl
PYG	10 mL

3.7.6’da anlatıldığı gibi hazırlanmış olan steril PYG besiyerinin içerisine aseptik şartlarda penisilin ve streptomisin çözeltisi eklenmiştir.

3.7.10. Page’s Amoeba Saline (PAS)

ÖYA suşlarının kültürlerinin hazırlanmasında, ÖYA kültürlerinin antibiyotikten arındırılma işleminde ve ısı ile inaktive edilmiş *E. coli* süspansiyonu hazırlanmasında kullanılan çözeltidir (Aky ve diğ., 2009; Health Protection Agency, 2004; 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) (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 otoklavda (121 °C, 1.2 atm, 15 dk) steri edilmiş, oda sıcaklığına getirildikten sonra buzdolabına (+4°C) kaldırılmıştır.

3.7.11. Fosfat tampon Salin (PBS)

Antibakteriyel aktivite deneylerinde dilüsyonların hazırlanmasında kullanılan tampon çözeltilidir.

Sodyum klorür (NaCl) (Sigma Aldrich, ABD)	7.9 g
Sodyum Fosfat Dibazik (Na ₂ HPO ₄) (Sigma Aldrich, ABD)	2.83 g
Sodyum Fosfat Monobazik (NaH ₂ PO ₄) (Sigma Aldrich, ABD)	0.28 g
Distile su	1000 mL

pH:7.4±0.2

Hazırlanan PBS çözeltilisi otoklavda (121 °C, 1.2 atm, 15 dk) steril edilmiş, oda sıcaklığına getirildikten sonra buzdolabına (+4°C) kaldırılmıştır.

3.7.12. 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

PYG ve DMSO yukarıda verilen miktarlarda karıştırılarak otoklavda (121 °C, 1.2 atm, 15 dk) steril edilmiştir. Çözelti oda sıcaklığına getirildikten sonra içerisine aseptik şartlarda, yukarıda verilen miktarda FBS eklenmiş ve buzdolabına (+4°C) kaldırılmıştır.

3.7.13. Gliserinli Triptik Soy Broth (GTSB)

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

Gliserin	600 mL
TSB	30 g
Distile su	400 mL

Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda (121 °C, 1.2 atm, 15 dk) steril edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına getirilmiş ve buzdolabına (+4 °C) kaldırılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. AKSENİK KÜLTÜRLERDEKİ ÖYA SAYILARININ VE CANLILIKLARININ TESPİTİ

Tek tabakalı üreme görülen her bir aksenik ÖYA kültüründen alınan örneklerin Thoma lamında sayımları sonucu elde edilen amip hücre sayıları Tablo 4.1’de verilmiştir. Aynı kültürlerden alınan örneklerin Tripan mavisi ile boyanması sonucunda trofozoitlerin canlı oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: ÖYA aksenik kültürünün Thoma lamında tripan mavisi ile muamelesi sonucu ışık mikroskobu görüntüsü (x100); canlı trofozoit (beyaz işaretli) ve ölü trofozoit (mavi işaretli).

Tablo 4.1: Aksenik ÖYA kültürlerinin hücre sayım sonuçları.

ÖYA Suşları (Kod)	Hücre Sayısı (Hücre/mL)
<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	3×10^5
A10	8×10^5
A14	5×10^5
UG	1×10^5

4.2 ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE DENEYLERİ

4.2.1 KOLONİ SAYIM YÖNTEMİ SONUÇLARI

Dört adet ÖYA-ACM örneğinin (*A. castellanii* ATCC 50373, A10, A14, UG), 12 adet *Staphylococcus* (*S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, MRSA ATCC 43300, MSSA SA1, MSSA SA3, MSSA SA6, MSSA SA7, MRSE SE3, MRSE S4, MSSE S1, MRSA SA5, MRSA SA17) suşları üzerine antibakteriyel etkilerinin koloni sayım yöntemine göre sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Koloni sayım yöntemine göre ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerine antibakteriyel etkileri.

Mikroorganizma		Bakteri Sayısı (kob/mL)					İnhibisyon (%)			
<i>Staphylococcus</i> suşları	ÖYA suşları (kod)	PBS (Sayım)	PBS (İnkübasyon)	PYG	ACM	YÖ	YS	AI	TI	BI
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	1.64x10 ⁵	1.02x10 ⁵	2.36 x10 ⁷	0.23x 10 ⁷	0	1.25x10 ⁷	47.03	90.25	43.22
	A10	1.64x10 ⁵	1.02x10 ⁵	2.36 x10 ⁷	8.7x10 ⁷	0	1.56x10 ⁷	33.90	-	-
	A14	0.09 x10 ⁵	0.07x10 ⁵	0.32 x10 ⁷	0.16 x10 ⁷	0	0.13 x10 ⁷	59.37	50	-
	UG	1.64x10 ⁵	1.02x10 ⁵	2.36 x10 ⁷	0.38 x10 ⁷	0	0.25x10 ⁷	89.41	83.9	-
MSSA SA1	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	1.76x10 ⁵	0.9x10 ⁵	8.9x10 ⁷	22.5x10 ⁷	0	17.2x10 ⁷	-	-	-
	A10	1.34x10 ⁵	0.94x10 ⁵	2.5x10 ⁷	21.5x10 ⁷	0	5.9x10 ⁷	-	-	-
	A14	1.76x10 ⁵	0.9x10 ⁵	8.9x10 ⁷	5.1x10 ⁷	0	1.17x10 ⁷	86.85	42.7	-
	UG	1.34x10 ⁵	0.94x10 ⁵	2.5x10 ⁷	27.1x10 ⁷	0	1.6x10 ⁷	36	-	-

Tablo 4.2 (devam): Koloni sayım yöntemine göre ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerine antibakteriyel etkileri.

Mikroorganizma		Bakteri Sayısı (kob/mL)						İnhibisyon (%)		
<i>Staphylococcus</i> suşları	ÖYA suşları (kod)	PBS (Sayım)	PBS (İnkübasyon)	PYG	ACM	YÖ	YS	Al	Ti	Bi
MSSA SA3	A. <i>castellani</i> ATCC 50373	1.38x10 ⁵	1.28x10 ⁵	2.64x10 ⁷	0.06x10 ⁷	0	0.74x10 ⁶	71.96	97.87	25.90
	A10	1.38x10 ⁵	1.28x10 ⁵	2.64x10 ⁷	2.86x10 ⁷	0	1.91x10 ⁷	27.65	-	-
	A14	1.38x10 ⁵	1.28x10 ⁵	2.64x10 ⁷	0.06x10 ⁷	0	0.29x10 ⁷	89.01	97.61	8.59
	UG	1.38x10 ⁵	1.28x10 ⁵	2.64x10 ⁷	5.8x10 ⁷	0	1.38x10 ⁷	47.72	-	-
MSSA SA6	A. <i>castellani</i> ATCC 50373	0.89x10 ⁵	1x10 ³	3.17x10 ⁷	30 x10 ⁷	0	27.4 x10 ⁷	-	-	-
	A10	0.89x10 ⁵	1x10 ³	3.17x10 ⁷	11.5 x10 ⁷	0	23.1 x10 ⁷	-	-	-
	A14	0.89x10 ⁵	1x10 ³	3.17x10 ⁷	17.9 x10 ⁷	0	29.7 x10 ⁷	-	-	-
	UG	0.89x10 ⁵	1x10 ³	3.17x10 ⁷	29.9 x10 ⁷	0	28.8 x10 ⁷	-	-	-

Tablo 4.2 (devam): Koloni sayım yöntemine göre ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerine antibakteriyel etkileri.

Mikroorganizma		Bakteri Sayısı (kob/mL)						İnhibisyon (%)		
<i>Staphylococcus</i> suşları	ÖYA suşları (kod)	PBS (Sayım)	PBS (İnkübasyon)	PYG	ACM	YÖ	YS	Al	Ti	Bi
MSSA SA7	A. <i>castellani</i> ATCC 50373	0.41x10 ⁵	0.1x10 ⁵	1.53x10 ⁸	1.74x10 ⁸	0	0.48x10 ⁸	68.62	-	-
	A10	0.41x10 ⁵	0.1x10 ⁵	1.53x10 ⁸	2.72x10 ⁸	0	1.80x10 ⁸	-	-	-
	A14	0.41x10 ⁵	0.1x10 ⁵	1.53x10 ⁸	0.75x10 ⁸	0	0.23x10 ⁸	84.96	50.98	-
	UG	0.33 x10 ⁵	0.1x10 ⁵	0.33 x10 ⁷	17.6 x10 ⁷	0	1.34 x10 ⁷	-	-	-
S. <i>epidermidis</i> ATCC 12228	A. <i>castellani</i> ATCC 50373	0.97 x10 ⁵	8.2x10 ⁵	6.6x10 ⁷	20.1x10 ⁷	0	8.2x10 ⁷	-	-	-
	A10	1.9x10 ⁵	25.1x10 ⁵	22.7x10 ⁷	45x10 ⁷	0	44x10 ⁷	-	-	-
	A14	0.87 x10 ⁵	3.9x10 ⁵	20x10 ⁷	27.2x 10 ⁷	0	16.6x 10 ⁷	17	-	-
	UG	0.97 x10 ⁵	8.2x10 ⁵	6.6x10 ⁷	3.8 x10 ⁷	0	4.3x10 ⁷	34.84	42.42	7.57

Tablo 4.2 (devam): Koloni sayım yöntemine göre ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerine antibakteriyel etkileri.

Mikroorganizma		Bakteri Sayısı (kob/mL)						İnhibisyon (%)		
<i>Staphylococcus</i> suşları	ÖYA suşları (kod)	PBS (Sayım)	PBS (İnkübasyon)	PYG	ACM	YÖ	YS	AI	TI	BI
MRSE SE3	A. <i>castellani</i> ATCC 50373	0.27x10 ⁵	0.17x10 ³	15.1x10 ⁷	2.37x10 ⁷	0	21.4x10 ⁷	-	84.30	84.30
	A10	0.27x10 ⁵	0.17x10 ³	15.1x10 ⁷	17.9x10 ⁷	0	4.88x10 ⁷	67.68	-	-
	A14	0.27x10 ⁵	0.17x10 ³	15.1x10 ⁷	2.65x10 ⁷	0	4.7x10 ⁷	68.87	82.45	13.57
	UG	0.27x10 ⁵	0.17x10 ³	15.1x10 ⁷	15.3x10 ⁷	0	18.4x10 ⁷	-	-	-
MRSE S4	A. <i>castellani</i> ATCC 50373	0.26 x10 ⁵	1.55x10 ⁵	0.64 x10 ⁷	23.1 x10 ⁷	0	0.38x10 ⁷	40.62	-	-
	A10	0.25x10 ⁵	1.55x10 ⁵	0.83x10 ⁷	1.66x10 ⁷	0	0.24x10 ⁷	71.08	-	-
	A14	0.26 x10 ⁵	1.55x10 ⁵	0.64 x10 ⁷	6.9x10 ⁷	0	0.88 x10 ⁷	-	-	-
	UG	0.25x10 ⁵	1.55x10 ⁵	0.83x10 ⁷	12.1x10 ⁷	0	3x10 ⁷	-	-	-

Tablo 4.2 (devam): Koloni sayım yöntemine göre ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerine antibakteriyel etkileri.

Mikroorganizma		Bakteri Sayısı (kob/mL)						İnhibisyon (%)		
<i>Staphylococcus</i> suşları	ÖYA suşları (kod)	PBS (Sayım)	PBS (İnkübasyon)	PYG	ACM	YÖ	YS	Al	Ti	Bi
MSSE S1	A. <i>castellanii</i> ATCC 50373	1.67x10 ⁵	0.66x10 ³	4.3x10 ⁷	21.9 x10 ⁷	0	21.6 x10 ⁷	-	-	-
	A10	1.67x10 ⁵	0.66x10 ³	4.3x10 ⁷	2.09 x10 ⁷	0	1.41 x10 ⁷	67.21	51.39	-
	A14	1.67x10 ⁵	0.66x10 ³	4.3x10 ⁷	42.6 x10 ⁷	0	6.8 x10 ⁷	-	-	-
	UG	1.67x10 ⁵	0.66x10 ³	4.3x10 ⁷	0.12x10 ⁵	0	18.6 x10 ⁷	-	99.97	99.97
MRSA ATCC 43300	A. <i>castellanii</i> ATCC 50373	0.43x10 ⁵	0.21 x10 ⁵	15.9 x10 ⁷	30x10 ⁷	0	28.8 x10 ⁷	-	-	-
	A10	0.43x10 ⁵	0.21 x10 ⁵	15.9 x10 ⁷	17.5x10 ⁷	0	7.3 x10 ⁷	54.08	-	-
	A14	0.43x10 ⁵	0.21 x10 ⁵	15.9 x10 ⁷	29.8x10 ⁷	0	5.6x10 ⁷	64.78	-	-
	UG	0.43x10 ⁵	0.21 x10 ⁵	15.9 x10 ⁷	26.9x10 ⁷	0	13.2x10 ⁷	16.98	-	-

Tablo 4.2 (devam): Koloni sayım yöntemine göre ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerine antibakteriyel etkileri.

Mikroorganizma		Bakteri Sayısı (kob/mL)						İnhibisyon (%)		
<i>Staphylococcus</i> suşları	ÖYA suşları (kod)	PBS (Sayım)	PBS (İnkübasyon)	PYG	ACM	YÖ	YS	AI	TI	BI
MRSA SA5	A. <i>castellani</i> ATCC 50373	0.4x10 ⁵	5.2x10 ⁵	7.3x10 ⁷	0.29x10 ⁷	0	15.4x10 ⁷	-	96.02	96.02
	A10	0.4x10 ⁵	5.2x10 ⁵	7.3x10 ⁷	5.6 x10 ⁷	0	5.9 x10 ⁷	19.17	23.28	4.11
	A14	0.4x10 ⁵	5.2x10 ⁵	7.3x10 ⁷	5.4 x10 ⁷	0	5.57 x10 ⁷	64.79	26.02	-
	UG	0.4x10 ⁵	5.2x10 ⁵	7.3x10 ⁷	35 x10 ⁷	0	4.9 x10 ⁷	32.87	-	-
MRSA SA17	A. <i>castellani</i> ATCC 50373	0.52x10 ⁵	0.26x10 ⁵	6.6x10 ⁷	0	0	13.9x10 ⁷	-	100	100
	A10	0.67x10 ⁵	0.67x10 ⁴	3.7x10 ⁷	8.8x10 ⁷	0	15.4x10 ⁷	-	-	-
	A14	0.67x10 ⁵	0.67x10 ⁴	3.7x10 ⁷	20.3x10 ⁷	0	3x10 ⁷	18.92	-	-
	UG	0.52x10 ⁵	0.26x10 ⁵	6.6x10 ⁷	0.75 x10 ⁷	0	25.3 x10 ⁷	-	88.63	88.63

ÖYA: Özgür yaşayan amip

AI: Antibiyotik İnhibisyonu

TI: Toplam İnhibisyon

BI: *Staphylococcus* Bakterilerinin İnhibisyonuPBS (Sayım): Spektrofotometrik yöntemle ölçülen PBS içerisindeki *Staphylococcus*'ların agardaki sayıları (sayım kontrol deneyi)PBS (İnkübasyon): *Staphylococcus* bakterilerinin PBS'deki süspansiyonlarının 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonucunda saptanan sayıları

PYG: *Staphylococcus* bakterilerinin PYG'deki süspansiyonlarının 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonucunda saptanan sayıları

YÖ: Antibiyotiğin yıkanmasından önce alınan kültür sıvısının 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonrasında saptanan bakteri sayıları

YS: Antibiyotiğin yıkanmasından sonra alınan kültür sıvısının 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonrasında saptanan bakteri sayıları

ACM: ÖYA'ların aksenik kültürlerinden elde edilen hücresiz sıvılar

- : İnhibisyon etki yok.

Koloni sayım yönteminde, deney gruplarındaki koloni sayıları ile kontrol gruplarındaki koloni sayıları karşılaştırılmış, test edilen her bir ACM örneğinin, *Staphylococcus* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkisinin olup olmadığı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Kaur ve diğ., 2012; Khalilzadeh ve diğ., 2010):

- Toplam İnhibisyon (Tİ %) = $[(A-B / A) \times 100]$

A: Bakterilerin PYG'de 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra saptanan koloni sayıları (kob/mL)

B: Bakterilerin ACM'de 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra saptanan koloni sayıları (kob/mL)

- Antibiyotik İnhibisyonu (Aİ %) = $[(A-C / A) \times 100]$

A: Bakterilerin PYG'de 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra saptanan koloni sayıları (kob/mL)

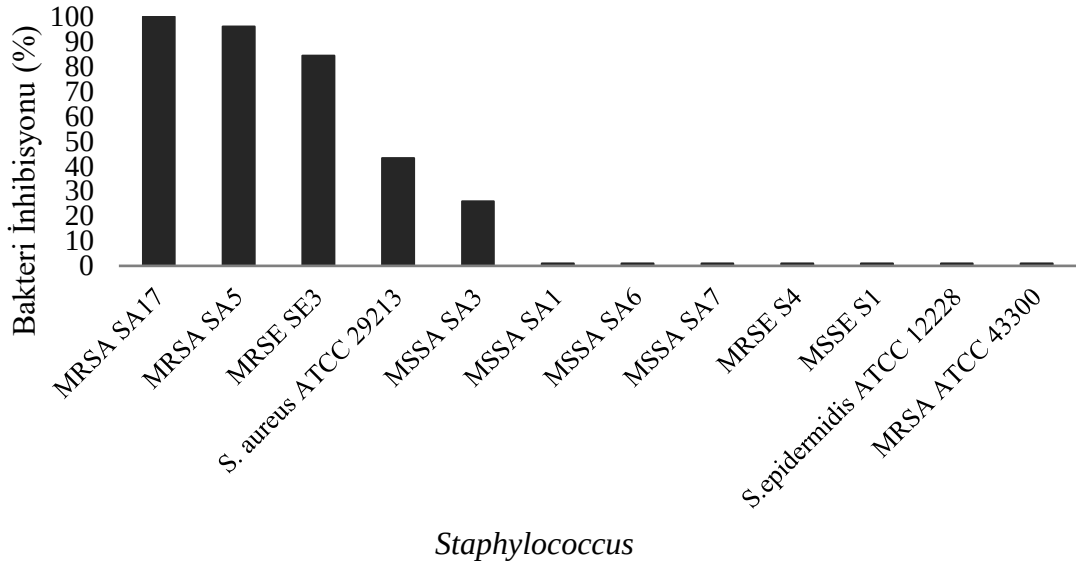
C: YS'de 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası saptanan bakteri sayısı (kob/mL)

- Bakteri İnhibisyonu (Bİ %) = Toplam İnhibisyon (Tİ)- Antibiyotik İnhibisyonu (Aİ)

Koloni sayım yöntemi ile yapılan antibakteriyel aktivite deneyleri sonucunda, A. *castellani* ATCC 50373-ACM örneğinin, 5 adet *Staphylococcus* suşunu (MRSA SA17, MRSA SA5, MRSE SE3, S. *aureus* ATCC 29213, MSSA SA3) sırasıyla %100, %96.02, %84.30, %43.22, %25.90 oranında inhibe ettiği, UG-ACM örneğinin 3 adet *Staphylococcus* suşunu (MSSE S1, MRSA SA17, S. *epidermidis* ATCC 12228) sırasıyla, %99.97, %88.63 %7.57 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. A14-ACM örneğinin, 2 adet *Staphylococcus* suşunu (MRSE SE3, MSSA SA3) sırasıyla % 13.57 ve % 8.59 oranında, A10-ACM örneğinin ise sadece 1 adet *Staphylococcus* suşunu (MRSA SA5) %4.11 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

4.2.1.1 *A. castellanii* ATCC 50373 suşunun hücresiz sıvısının *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi

Koloni sayım yöntemiyle yapılan antibakteriyel aktivite deneylerinde *A. castellanii* ATCC 50373-ACM örneğinin, 12 adet *Staphylococcus* bakterisinden beş tanesi (%41.6) üzerinde inhibe edici etki gösterdiği saptanmıştır. Bu inhibisyon oranları, MRSA SA17, MRSA SA5, MRSE SE3, *S. aureus* ATCC 29213, MSSA SA3 suşları üzerinde sırasıyla %100, %96.02, %84.30, %43.22, ve %25.90 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2 ve Tablo 4.3). Öte yandan aynı örneğin, denenen yedi *Staphylococcus* bakterisi üzerinde inhibe edici etkisinin olmadığı bulunmuştur. *A. castellanii* ATCC 50373-ACM örneğinin en fazla MRSA SA17 suşuna karşı (%100), en az MSSA SA3 suşuna karşı (%25.90) antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.3).



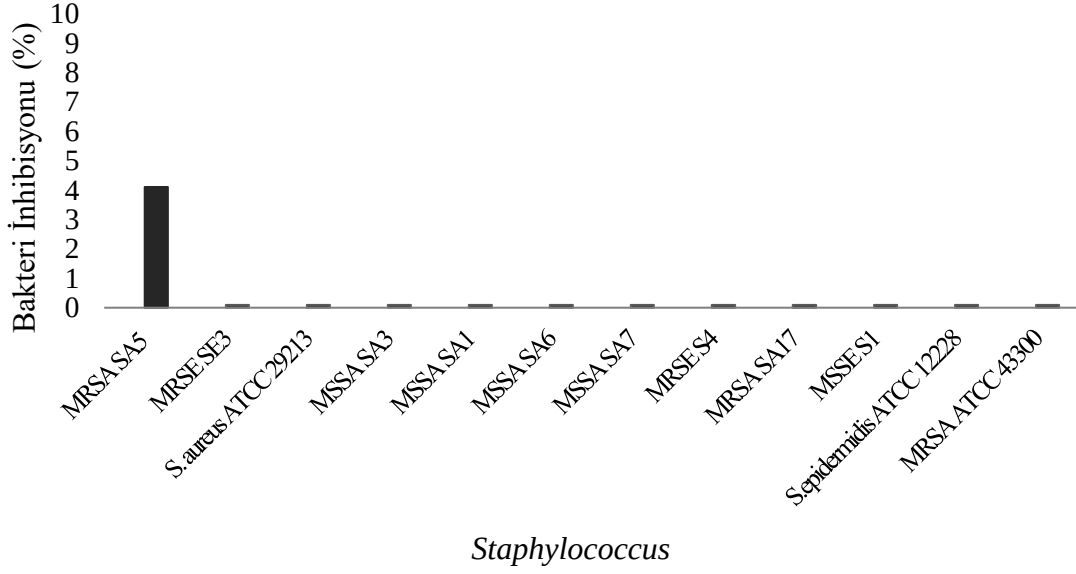
Şekil 4.2: *A. castellanii* ATCC 50373-ACM örneğinin *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre).

Tablo 4.3: *A. castellanii* ATCC 50373-ACM örneğinin *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi (en yüksekte en düşüğe göre).

<i>Staphylococcus</i> suşları (kod)	İnhibisyon (%)
MRSA SA17	100
MRSA SA5	96.02
MRSE SE3	84.30
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	43.22
MSSA SA3	25.90

4.2.1.2 A10 suşunun hücresiz sıvısının *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi

Koloni sayım yöntemiyle yapılan antibakteriyel aktivite deneylerinde A10-ACM örneğinin, 12 adet *Staphylococcus* bakterisinden bir tanesi (%8.3) üzerinde inhibe edici etki gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.3). Bu etkinin, MRSA SA5 suşu üzerinde %4.11 oranında olduğu, diğer suşlara karşı antibakteriyel etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.4).



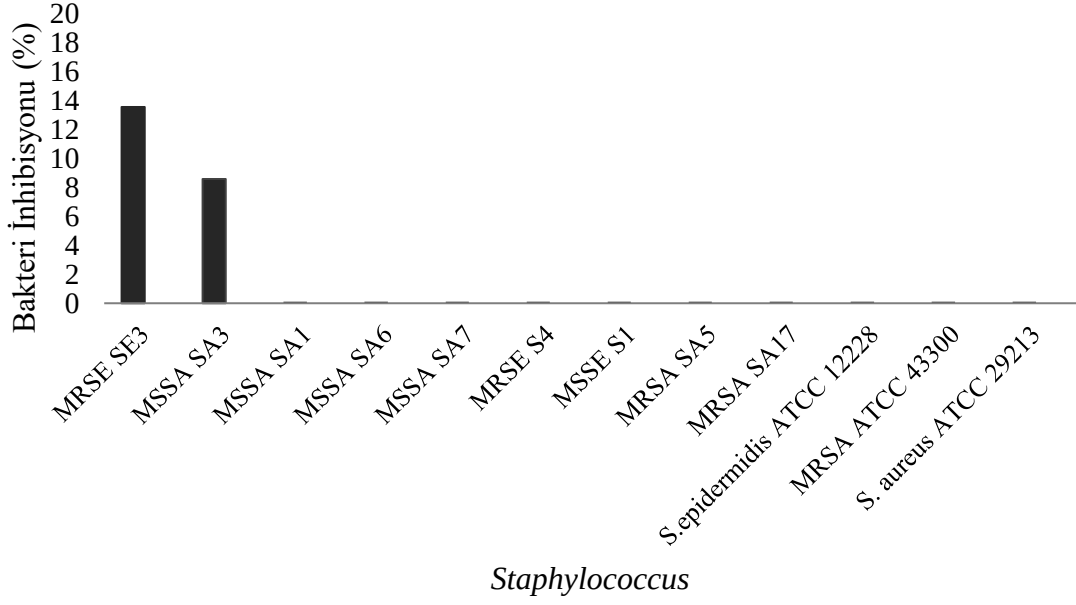
Şekil 4.3: A10-ACM örneğinin *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi.

Tablo 4.4: A10-ACM örneğinin *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi.

<i>Staphylococcus</i> suşları (kod)	İnhibisyon (%)
MRSA SA5	4.11

4.2.1.3 A14 suşunun hücresiz sıvısının *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi

Koloni sayım yöntemiyle yapılan antibakteriyel aktivite deneylerinde A14-ACM örneği, denenen 12 adet *Staphylococcus* bakterisinden iki tanesi (%16.6) üzerinde inhibe edici etki göstermiştir (Şekil 4.4). Bu etkinin, MRSE SE3 ve MSSA SA3 suşları üzerinde sırasıyla, %13.57 ve %8.59 oranında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.5). A14-ACM, diğer 10 adet *Staphylococcus* bakterisine karşı antibakteriyel etki göstermemiştir.



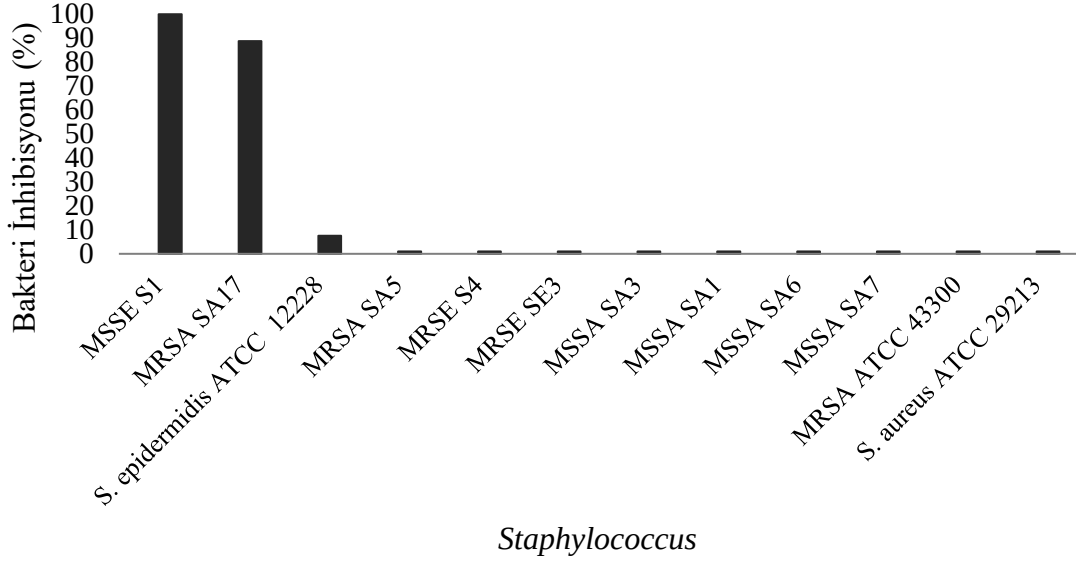
Şekil 4.4: A14-ACM örneğinin *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi.

Tablo 4.5: A14-ACM örneğinin *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre).

<i>Staphylococcus</i> suşları (kod)	İnhibisyon (%)
MRSE SE3	13.57
MSSA SA3	8.59

4.2.1.4 UG suşunun hücresiz sıvısının *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi

Koloni sayım yöntemiyle yapılan antibakteriyel aktivite deneylerinde UG-ACM örneği, denenen 12 adet *Staphylococcus* bakterisinden üçü (%25) üzerinde inhibe edici etki göstermiştir. Bu etkinin, MSSE S1, MRSA SA17 ve *S. epidermidis* ATCC 12228 suşları üzerinde sırasıyla, %99.97, %88.63, %7.57 oranında olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5). UG-ACM örneğinin en fazla MSSE S1 suşuna karşı (%99.97), en az *S. epidermidis* ATCC 12228 suşuna karşı (%7.57) antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.6). UG-ACM örneği, diğer dokuz adet *Staphylococcus* bakterisine karşı antibakteriyel etki göstermemiştir.



Şekil 4.5: UG-ACM örneğinin *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi.

Tablo 4.6: UG-ACM örneğinin *Staphylococcus* suşlarına karşı antibakteriyel etkisi (en yüksekten en düşüğe göre).

<i>Staphylococcus</i> suşları (kod)	İnhibisyon (%)
MSSE S1	99.97
MRSA SA17	88.63
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	7.57

Koloni sayım yöntemine göre yapılan antibakteriyel aktivite deneylerinde denenen tüm ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* bakterileri karşısındaki inhibisyon oranlarının en yüksekten en düşüğe göre sıralaması Tablo 4.7’ de verilmiştir. Dört farklı ÖYA-ACM örneklerinin her birinin test edilen 12 adet *Staphylococcus* bakterisinden en az bir tanesine karşı antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Dört adet ÖYA-ACM örnekleri arasında hem en çok sayıda (5 adet) bakteriye karşı, hem de en yüksek (%100) antibakteriyel etki gösteren örneğin *A. castellanii* ATCC 50373-ACM olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.7: ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerindeki inhibisyon oranları (en yüksekte en düşüğe göre).

<i>Staphylococcus</i> suşları (kod)	ÖYA Suşları (Kod)	İnhibisyon (%)
MRSA SA17	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	100
MSSE S1	UG	99.97
MRSA SA5	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	96.02
MRSA SA17	UG	88.63
MRSE SE3	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	84.30
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	43.22
MSSA SA3	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	25.90
MRSE SE3	A14	13.57
MSSA SA3	A14	8.59
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	UG	7.57
MRSA SA5	A10	4.11

Tablo 4.7 (devam): ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerindeki inhibisyon oranları (en yüksekten en düşüğe göre).

<i>Staphylococcus</i> suşları (kod)	ÖYA Suşları (Kod)	İnhibisyon (%)
MSSA SA1	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-
MSSA SA1	A10	-
MSSA SA1	A14	-
MSSA SA1	UG	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	A10	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	A14	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	UG	-
MSSA SA3	A10	-
MSSA SA3	UG	-
MSSA SA6	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-
MSSA SA6	A10	-
MSSA SA6	A14	-
MSSA SA6	UG	-
MSSA SA7	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-
MSSA SA7	A10	-

Tablo 4.7 (devam): ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerindeki inhibisyon oranları (en yüksekten en düşüğe göre).

<i>Staphylococcus</i> suşları (kod)	ÖYA Suşları (Kod)	İnhibisyon (%)
MSSA SA7	A14	-
MSSA SA7	UG	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	A10	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	A14	-
MRSE SE3	A10	-
MRSE SE3	UG	-
MRSE S4	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-
MRSE S4	A10	-
MRSE S4	A14	-
MRSE S4	UG	-
MSSE S1	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-
MSSE S1	A10	-
MSSE S1	A14	-
MRSA ATCC 43300	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-

Tablo 4.7 (devam): ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerindeki inhibisyon oranları (en yüksekten en düşüğe göre).

<i>Staphylococcus</i> suşları (kod)	ÖYA Suşları (Kod)	İnhibisyon (%)
MRSA ATCC 43300	A10	-
MRSA ATCC 43300	A14	-
MRSA ATCC 43300	UG	-
MRSA SA5	A14	-
MRSA SA5	UG	-
MRSA SA17	A10	-
MRSA SA17	A14	-

Her bir ÖYA-ACM örneğinin denenen 12 adet *Staphylococcus* suşuna karşı gösterdikleri ortalama inhibisyon yüzdeleri Tablo 4.8’de verilmiştir. Ortalama bakteri inhibisyon açısından değerlendirildiğinde, en yüksek değer *A. castellanii* ATCC 50373-ACM örneğine ait olduğu (%29.12), en düşük inhibisyon değerinin yüzme havuzlarından izole edilmiş A10-ACM örneğine ait olduğu (%0.34) bulunmuştur. Ayrıca, göl suyundan izole edilmiş olan UG- ACM örneğinin test edilen *Staphylococcus* suşları üzerinde ikinci en yüksek ortalama inhibisyon değerine sahip olduğu saptanmıştır. Göl suyundan elde edilen ÖYA izolatu ile yüzme havuzlarından elde edilen ÖYA izolatlarına ait ACM’ler karşılaştırıldığında, göl suyundan izole edilen suşa ait ACM’nin *Staphylococcus* bakterileri üzerinde daha yüksek inhibe edici etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.8: ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşlarına karşı ortalama inhibe edici etkileri.

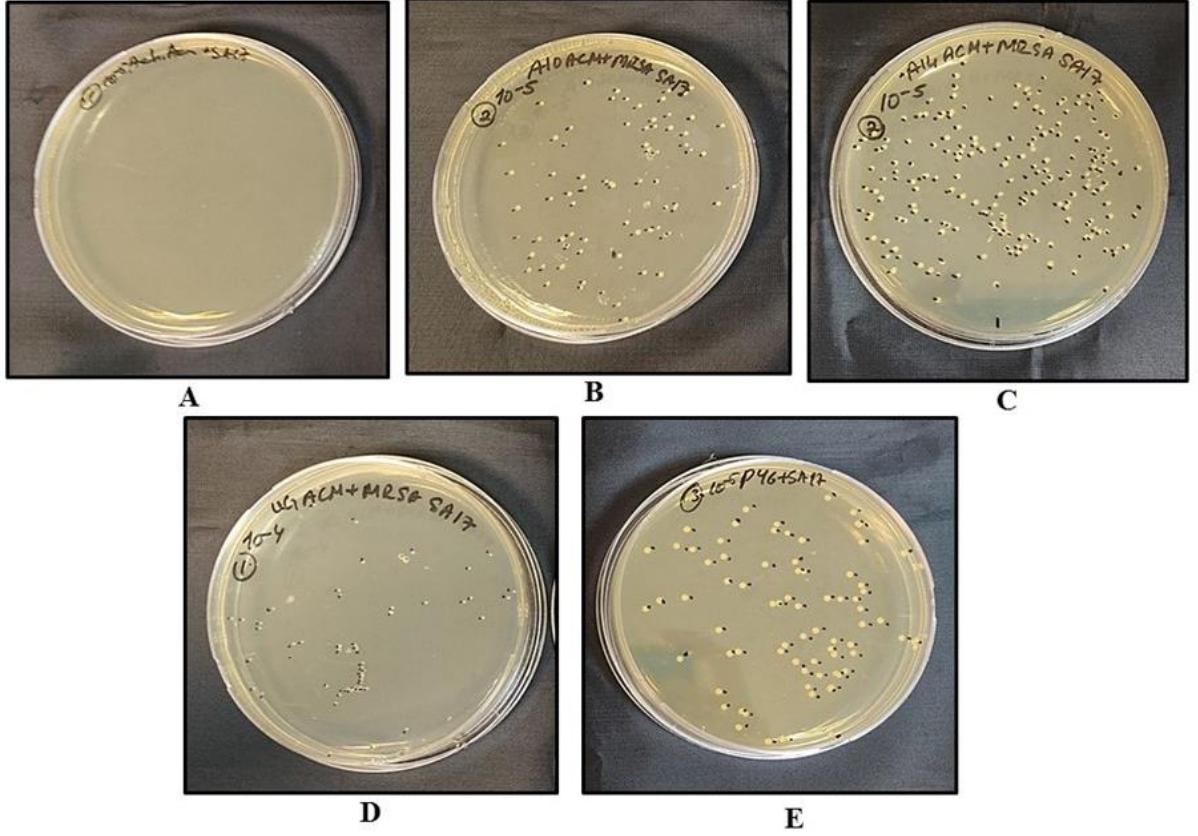
ÖYA Suşları (Kod)	Ortalama Bakteri İnhibisyonu (%)
<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	29.12
UG	16.35
A14	1.85
A10	0.34

Denenen tüm ÖYA-ACM örnekleri karşısında en duyarlı bakteri suşunun %47.15 oranla MRSA SA17 olduğu tespit edilmiştir. Bu suşu, MRSA SA5, MSSE S1, MRSE SE3, *S. aureus* ATCC 29213, MSSA SA3 ve *S. epidermidis* ATCC 12228 suşlarının takip ettiği saptanmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: *Staphylococcus* suşlarının ÖYA-ACM karşısındaki ortalama duyarlılık yüzdeleri.

<i>Staphylococcus</i> Suşları (kod)	Ortalama Duyarlılık (%)
MRSA SA17	47.15
MRSA SA5	25.03
MSSE S1	24.99
MRSE SE3	24.47
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	10.8
MSSA SA3	8.62
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1.9

Şekil 4.6’da ÖYA–ACM örneklerine karşı en çok duyarlılık gösteren MRSA SA17 suşunun antibakteriyel aktivite deney sonuçlarının fotoğrafları gösterilmiştir.



Şekil 4.6: Her bir ÖYA suşuna ait (A. *castellanii* ATCC 50373, A10, A14, UG) ACM örnekleri ve PYG ile birlikte 37°C’de 24 saat inkübe edilen MRSA SA17 suşunun Petri kutusunda üreyen kolonileri.

- A) A. *castellanii* ATCC 50373 -ACM + MRSA SA17 (10^{-5} dilüsyon)
- B) A10-ACM + MRSA SA17 (10^{-5} dilüsyon)
- C) A14-ACM + MRSA SA17 (10^{-5} dilüsyon)
- D) UG-ACM + MRSA SA17 (10^{-4} dilüsyon)
- E) PYG + MRSA SA17 (10^{-5} dilüsyon)

4.2.2 AGAR DİFÜZYON YÖNTEMİ SONUÇLARI

Bu tez çalışmasında ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerindeki olası antibakteriyel etkileri, farklı test yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla koloni sayım yöntemine ek olarak agar difüzyon yöntemi ile de eş zamanlı olarak araştırılmıştır. Agar difüzyon yönteminde elde edilen sonuçlar Tablo 4.10'da görülmektedir.

Tablo 4.10: Agar diffüzyon yöntemine göre, antibiyotiklerin ve ÖYA-ACM örneklerinin, *Staphylococcus* suşları üzerine antibakteriyel etkileri.

Staphylococcus Suşları (Kod)	İnhibisyon zonu (mm)							
	OXA	PEN	VAN	PBS	PYG	(ÖYA)-ACM	YÖ	YS
S. aureus ATCC 29213						(A. castellanii ATCC 50373)-ACM	42	-
						-		
						(A10)-ACM	40	-
						-		
	20	39	21	-	-	(A14)- ACM	41	-
						(UG)-ACM	40	-
						-		
MSSA SA1						(A. castellanii ATCC 50373)-ACM	22.6	-
						-		
						(A10)-ACM	5.3	-
						-		
	21.6	20.3	22.3	-	-	(A14)- ACM	18.3	-
						(UG)-ACM	11	-
						-		

Tablo 4.10 (devam): Agar diffüzyon yöntemine göre, antibiyotiklerin ve ÖYA-ACM örneklerinin, *Staphylococcus* suşları üzerine antibakteriyel etkileri.

<i>Staphylococcus</i> Suşları (Kod)	İnhibisyon zonu (mm)							
	OXA	PEN	VAN	PBS	PYG	(ÖYA)-ACM	YÖ	YS
MSSA SA3						(<i>A. castellanii</i> ATCC 50373)-ACM	20	-
						-		
						(A10)-ACM	9	-
						-		
	21	20	21	-	-	(A14)- ACM	21.6	-
						-		
						(UG)-ACM	9.3	-
						-		
MSSA SA6						(<i>A. castellanii</i> ATCC 50373)-ACM	33	-
						-		
						(A10)-ACM	-	-
						-		
	22	36	23	-	-	(A14)- ACM	32	-
						-		
						(UG)-ACM	31	-
						-		
MSSA SA7						(<i>A. castellanii</i> ATCC 50373)-ACM	13	-
						-		
						(A10)-ACM	10	-
						-		
	24	28	21	-	-	(A14)- ACM	17	-
						-		
						(UG)-ACM	27	-
						-		

Tablo 4.10 (devam): Agar diffüzyon yöntemine göre, antibiyotiklerin ve ÖYA-ACM örneklerinin, *Staphylococcus* suşları üzerine antibakteriyel etkileri.

<i>Staphylococcus</i> Suşları (Kod)	İnhibisyon zonu (mm)							
	OXA	PEN	VAN	PBS	PYG	(ÖYA)-ACM	YÖ	YS
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228						(<i>A. castellanii</i> ATCC 50373)-ACM	24	-
						-		
						(A10)-ACM	-	-
	-	-	-	3.3	-	-		
						(A14)- ACM	24	-
MRSE SE3						(UG)-ACM	23	-
						-		
						(<i>A. castellanii</i> ATCC 50373)-ACM	27.3	-
						3.6		
						(A10)-ACM	7.3	-
MRSE S4	15.6	23	21.6	-	-	-		
						(A14)- ACM	25.6	-
						4.3		
						(UG)-ACM	16.3	-
						-		
MRSE S4						(<i>A. castellanii</i> ATCC 50373)-ACM	23	-
						-		
						(A10)-ACM	-	-
	13	25.6	23.6	-	-	-		
						(A14)- ACM	26	-
MRSE S4						-		
						(UG)-ACM	17.6	-
						-		

Tablo 4.10 (devam): Agar diffüzyon yöntemine göre, antibiyotiklerin ve ÖYA-ACM örneklerinin, *Staphylococcus* suşları üzerine antibakteriyel etkileri.

<i>Staphylococcus</i> Suşları (Kod)	İnhibisyon zonu (mm)							
	OXA	PEN	VAN	PBS	PYG	(ÖYA)-ACM	YÖ	YS
MSSE S1						(<i>A. castellanii</i> ATCC 50373)-ACM	20	-
						-		
						(A10)-ACM	3	-
	7	10	25	-	-	-		
						(A14)- ACM	18	-
MRSA ATCC 43300						-		
						(A10)-ACM	26	-
	-	14	25	-	-	-		
						(A14)- ACM	23	-
						-		
MRSA SA5						(UG)-ACM	24	-
						-		
						(<i>A. castellanii</i> ATCC 50373)-ACM	21	-
						-		
						(A10)-ACM	5.6	-
MRSA SA5	20.3	21.6	24	-	-	-		
						(A14)- ACM	20	-
						-		
MRSA SA5						(UG)-ACM	3	-
						-		

Tablo 4.10 (devam): Agar difüzyon yöntemine göre, antibiyotiklerin ve ÖYA-ACM örneklerinin, *Staphylococcus* suşları üzerine antibakteriyel etkileri.

<i>Staphylococcus</i> Suşları (Kod)	İnhibisyon zonu (mm)							
	OXA	PEN	VAN	PBS	PYG	(ÖYA)-ACM	YÖ	YS
MRSA SA17						(<i>A. castellanii</i> ATCC 50373)-ACM 8	24	-
						(A10)-ACM	28.6	-
	17.3	21.3	21.6	-	-	-	-	-
						(A14)-ACM	26	-
						(UG)-ACM 10	24	-

OXA: Oksasilin, PEN: Penisilin, VAN: Vankomisin, PBS (İnkübasyon): *Staphylococcus* bakterilerinin PBS'deki süspansiyonlarının 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonucunda saptanan sayıları, PYG: *Staphylococcus* bakterilerinin PYG'deki süspansiyonlarının 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonucunda saptanan sayıları, YÖ: Antibiyotiğin yıkanmasından önce alınan kültür sıvısının 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonrasında saptanan bakteri sayıları, YS: Antibiyotiğin yıkanmasından sonra alınan kültür sıvısının 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonrasında saptanan bakteri sayıları, ACM: ÖYA'ların aksenik kültürlerinden elde edilen hücresiz sıvılar, - : İnhibisyon etki yok.

Agar difüzyon yöntemiyle yapılan deneylerde, A14-ACM örneğinin MRSE SE3 suşu üzerinde 4.3 mm, *A. castellanii* ATCC 50373-ACM'nin MRSE SE3 suşu üzerinde 3.6 mm, MRSA SA17 suşu üzerinde 8 mm, UG-ACM'nin MRSA SA17 suşu üzerinde 10 mm inhibisyon zonu oluşturduğu saptanmıştır. Agar difüzyon yönteminde, kontrol grubu olarak kullanılan antibiyotiklerin (Oksasilin, Penisilin, Vankomisin), *S. epidermidis* ATCC 12228 suşu haricindeki *Staphylococcus* suşlarına karşı genellikle 20 mm'nin üzerinde inhibisyon zonu oluşturdukları, ÖYA-ACM örneklerinin antibiyotiklere kıyasla çok daha düşük düzeyde inhibisyon zonu oluşturdukları saptanmıştır.

Koloni sayım yöntemi ve agar difüzyon yöntemiyle yapılan antibakteriyel aktivite deney sonuçları karşılaştırıldığında, koloni sayım yöntemiyle inhibisyon etkisinin saptandığı pek çok deneyde agar difüzyon yöntemiyle inhibe edici bir etki saptanmamıştır (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: Antibakteriyel aktivitenin koloni sayım yöntemi ve agar difüzyon yöntemine göre karşılaştırmalı sonuçları.

<i>Staphylococcus</i> Suşları (kod)	ÖYA Suşları (kod)	İnhibisyon	
		Koloni sayım yöntemi (%)	Agar difüzyon yöntemi (mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	43.22	-
	A10	-	-
	A14	-	-
	UG	-	-
MSSA SA1	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-	-
	A10	-	-
	A14	-	-
	UG	-	-
MSSA SA3	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	25.90	-
	A10	-	-
	A14	8.59	-
	UG	-	-
MSSA SA6	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-	-
	A10	-	-
	A14	-	-
	UG	-	-

Tablo 4.11 (devam): Antibakteriyel aktivitenin koloni sayım yöntemi ve agar difüzyon yöntemine göre karşılaştırmalı sonuçları.

<i>Staphylococcus</i> Suşları (kod)	ÖYA Suşları (kod)	İnhibisyon	
		Koloni sayım yöntemi (%)	Agar difüzyon yöntemi (mm)
MSSA SA7	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-	-
	A10	-	-
	A14	-	-
	UG	-	-
	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	A10	-	-
	A14	-	-
	UG	7.57	-
MRSE SE3	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	84.30	3.6
	A10	-	-
	A14	13.57	4.3
	UG	-	-

Tablo 4.11 (devam): Antibakteriyel aktivitenin koloni sayım yöntemi ve agar difüzyon yöntemine göre karşılaştırmalı sonuçları.

<i>Staphylococcus</i> Suşları (kod)	ÖYA Suşları (kod)	İnhibisyon	
		Koloni sayım yöntemi (%)	Agar difüzyon yöntemi (mm)
MRSE S4	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-	-
	A10	-	-
	A14	-	-
	UG	-	-
	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-	-
MSSE S1	A10	-	-
	A14	-	-
	UG	99.97	-
	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	-	-
MRSA ATCC 43300	A10	-	-
	A14	-	-
	UG	-	-
	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	96.02	-
MRSA SA5	A10	4.11	-
	A14	-	-
	UG	-	-

Tablo 4.11 (devam): Antibakteriyel aktivitenin koloni sayım yöntemi ve agar difüzyon yöntemine göre karşılaştırmalı sonuçları.

<i>Staphylococcus</i> Suşları (kod)	ÖYA Suşları (kod)	İnhibisyon	
		Koloni sayım yöntemi (%)	Agar difüzyon yöntemi (mm)
	<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	100	8
MRSA SA17	A10	-	-
	A14	-	-
	UG	88.63	10

4.3. ÖYA SUŞLARININ OSMOTOLERANS VE TERMOTOLERANS AKTİVİTELERİ

Denenen her bir ÖYA suşunun osmotolerans ve termotolerans testlerinin sonuçları tablo 4.12’de verilmiştir.

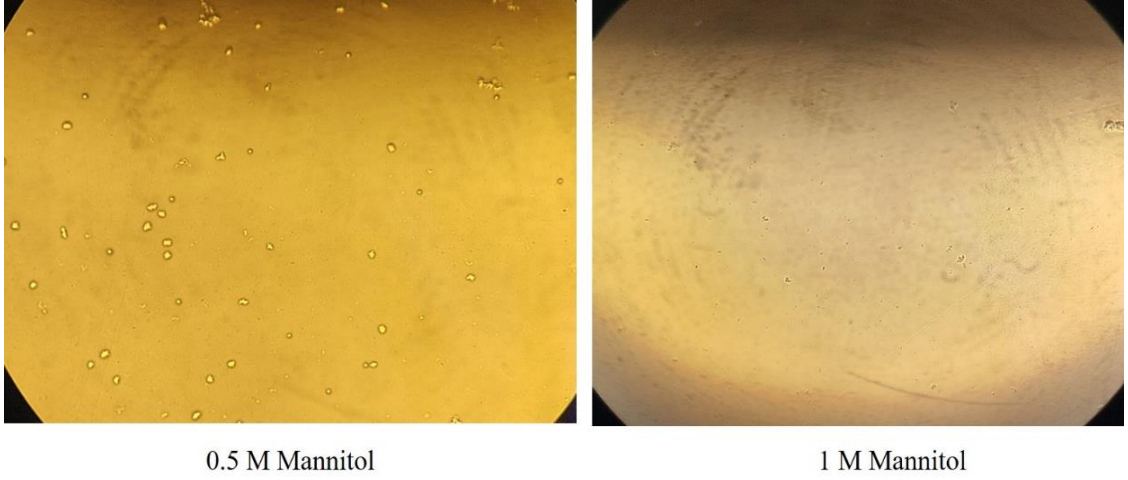
Tablo 4.12: ÖYA suşlarının osmotolerans ve termotolerans test sonuçları.

ÖYA Suşları (Kod)	Üreme Yeteneği			
	0.5 M	1 M	37°C	42°C
	Mannitol	Mannitol		
<i>A. castellanii</i> ATCC 50373	++	-	++	-
A10	-	-	+	-
A14	++	-	+++	-
UG	-	-	-	-

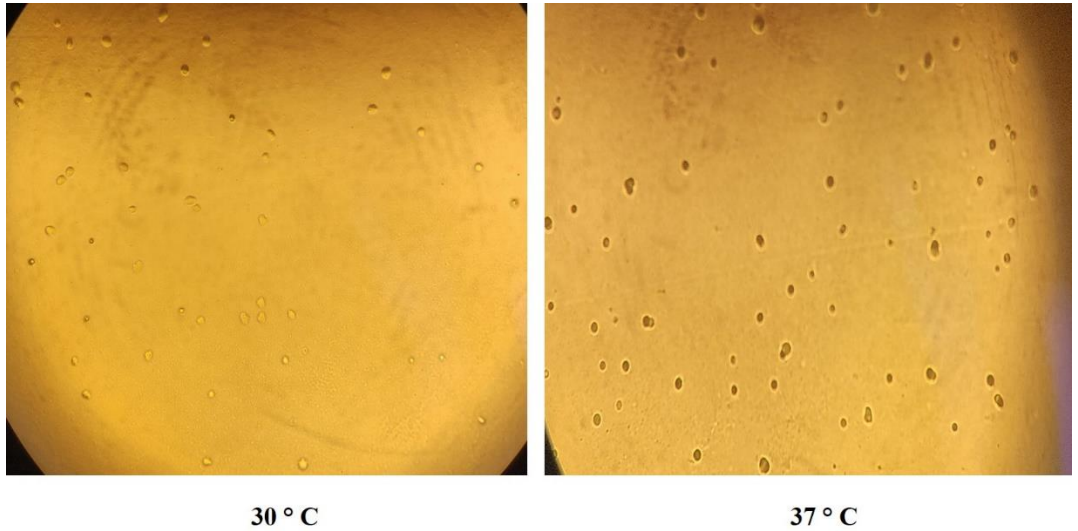
-: Üreme yok

+: Üreme var

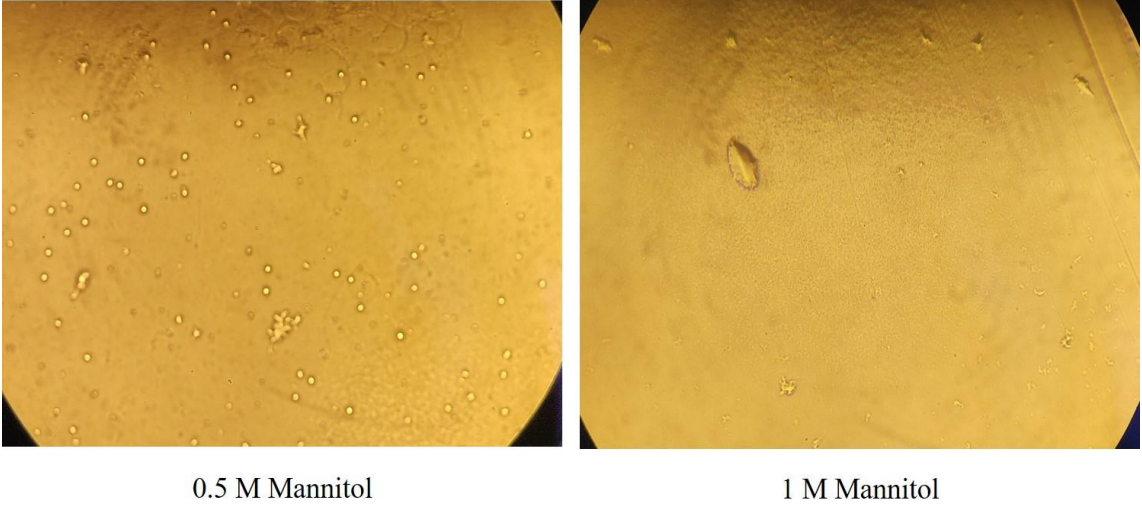
A. castellanii ATCC 50373 ve A14 suşları hem 37°C’de NNA-*E. coli* besiyerinde hem de 0.5 M Mannitol içeren NNA-*E. coli* besiyerinde ürediği halde (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10), A10 suşu sadece 37 °C’de NNA-*E. coli* besiyerinde zayıf üreme göstermiştir. UG suşu ise ne Mannitol içeren NNA-*E. coli* besiyerinde ne de 37 °C sıcaklıkta NNA-*E. coli* besiyerinde üreme göstermemiştir. Test edilen tüm ÖYA suşlarında 42°C sıcaklıkta ve 1 M Mannitol içeren NNA-*E. coli* besiyerlerinde üreme gözlenmemiştir. Bu sonuçlara göre denenen tüm ÖYA suşları apatojen (patojen değil)/zayıf patojen olarak değerlendirilmiştir.



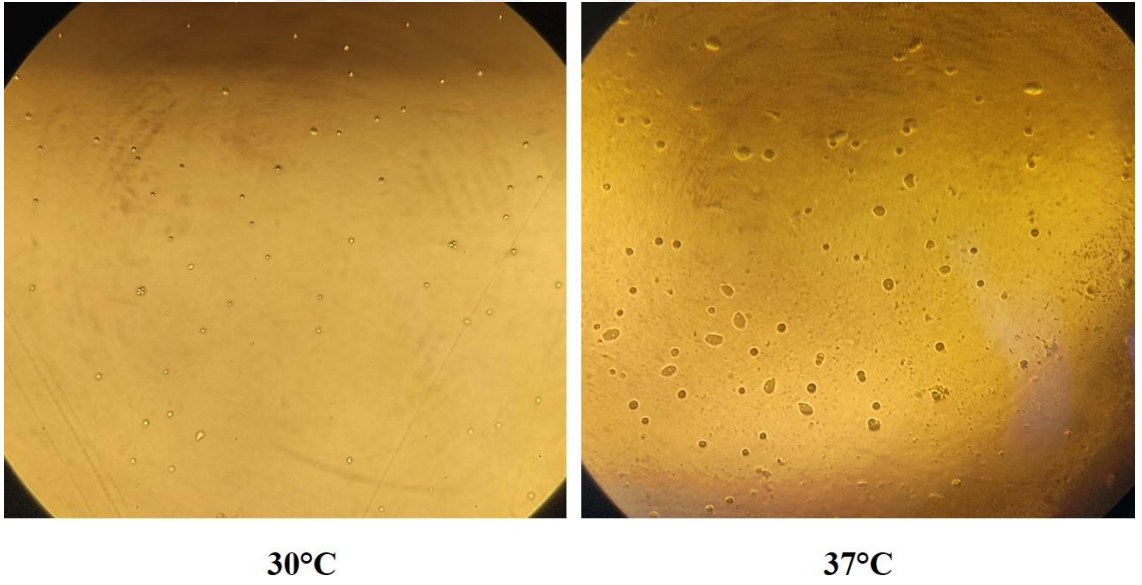
Şekil 4.7: *A. castellanii* ATCC 50373 suşunun 0.5 M ve 1 M Mannitol içeren NNA-*E. coli* besiyerinde bir hafta inkübasyonu sonucu invert mikroskop görüntüsü (x100).



Şekil 4.8: *A. castellanii* ATCC 50373 suşunun 30°C ve 37°C NNA-*E. coli* besiyerinde bir hafta inkübasyonu sonucu invert mikroskop görüntüsü (x100).



Şekil 4.9: A14 kodlu ÖYA suşunun 0.5 M ve 1 M Mannitol içeren NNA-*E. coli* besiyerinde bir hafta inkübasyonu sonucu invert mikroskop görüntüsü (x100).



Şekil 4.10: A14 kodlu ÖYA suşunun 30°C ve 37°C NNA-*E. coli* besiyerinde bir hafta inkübasyonu sonucu invert mikroskop görüntüsü (x100).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

ÖYA'lar toprak, doğal sular, musluk suları, göz yıkama üniteleri, diyaliz birimleri, dental üniteler gibi çeşitli su ortamlarında ve çeşitli yüzeylerde (kontakt lensler ve kutuları vb.) yaşayabilen, önceleri zararsız olarak bilinen ökaryotik mikroorganizmalardır (Schuster, 2002; Cateau ve diğ., 2014). Sonraları özellikle *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia* ve *Vermameoba* cinslerinin insanlarda ciddi enfeksiyonlar meydana getirebildiği keşfedilmiş ve araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Trabelsi ve diğ., 2012; Delafont ve diğ., 2018; Siddiqui ve diğ., 2021). Bu ilgi, birlikte yaşadıkları diğer mikroorganizmalar ile etkileşimlerinin, ekolojilerinin, çeşitliliklerinin, patojenitelerinin ortaya çıkartılması gibi yönlerden de halen devam etmektedir (Akya ve diğ., 2009; Garcia ve diğ., 2013; Cervero-Aragó ve diğ., 2015; Balczun ve Scheid, 2017; Strassman ve Shu, 2017). Bazı bakterilerin (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*), ÖYA'lar tarafından fagosite edilerek onların besin kaynağını oluşturduğu bilinmektedir (Health Protection Agency, 2004; Şenler ve Yıldız, 2010; Cateau ve diğ., 2014). Öte yandan yapılan çalışmalarda bazı bakteri türlerinin, ÖYA hücrelerinin içine girerek onları enfekte ettiği, fagositozdan korunduğu, çoğaldığı, virülans özelliklerini arttırabildiği, üstelik amip hücrelerini lizise uğratarak kendi yayılımlarını sağladıkları tespit edilmiştir (King ve diğ., 1988; Fallon ve Rowbotham, 1990; Winiecka-Krusnell ve Linder, 2001; Tezcan-Merdol ve diğ., 2004; Greub ve Raoult, 2004; Horn ve Wagner, 2004; Rasmussen ve diğ., 2005; Thomas ve McDonell, 2007; Thomas ve diğ., 2008; Akya ve diğ., 2009; Axelsson ve diğ., 2009; Thomas ve diğ., 2010; Scheid ve diğ., 2011; Khan ve Siddiqui, 2014; Zeybek ve Binay, 2014; Delafont ve diğ., 2016). ÖYA'ların bakteriler, virüsler, mantarlar ile etkileşimlerinin ayrıntılı olarak araştırılması, onların daha iyi tanınmaları ve özellikle insanlığın yararına kullanımları açısından ele alınması konusu da oldukça önemli olacaktır. Şöyle ki; günümüzde bazı bakterilerin antibiyotiklere dirençli hale gelmesi bu bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde önemli bir sorundur. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için yeni antimikrobiyal maddelerin keşfi çalışmaları halen güncelliğini korumaktadır. Günümüzde bakteriler, mantarlar gibi mikroorganizmalardan antimikrobiyal maddeler elde edilmiş olmasına rağmen, ÖYA gibi mikroorganizmalar için bu fonksiyona sahip maddelerin varlığı hakkında literatürde bilgi eksikliği vardır. Bu nedenle, bu çalışmada ÖYA hücresiz sıvılarının *Staphylococcus* bakterileri karşısında inhibe edici etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Bu çalışmada dört adet ÖYA-ACM örneğinin, 12 adet *Staphylococcus* izolatından en az bir tanesi üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu saptanmıştır. *A. castellanii* ATCC 50373-ACM örneği, toplam 5 adet *Staphylococcus* suşunu, yerel izolatlarımızdan elde edilen A10-ACM, A14-ACM, UG-ACM örnekleri ise daha az sayıda *Staphylococcus* suşunu (sırasıyla 1, 2, 3 adet) farklı oranlarda inhibe etmiştir (Tablo 4.2, Tablo 4.7). Denenen bakteriler karşısında en yüksek inhibe edici etkiye sahip örneklerin *A. castellanii* ATCC 50373-ACM ve yerel izolat olan UG-ACM olduğu tespit edilmiştir. *A. castellanii* ATCC 50373-ACM örneği, iki adet *Staphylococcus* suşu (MRSA-SA17, MRSA SA5) karşısında sırasıyla %100, %96.02, UG-ACM örneği sadece MRSA-SA17 karşısında buna yakın değerde (%88.63) inhibe edici etki göstermiştir (Tablo 4.2, Tablo 4.7). Ayrıca, UG-ACM örneği 1 adet *Staphylococcus* suşu (MSSE S1) karşısında %99.97 inhibe edici etki gösterdiği halde *A. castellanii* ATCC 50373-ACM örneği aynı suş karşısında inhibe edici etki göstermemiştir (Tablo 4.7). Bu verilerden ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* suşları üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğu, bu etkinin farklı oranlarda ortaya çıktığı anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada hem *A. castellanii* ATCC 50373-ACM hem de A14-ACM örnekleri, denenen 5 MSSA suşundan bir tanesi (MSSA- SA3) karşısında sırasıyla %25.90 ve %8.59 oranında inhibe edici etki göstermiştir. Çalışmamıza benzer olarak Tashmukhambetov (2016), *A. castellanii* ATCC 50492 suşuna ait ACM örneğinin bir adet MSSA karşısında test etmesi sonucunda %10.6 oranında inhibe edici etkisinin olduğunu saptamıştır. Aynı araştırmacı aynı amip suşuna ait ACM örneğini, bir adet *S. epidermidis* karşısında test etmesi sonucunda %3.4 oranında inhibe edici etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Daha fazla sayıda suşun çalışıldığı bu tez çalışmasında, UG kodlu suşa ait ACM örneğinin, denenen dört adet *S. epidermidis* suşundan iki tanesi üzerinde (*S. epidermidis* ATCC 12228, MSSE S1) sırasıyla %7.57 ve %99.97 oranında inhibe edici etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Diğer izolatları ait ACM örneklerinin bu suşları inhibe etmediği saptanmıştır. Ayrıca diğer bir adet *S. epidermidis* (MRSE SE3) suşunun hem *A. castellanii* ATCC 50373 hem de A14 suşlarına ait ACM örnekleri tarafından farklı oranlarda (sırasıyla %84.30, %13.57) inhibe edildiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde Iqbal ve arkadaşları keratit etkeni olan *A. castellanii* ATCC 50492 suşunu ve bir adet MRSA suşunu kullandıkları çalışmalarında, bu amip suşuna ait ACM örneğinin bu bakteri üzerinde %99 oranında inhibe edici etkiye sahip olduğunu rapor etmiştir (Iqbal ve diğ., 2014). Çalışmamızda farklı bir standart suşun (*A. castellanii* ATCC 50373) denenen üç adet MRSA suşundan iki tanesi karşısında %96.02-%100, çevresel izolat UG suşunun bir adet MRSA

karşısında %88.63 oranında inhibe edici etkiye sahip olması bulgusu, bu çalışmanın sonucu ile uyumluluk göstermektedir. Bununla beraber diğer suşların denenen tüm MRSA suşları karşısında inhibe edici etkiye sahip olmadığı ya da çok düşük oranda inhibe edici etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Iqbal ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları amip suşunun (*A. castellanii* ATCC 50492) keratit hastalarından izole edilmiş olması nedeniyle patojen bir suş olduğu anlaşılmaktadır. Oysa çalışmamızda kullanılan amip suşlarının osmotolerans ve termotolerans testlerine göre patojen olmadığı ya da zayıf patojen olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu veriler ışığında, amip suşlarının *Staphylococcus* bakterileri karşısında inhibe edici etkilerinin gerek amip gerekse *Staphylococcus* suşlarının özelliklerine bağlı olarak değiştiği söylenebilir.

Görüldüğü gibi yukarıda bahsedilen diğer çalışmalarda kullanılan ÖYA suşu *A. castellanii* ATCC 50492 olmasına rağmen bu çalışmada *A. castellanii* ATCC 50473'e ek olarak ülkemizdeki sulardan izole edilmiş ÖYA suşları kullanılmıştır. Bu izole edilmiş olan yerel izolatların morfolojik özellikleri incelenerek, Page'in temel morfotiplendirme anahtarına (Page, 1988) göre *Acanthamoeba* cinsine ait olduğu saptanmıştır. Bu suşların cins adının doğrulanması ve tür düzeyinde identifikasyonlarının gerçekleştirilmesi için PCR/DNA dizi analizi gibi moleküler yöntemlerin yapılması planlanmaktadır. Bu sayede ÖYA suşlarının karşılaştırılması yapılarak ÖYA-ACM örneklerinin *Staphylococcus* bakterileri karşısındaki inhibe edici etkilerinin amip türlerine bağlı olup olmadığı daha net bir şekilde ortaya çıkartılmış olacaktır.

Denenen 12 adet *Staphylococcus* suşundan beş tanesi (MSSA SA1, MSSA SA6, MSSA SA7, MRSE S4 ve MRSA ATCC 43300) tüm ÖYA-ACM örneklerine karşı dirençli olduğu halde diğer yedi tanesinin değişen oranlarda duyarlı olduğu görülmüştür (Tablo 4.7). Denenen ÖYA-ACM örneklerine karşı ortalama duyarlılığı en yüksek olan bakteri suşu MRSA SA17 (%47.15), en düşük olan bakteri suşunun *S. epidermidis* ATCC 12228 (%1.9) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.9). Bu veriler ÖYA-ACM örneklerinin inhibisyon etkisinin *Staphylococcus* suşlarına göre de değişkenlik gösterdiğini düşündürmektedir. Bilindiği gibi *Staphylococcus*'lar sahip oldukları hücresel yapıları, pek çok enzimleri, toksinleri vb. virülans faktörleri sayesinde elverişsiz koşullardan kendilerini koruyabilmektedir. Örneğin, bu çalışmada kullanılan *S. epidermidis* ATCC 12228 suşunun *S. aureus* üzerinde etkili olan ve bakteriyosin adı verilen, dış ortama saldıgı moleküllere sahip olduğu bilinmektedir (Jang ve diğ., 2020). Bu bilgiler ışığında, bu ve/veya benzeri moleküllerin belki de ÖYA-ACM örnekleri üzerinde de etkili olduğu ve bakterinin inhibisyonunu engellediği fikri akla gelmektedir. Ayrıca aynı türe ait olan

bakteri suşları arasında genotipik farklılıklar olabilmektedir. Konunun aydınlığa kavuşturulabilmesi için denenen *Staphylococcus* suşlarının hem vürulans faktörleri açısından hem de suşların benzerliğini/farklılığını ortaya çıkartacak olan moleküler yöntemlerin kullanıldığı yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ÖYA'ların *Staphylococcus* cinsi mikroorganizmaları inhibe etme yeteneklerinin gösterildiği bu çalışma, aynı yöntemi kullanan De souza ve arkadaşları'nın (De souza ve diğ., 2017) *A. polyphaga* kültür süpernatantının *S. aureus* üremesini inhibe ettiğini gösteren çalışmalarının sonucu ile de uyumludur. Yapılan literatür çalışmasında ÖYA-*Staphylococcus* ilişkisinde amip hücrelerinin canlı olarak kullanılmasına, kültür süpernatantlarının kullanılmasına ya da kültür lizatlarının kullanılmasına bağlı olarak farklı sonuçlar elde edildiği saptanmıştır. Nitekim De Souza ve arkadaşları yukarıda belirtilen çalışmalarında çalışmamızın tersine *S. aureus* ile *A. polyphaga*'nın kültür lizatının birlikte kullanılması sonucunda *S. aureus* üremesinin desteklendiğini tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Huws ve arkadaşları *S. aureus* bakterisinin *A. polyphaga* türü ÖYA içerisine girerek çoğalabildiğini göstermiştir (Huws ve diğ., 2008). Pickup ve arkadaşları, *S. aureus*'un, hem *A. castellanii* hem de *Vermamoeba vermiformis* türü ÖYA için besin kaynağı olduğunu bildirmiştir (Pickup ve diğ., 2007). Bu çalışmalarda denenen amiplerin ya canlı hücreleri ya da lizatları kullanılmıştır. Oysa çalışmamızda PYG ortamında üretilen ÖYA hücrelerinden elde edilen hücresiz sıvılar kullanılmıştır. Bu durum bu çalışmanın sonuçlarıyla söz konusu diğer çalışmaların sonuçlarının farklılığını açıklayan nedenlerden birisi olarak gösterilebilir. Çalışmamızda canlı amip hücrelerini içermeyen ÖYA-ACM örneklerinin kullanılmasının tercih edilmesi, ÖYA türlerinin konak doku ve hücrelerindeki (örneğin: insan kornea hücreleri) olası patojen etkileri nedeniyle. Çünkü bu olasılık, canlı ÖYA hücrelerinin antibakteriyel etkiye sahip olsalar bile *Staphylococcus* bakterilerine karşı bir antibakteriyel madde olarak kullanılabilme konusundaki düşünceyi ortadan kaldırmaktadır.

Bu çalışmadan elde edilen veriler, ülkemizden izole edilen ÖYA suşlarının anti-*Staphylococcus* etki potansiyeline sahip olduğunu göstermekle birlikte yerel izolatların, bir suşun (UG) haricinde, *Staphylococcus* bakterileri karşısında referans suşa kıyasla daha zayıf inhibisyon etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Daha yüksek antibakteriyel etki gösteren ÖYA izolatlarının ortaya çıkartılabilmesi için geniş kapsamlı taramalara ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan literatür araştırması ile ülkemizin farklı illerindeki çeşitli su kaynaklarında da ÖYA'ların yaşadığı, izolasyonlarının, tanımlanmalarının yapıldığı anlaşılmaktadır (Özçelik ve

diğ., 2012; Kuk ve diğ., 2013; Yazar ve diğ., 2016; Üstüntürk-Onan 2020). Bu durumdan yararlanarak ülkemizden gerek şimdiye kadar izole edilmiş, gerekse daha sonraki zamanlarda izole edilecek olan yerel ÖYA izolatlarının, *Staphylococcus* bakterileri üzerindeki inhibe edici etkileri açısından araştırılması için yeni projelerin gerçekleştirilmesi yerinde olacaktır. Ayrıca tüm ÖYA-ACM örneklerinin diğer bakteriler karşısındaki olası antibakteriyel etkilerinin, hatta antiviral, antifungal, etkilerinin ortaya çıkartılabilmesi için de çalışmaların planlanması gereklidir.

ÖYA izolatlarının yüksek sıcaklık ya da osmotik stres altında in vitro şartlarda üremesi, virulans özellikleri, izolatın konak memeli dokularında yaşamaları ve adapte olabilmeleri ile ilişkilendirilmektedir (Khan ve diğ., 2001; Khan ve Tareen 2003; Koehsler ve diğ., 2009; Gianinazzi ve diğ., 2010). Fakat, yalnız bu özelliklerin varlığı veya yokluğu, onları patojenik olarak tanımlamak için yeterli değildir ve sonuçların in vivo testlerle desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Landell ve diğ., 2013; Arab Mazar ve diğ., 2019; Üstüntürk-Onan, 2020). Bu çalışmada kullanılan ÖYA suşlarının patojenik potansiyelini belirlemek için in vitro olarak yapılan osmotolerans ve termotolerans testlerine göre, suşların hiçbirisinin yüksek sıcaklık (42°C) ve yüksek osmolaritede (1 M Mannitol) üreyemediği saptanmıştır. Bu nedenle patojen olmadığı/ düşük patojenik özellik gösterdiği düşünülmektedir. Benzer şekilde Norouzi ve arkadaşları, hem 42°C’de hem de 1 M Mannitol içeren NNA’da üreme gösteren *Acanthamoeba* suşlarını yüksek patojen potansiyeli olan amipler olarak, 37 °C sıcaklıkta ve 0.5 M Mannitol içeren NNA’da üreme gösteren *Acanthamoeba* suşlarını ise patojen potansiyeli olmayan amipler olarak kabul ettiklerini belirtmişlerdir (Norouzi ve diğ., 2021). Başka bir çalışmada 42 °C’de üreme göstermeyen, 37° C sıcaklıkta ve 1 M Mannitol içeren NNA’da üreme gösteren izolatların düşük patojenik potansiyeli olduğu bildirilmiştir (Özçelik ve diğ., 2012; Üstüntürk-Onan, 2020). Landell ve diğerleri (2013), referans olarak kullandıkları patojen bir klinik izolatın (*A. castellanii* ATCC 50492 – T4), yüksek osmolarite (0.5 M – 1 M Mannitol) ve sıcaklıklarda (37°C ve 42°C) üreme gösterdiğini, diğer referans olan patojen olmayan çevresel suşun (*A. castellanii* ATCC 30010 – Neff) ise sadece 0.5 M Mannitol içeren NNA’da ve 37 °C’de üreme gösterdiğini bildirmişlerdir. Arab- Mazar ve diğerleri (2019), yüksek osmolarite (1 M Mannitol) ve sıcaklıklarda (42°C) üreme gösteren *Acanthamoeba* suşlarını, yüksek potansiyelli patojen olduklarını rapor etmişlerdir.

Literatürde patojen ve patojen olmayan *Acanthamoeba* türlerinin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinde bazı farklılıklar olduğu görülmektedir. Lorenzo-Morales ve diğerleri (2005), patojenik *Acanthamoeba*'nın, patojen olmayanlardan daha yüksek proteaz aktivitesi içerdiğini göstermiştir. Nakisah ve Chandrika (2012) yaptıkları çalışmada patojen olan ve olmayan 2 adet *Acanthamoeba* lizatının MRSA ve *S. aureus* bakterileri üzerinde neredeyse eşit oranda antibakteriyel etkisinin olduğunu saptamıştır. İlginç olarak, Nakisah ve diğerleri (2005), bir *Acanthamoeba* klinik izolatının lizatının, patojenik olmayan izolatın lizatına kıyasla bir anti-kanser ajanı olarak daha güçlü olduğunu bildirmiştir. Na ve diğerleri (2001), serbest yaşayan patojenik *A. castellanii* lizatının HeLa hücrelerinde ciddi hasara neden olduğunu göstermiştir. Yapılan literatür çalışmasından elde edilen bu bilgiler ışığında, çalışmamızda kullanılan ve patojen olmadığı/zayıf patojen olduğu saptanan ÖYA-ACM örneklerinin kanser hücre hatları üzerindeki etkilerinin de araştırılması ve patojen olanları ile karşılaştırılması yerinde olacaktır.

Çalışmamızdan elde edilen veriler ÖYA suşlarının bakteriyel biyofilmler üzerindeki etkilerinin araştırılması çalışmalarına ışık tutacaktır. Bilindiği gibi *Staphylococcus* gibi bakterilerin biyofilm oluşturmaları sayesinde antibiyotikleri tolere etme yetenekleri vardır. Bu nedenle ortadan kaldırılması zordur ve bu bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi önemli bir sorundur. Amipler ve/veya onların salgıladıkları ürünler, biyotik ve abiyotik yüzeyler üzerindeki biyofilmleri inhibe etmek ve dağıtmak için alternatif stratejiler sağlayabilir (Miao ve diğ., 2017; Schilcher ve diğ., 2020). ÖYA suşlarının *S. aureus*'un oluşturduğu biyofilmler üzerine etkilerinin araştırıldığı yakın tarihli bir çalışmada, *A. polyphaga* hücresiz sıvısının biyofilmdeki MRSA sayısında önemli oranda azalış gösterdiği saptanmıştır (Martin ve diğ., 2020). Çalışmamızda referans suş tarafından inhibe edilmeyen MSSE S1 suşunun, yerel izolatımız olan UG suşuna ait ACM örneği tarafından yüksek oranda (%99.97) inhibe edilmiş olması oldukça değerlidir. Bu nedenle gerek bu örneğin gerek yüksek antibakteriyel etki gösterecek olan diğer ÖYA-ACM örneklerinin bakteriyel biyofilmler üzerindeki etkilerinin de ilerideki çalışmalarla ortaya çıkartılması yerinde olacaktır.

Bu çalışmada, ÖYA-ACM örneklerinin antibakteriyel aktivite deneyleri iki yöntemin karşılaştırılması için hem agar difüzyon hem de koloni sayım yöntemiyle eş zamanlı olarak yapılmıştır. Yapılan 48 adet deneyin dört tanesinde (%8.33) her iki yöntemle de inhibisyon etkisi saptanmıştır. Buna rağmen, yedi adet deneyde (%14.58) koloni sayım yönteminde

inibisyon etki saptandığı halde, agar difüzyon yönteminde herhangi bir inhibisyon zonu tespit edilmemiştir. 48 deneyin 37 tanesinde (%77.08) her iki yöntemle de inhibe edici etki saptanmamıştır. Dört adet deneyde her iki yöntemle de inhibisyon etki saptanmıştır. Ayrıca agar difüzyon yönteminde denenen bakteriler üzerinde inhibe edici etkileri saptanan ÖYA-ACM örneklerinin, referans antibiyotiklerle karşılaştırıldığında daha düşük inhibisyon zonu verdiği görülmüştür. Agar difüzyon yönteminin sonuç doğruluğunun, büyük ölçüde antibakteriyel aktivitesi araştırılan maddenin yayılabilirliğine bağlı olduğu bilinmektedir (Pongtharangkul ve Demirci, 2004; Rogers ve Montville, 1991). Bu nedenle agar difüzyon yönteminde çalışmamızda kullanılan ÖYA-ACM örneklerinin agara tam olarak diffüze olamaması ve bu nedenle agar yüzeyindeki bakterilerle etkileşime giremediği düşünülmektedir. Benzer şekilde Oses ve diğerleri (2016), bal örneklerinin *S. aureus* bakterisine karşı antibakteriyel etkisini farklı yöntemler ile araştırdıkları çalışmalarında, agar dilüsyon ve broth dilüsyon yönteminde balın yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğunu saptadıkları halde agar difüzyon yönteminde bu etkinin çok düşük olduğunu saptamışlardır. Bu durumun balın, güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olmasına rağmen agarda sınırlı difüze olma kapasitesi olan yüksek moleküler ağırlığa sahip bileşikler içermesi sebebiyle olabileceği ve bu yüzden agar difüzyon yönteminde hatalı bir şekilde düşük aktivite elde edildiği belirtilmiştir. Çalışmamızda kullanılan ÖYA-ACM örneklerinin yoğunluğu araştırılmamasına rağmen benzer bir durumun ortaya çıkmış olma ihtimalinden bahsedilebilir. Başka bir çalışmada Al-Janabi (2014), diklofenak sodyum, indometazin ve mefenamik asit'in antimikrobiyal aktivitesini spektrofotometrik yöntem ve disk difüzyon yöntemini kullanarak incelemiştir. Disk difüzyon testinde indometazin antimikrobiyal aktivite göstermezken, spektrofotometrik yöntemde bu maddenin bazı izolatlar üzerinde önemli derecede etki gösterdiğini saptamıştır. İki yöntem arasındaki bu sonuç farklılığının, indometazinin sudaki zayıf çözünürlüğü ile ilgili olabileceğini ve bu durumun indometazinin filtre diskinden ortama difüzyonunu azaltmasına yol açtığını ileri sürmüş, sonuç olarak spektrofotometrik yöntemin bu maddelerin antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi için daha etkili bir yöntem olduğunu belirtmiştir.

Ülkemiz sularından izole edilen ÖYA-ACM örneklerinin (A10-ACM, A14-ACM, UG-ACM) *Staphylococcus* suşlarına karşı ortalama olarak sırasıyla % 0.34, %1.85, %16.35 oranında inhibe edici etkileri saptanmıştır. Bu veriler, bu amiplerin antibakteriyel özellikte moleküllere (ekstrasellüler veziküller, proteazlar vb.) sahip olduğu/dış ortama salgılayabildiği fikrini desteklemektedir. Bu nedenle *Staphylococcus* bakterilerine karşı mücadelede diğer

antibakteriyel ajanlara bir alternatif olarak ÖYA'lardan yararlanılabileceği ihtimali olduğu düşünülmektedir. Gonçalves ve arkadaşları (Gonçalves ve diğ., 2018) PYG besiyerinde üretilmiş *A. castellanii* hücresiz sıvısında 179 farklı protein tanımlamışlardır. Ancak bu tez çalışmasında kullanılan ÖYA-ACM örneklerinin biyokimyasal karakterizasyonu yapılmamıştır. Bu nedenle öncelikle yüksek anti-*Staphylococcus* etkiye sahip ÖYA-ACM örneklerinin içerdiği moleküllerin tanımlanması, saflaştırılması gereklidir. Ardından her bir molekülün *Staphylococcus* bakterileri karşındaki inhibe edici etkileri açısından test edilmesi gereklidir. Bu sayede yeni anti-Stafilokok etkili madde/maddelerin keşfi çalışmalarına katkı sağlanabilir.

Bu tez çalışmasından elde edilen bilgiler,

- 1- Bakteri-ÖYA ilişkisinin değişken yönünden yararlanılarak yeni ve doğal antimikrobiyal maddelerin üretiminde ÖYA'lardan da yararlanılabileceği fikrini desteklemektedir.
- 2- ÖYA'nın dış ortama salgıladığı maddeler sayesinde aynı ortamdaki *Staphylococcus* bakterilerinin kontrolünü sağlayabildiğini göstermektedir.
- 3- Ülkemiz sularından izole edilmiş ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarının *Staphylococcus* bakterilerine karşı antibakteriyel etki potansiyelinin bulunduğunu göstermektedir.
- 4- Farklı oranlarda ortaya çıkan bu inhibe edici etkinin suşlara göre değişkenlik gösterdiğini düşündürmektedir.
- 5- Daha güçlü anti-*Staphylococcus* etkili maddelerin keşfedilmesi için, ülkemizin çeşitli su ortamlarından (akarsu, deniz, göl, yağmur suyu vb.) yeni ÖYA suşlarının hücresiz sıvılarının *Staphylococcus* bakterileri karşısında inhibe edici etkilerinin araştırılması gerektiğini ortaya çıkartmıştır.
- 6- Antibakteriyel etkisi görülen ÖYA suşlarının patojenitelerinin belirlenmesi için in vitro osmotolerans ve termotolerans testlerine ek olarak in vivo testlerin de yapılacağı çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.
- 7- Hem çalışmada kullanılan ÖYA suşlarının hem de ileride farklı sucul ortamlardan izole edilecek ÖYA suşlarının *Staphylococcus* cinsi dışında farklı patojen bakterilere, mantarlara, virüslere, ayrıca kanser hücre hatlarına ve biyofilmdeki mikroorganizmalara karşı olası inhibe edici etkilerinin belirlenmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandström, G., Forsman, M., 2003, Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*, *Applied Environmental Microbiology*, 69 (1), 600-606.
- Akbar, N., Khan, N.A., Sagathevan, K., Iqbal, M., Tawab, A., Siddiqui, R., 2019, Gut bacteria of *Cuora amboinensis* (turtle) produce broad-spectrum antibacterial molecules. *Scientific reports*, 9 (1), 1-19.
- Akbar, N., Siddiqui, R., Iqbal, M., Sagathevan, K., Khan, N.A., 2018, Gut bacteria of cockroaches are a potential source of antibacterial compound(s), *Journal of Applied Microbiology*, 66 (5), 416–426.
- 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*, 23 (4), 511-526.
- Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M., 2009, Bakteriyosinler: alternatif gıda koruyucuları, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 25(1), 59-70.
- 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.
- Akyol, A., Ulusoy, H., Özen, I., 2006, Handwashing: a simple, economical and effective method for preventing nosocomial infections in intensive care units, *Journal of Hospital Infection*, 62 (4), 395-405.
- Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., Buchrieser, C., 2007, *Legionella pneumophila* a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa, *Cellular and molecular life sciences*, 64 (4), 432-448.

Al-Janabi, A. A. H. S., 2014, Comparison of the disc diffusion assay with spectrophotometer technique for antibacterial activity of diclofenac sodium, indomethacin and mefenamic acid, *Asian Journal of Pharmaceutics*, 3 (2).

Al-Janabi, A.A.H.S., 2014, Comparison of the disc diffusion assay with spectrophotometer technique for antibacterial activity of diclofenac sodium, indomethacin and mefenamic acid, *Asian Journal of Pharmaceutics*, 3 (2).

Arab-Mazar, Z., Niyati, M., Lasjerdi, Z., Spotin, A., Darzam, I.A., Gachkar, L., 2019, Isolation, identification, and phylogenetic analysis of potentially pathogenic free-living amoebae isolated from nasal and oral mucosa of HIV/AIDS patients in Iran, *Parasitology research*, 118 (10), 3061-3066

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, *feb-fresenius environmental bulletin*, 5419.

Balczun, C., Scheid, P.L., 2017, Free-living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance, *Viruses*, 9 (4), 65.

Baron, E.J., Finegold, S.M., 1990, Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 8th edition.

Bernfeld, E., Kozak, A., Feldman, B.H., Door, W.T., 2014, *Acanthamoeba keratitis*, *Am Acad Ophthalmology*.

Bleasdale, B., Lott, P.J., Jagannathan, A., Stevens, M.P., Birtles, R.J., Wigley, P., 2009, The *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system is essential for the survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in free-living amoebae, *Applied and environmental microbiology*, 75 (6), 1793-1795.

Bogitsh, B. J., Carter, C.E., Oeltmann, T. N., 2018, *Human parasitology*, Academic Press.

Bornier, F., Zas, E., Potheret, D., Laaberki, M.H., Coupat-Goutaland, B., Charpentier, X., 2021, Environmental free-living amoebae can predate on diverse antibiotic-resistant human pathogens, *Applied and environmental microbiology*, 87 (18), 747-21.

- Boucher, H.W., Corey, G. R., 2008, Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Clinical infectious diseases*, 46, 344-349.
- Brown, M.R., Barker, J., 1999, Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms, *Trends in microbiology*, 7 (1), 46-50.
- Castro-Artavia, E., Retana-Moreira, L., Lorenzo-Morales, J., Abrahams-Sandí, E., 2017, Potentially pathogenic *Acanthamoeba* genotype T4 isolated from dental units and emergency combination showers, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 817-821.
- Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y., Rodier, M.H., 2014, Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections?, *Journal of Hospital Infection*, 87 (3), 131-140.
- Caumo, K., Frasson, A.P., Pens, C.J., Panatieri, L.F., Frazzon, A.P.G., Rott, M.B., 2009, Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 103 (6), 477-485.
- CDC, A., 2013, Antibiotic resistance threats in the United States, *Current*, 114, 1-114.
- 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.
- Cita, Y.P., Suhermanto, A., Radjasa, O.K., Sudharmono, P., 2017, Antibacterial activity of marine bacteria isolated from sponge *Xestospongia testudinaria* from Sorong, Papua, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7 (5), 450–454.
- Cursons, R.T.M., Brown, T.J., 1978, Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae., *Journal of Clinical Pathology*, 31 (1), 1–11.
- De Caley, R.F., Gonzalez-Pascual, B., García-Olmedo, F., Carbonero, P., 1972, Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro, *Applied Microbiology*, 23, 998-1000.
- De Jonckheere, J., 1977, Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolates, *Applied and Environmental Microbiology*, 33 (4), 751-757.

- De Souza, T.K., Soares, S. S., Benitez, L.B., Rott, M.B., 2017, Interaction between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acanthamoeba polyphaga*, *Current microbiology*, 74 (5), 541-549.
- 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.
- Delafont, V., Rodier, M.H., Maisonneuve, E., Cataeu E., 2018, *Vermamoeba vermiformis*: a Free-Living Amoeba of Interest, *Microbial Ecology*, 76 (4), 991–1001.
- Desser, S.S., Bennett, G.F., Kreier, J.P., Baker, J.R., 1993, Parasitic protozoa, *Academic Press*, 247-272.
- Döşler, S., 2017, Antimicrobial peptides: Coming to the end of antibiotic era, the most promising agents, *Istanbul Journal of Pharmacy*, 47 (2), 72-76.
- Ekengren, S., Hultmark, D., 1999, *Drosophila* cecropin as an antifungal agent, *Insect biochemistry and molecular biology*, 29 (11), 965-972.
- 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.
- Fallon, R.J., Rowbotham, T.J., 1990, Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool, *Journal of clinical pathology*, 43 (6), 479-483.
- Farinholt, T., Dinh, C., Kuspa, A., 2019, Social amoebae establish a protective interface with their bacterial associates by lectin agglutination, *Science advances*, 5 (7), 4367.
- Fleming, A., 1929, On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*, *British journal of experimental pathology*, 10 (3), 226.

- Fouque, E., Trouilh , M. C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M. H., H chard, Y., 2012, Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae, *Eukaryotic cell*, 11 (4), 382-387.
- Garcia, A., Go i, P., Cieloszyk, J., Fernandez, M.T., Calvo-Beguer a, L., Rubio, E., Clavel, A., 2013, Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environmental science & technology*, 47 (7), 3132-3140.
- Gaze, W.H., Burroughs, N., Gallagher, M.P., Wellington, E.M.H., 2003, Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles, *Microbial ecology*, 46 (3), 358-369.
- Gianinazzi, C., Schild, M., Zumkehr, B., W thrich, F., N esch, I., Ryter, R., M ller, N., 2010, Screening of Swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae, *Experimental parasitology*, 126 (1), 45-53.
- G mez-Couso, H., Paniagua-Crespo, E., Ares-Maz s, E., 2007. *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*, *Parasitology research*, 100 (5), 1151-1154.
- Gon alves, D. D. S., Ferreira, M. D. S., Liedke, S. C., Gomes, K. X., de Oliveira, G. A., Le o, P. E. L., Guimaraes, A. J., 2018, Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoeba castellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells, *Virulence*, 9 (1), 818-836.
- Greenwood, D., 1988, Microbiological properties of teicoplanin, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 21, 1-13.
- Greub, G., Raoult, D., 2004, Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae, *Clinical Microbiology Reviews*, 17 (2), 413-433.
- Griffin, J.L., 1972, Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoeba, *Science*, 178 (4063), 869-870.

Han, K L., Lee, H.J., Shin, M.H., Shin, H.J., Im, K.I., Park, S.J., 2004, The involvement of an integrin-like protein and protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity, *Parasitology research*, 94 (1), 53-60.

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.M., 2001, Isolation and Characterization of Human μ -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (8), 5707-5713.

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

Herederó-Bermejo, I., Martín, C.S.J., de Carranza, J.S., Copa-Patiño, J.L., Pérez-Serrano, J., 2012, *Acanthamoeba castellanii*: in vitro UAH-T17c3 trophozoite growth study in different culture media, *Parasitology research*, 110 (6), 2563-2567.

Hoque, M.M., Noorian, P., Espinoza-Vergara, G., 2021, Adaptation to an amoeba host drives selection of virulence-associated traits in *Vibrio cholerae*, *International Society for Microbial Ecology*, 1-12.

Horn, M., Wagner, M., 2004, Bacterial Endosymbionts of Free-living Amoebae, *Journal of eukaryotic microbiology*, 51 (5), 509-514.

Hurt, M., Neelam, S., Niederkorn, J., Alizadeh, H., 2003, Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease, *Infection and immunity*, 71 (11), 6243-6255.

Hutchings, M.I., Truman, A.W., Wilkinson, B., 2019, Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72-80.

Huws, S.A., Morley, R.J., Jones, M.V., Brown, M.R., Smith, A.W., 2008, Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*, *FEMS microbiology letters*, 282 (2), 258-265.

- Ibañez-Peinado, D., Ubeda-Manzanaro, M., Martínez, A., Rodrigo, D., 2020, Antimicrobial effect of insect chitosan on *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* survival. *Plos one*, 15 (12), e0244153.
- Iqbal, J., Siddiqui, R., Khan, N.A., 2014. *Acanthamoeba* and bacteria produce antimicrobials to target their counterpart, *Parasites & vectors*, 7 (1), 1-6.
- 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.
- Jamerson, M., da Rocha-Azevedo, B., Cabral, G.A., Marciano-Cabral, F., 2012, Pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria lovaniensis* exhibit differential adhesion to, and invasion of, extracellular matrix proteins, *Microbiology*, 158 (3), 791.
- Jang, I.T., Yang, M., Kim H.J., Park, J.K., 2020, Novel Cytoplasmic Bacteriocin Compounds Derived from *Staphylococcus epidermidis* Selectively Kill *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Pathogens*, 9 (2), 87.
- Johnson, B.A., Anker, H., Meleney, F.L., 1945, Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group, *Science*, 102 (2650), 376-377.
- Jousset, A., Rochat, L., Scheu, S., Bonkowski, M., Keel, C., 2010, Predator-prey chemical warfare determines the expression of biocontrol genes by rhizosphere-associated *Pseudomonas fluorescens*, *Applied Environmental Microbiology*, 76 (15):5263-5268.
- Kaur, A.D., Nain, P., Nain, J., 2012, In-vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Ginkgo biloba* Bark Extract, *IRJP*, 3 (6), 116-119.
- Kebabci Ç, 2020, Özgür Yaşayan Amiplerin Hücresiz Sıvılarının *Pseudomonas* Üzerine Etkisinin Araştırılması, İstanbul Üniversitesi Yüksek Lisans tezi.
- 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.

- Khan, N.A., 2001, Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*, *Current Microbiology*, 43 (6), 391-395.
- Khan, N.A., 2006, *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health, *FEMS Microbiology Reviews*, 30 (4):564–595
- Khan, N.A., Jarroll, E.L., Panjwani, N., Cao, Z., Paget, T.A., 2000, Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (8), 2858-2861.
- Khan, N.A., Siddiqui, R., 2014, Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*, *Parasitology*, 141 (7), 869-874.
- Khan, N.A., Tareen, N.K., 2003, Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia parasitologica*, 50 (2), 97-104.
- King, C.H., Shotts Jr, E.B., Wooley, R.E., Porter, K.G., 1988, Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination, *Applied and environmental microbiology*, 54 (12), 3023-3033.
- Koehsler, M., Leitsch, D., Duchêne, M., Nagl, M., Walochnik, J., 2009, *Acanthamoeba castellanii*: growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture. *FEMS microbiology letters*, 299 (2), 121-127.
- Koubar, M., Rodier, M. H., Garduño, R. A., Frère, J., 2011, Passage through *Tetrahymena tropicalis* enhances the resistance to stress and the infectivity of *Legionella pneumophila*. *FEMS microbiology letters*, 325 (1), 10-15.
- Kuk, S., Yazar, S, Doğan, S., Çetinkaya, Ü., Sakalar, Ç., 2013, Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated from Kayseri well water, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 43 (1), 12-17.
- Lackner, P., Beer, R., Broessner, G., Helbok, R., Pfausler, B., Brenneis C., 2010, Acute granulomatous *Acanthamoeba encephalitis* in an immunocompetent patient, *Neurocrit Care*, 12 (1), 91-94.

- Lambrecht, E., Baré, J., Van Damme, I., Bert, W., Sabbe, K., Houf, K., 2013, Behavior of *Yersinia enterocolitica* in the presence of the bacterivorous *Acanthamoeba castellanii*, *Applied and environmental microbiology*, 79 (20), 6407-6413.
- 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.
- Lamprinou, V., Tryfinopoulou, K., Velonakis, E. N., Vatopoulos, A., Antonopoulou, S., Fragopoulou, E., Economou-Amilli, A., 2015, Cave cyanobacteria showing antibacterial activity, *International Journal of Speleology*, 44 (3), 1.
- Landell, M.F., Salton, J., Caumo, K., Broetto, L., Rott, M.B., 2013, Isolation and genotyping of free-living environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from bromeliads in Southern Brazil, *Experimental parasitology*, 134 (3), 290-294.
- 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.
- Lekkla, A., Sutthikornchai, C., Bovornkitti, S., Sukthana, Y., 2005, Free living ameba contamination in natural hot springs in Thailand. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 36, 5–9.
- Levine, D.P., 2006, Vancomycin: a history, *Clinical infectious diseases*, 42, 5-12.
- Li, C., Bai, J., Cai, Z., Ouyang, F., 2002, Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology, *Journal of Biotechnology*, 93 (1), 27-34.
- Long, J.J., Jahn, C.E., Sánchez-Hidalgo, A., Wheat, W., Jackson, M., Gonzalez-Juarrero, M., Leach, J.E., 2018, Interactions of free-living amoebae with rice bacterial pathogens *Xanthomonas oryzae* pathovars *oryzae* and *oryzicola*, *PLoS One*, 13 (8), e0202941.
- Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Abreu-Acosta, N., Ballart, D., Martinez, E., Valladares, B., 2005, RNA interference (RNAi) for silencing of extracellular serine

proteases genes in *Acanthamoeba*: Molecular analysis and effect on pathogenecity, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 68: 111-115.

Loret, J.F., Greub, G., 2010, Free-living amoebae: biological by-passes in water treatment, *International journal of hygiene and environmental health*, 213 (3), 167-175.

Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003, *Acanthamoeba spp.* as agents of disease in humans. *Clinical microbiology reviews*, 16 (2), 273-307.

Marshall, S.H., Arenas, G., 2003, Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology, *Electronic Journal of Biotechnology*, 6 (3), 271-284.

Martin, K. H., Borlee, G. I., Wheat, W. H., Jackson, M., Borlee, B. R., 2020, Busting biofilms: free-living amoebae disrupt preformed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Mycobacterium bovis* biofilms, *Microbiology*, 166 (8), 695.

Martín-Navarro, C.M, Lorenzo-Morales, J., Cabrera-Serra, M.G., Rancel, F., Coronado-Alvarez, N.M., Piñero, J.E., Valladares, B., 2008, The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain, *Journal of Medical Microbiology* 57 (11), 1399–1404.

Matz, C., Bergfeld, T., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2004, Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing, *Environmental microbiology*, 6 (3), 218-226.

Mella, C., Medina, G., Flores-Martin, S., Toledo, Z., Simaluiza, R.J., Pérez-Pérez, G., Fernández, H., 2016, Interaction between zoonotic bacteria and free living amoebas. A new angle of an epidemiological polyhedron of public health importance?, *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 48 (1), 1-10.

Miao, J., Liang, Y., Chen, L., Wang, W., Wang, J., Li, B., Xu, Z., 2017, Formation and development of *Staphylococcus* biofilm: with focus on food safety, *Journal of food safety*, 37 (4), e12358.

- Miltner, E.C., Bermudez, L.E., 2000, *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44 (7), 1990-1994.
- Moënne-Loccoz, Y., Mavingui, P., Combes, C., Normand, P., Steinberg, C., 2015, Microorganisms and biotic interactions. In: *Environmental microbiology: fundamentals and applications*, 395-444.
- Mohd Hussain, R.H., Ishak, A.R., Abdul Ghani, M.K., Ahmed Khan, N., Siddiqui, R., Shahrul Anuar, T., 2019, Occurrence and molecular characterisation of *Acanthamoeba* isolated from recreational hot springs in Malaysia: evidence of pathogenic potential, *Journal of water and health*, 17 (5), 813-825.
- 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.
- Moon, E.K., Choi, H.S., Park, S.M., Kong, H.H., Quan, F.S., 2018, Comparison of proteins secreted into extracellular space of pathogenic and non-pathogenic *Acanthamoeba castellanii*, *The Korean journal of parasitology*, 56 (6), 553.
- Na, B.K., Kim, J.C., Song, C.Y., 2001, Characterization and pathogenetic role of proteinase from *Acanthamoeba castellanii*, *Microbial pathogenesis*, 30 (1), 39-48.
- Nakisah, M., Chandrika, K., 2012, Antimicrobial activities of aqueous lysate of *Acanthamoeba* spp. against selected pathogenic bacteria, *Malaysian Applied Biology*. 41 (2), 45–49.
- Nakisah, M.A., Iliana, F., Houqe, M., 2005, Cytotoxic effect of *Acanthamoeba* lysates of T. lymphoblastic leukemic cell line (CEM-SS). In *Proceedings of the 8th Applied Biology Symposium*. Medical Section Editors, SBN 983-41358-3-1.
- Nawrot. R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., Gozdzicka-Jozefiak, A., 2014, Plant antimicrobial peptides, *Folia Microbiology*, 59 (3), 181-196.

Norouzi, M., Saberi, R., Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Mirjalali, H., Fatemi, M., Karamati, S.A., 2021, Molecular Identification of Pathogenic Free-Living Amoeba from Household Biofilm Samples in Iran: A Risk Factor for *Acanthamoeba keratitis*, *Microorganisms*, 9 (10), 2098.

Onbaşı, D., Çelik, G. Y., Katırcıoğlu, H., 2020, İlaça dirençli mikroorganizmalara karşı yeni bir yaklaşım: geleceğin antibiyotikleri, bitkisel antimikrobiyal peptidler, *ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 7 (1), 51-57.

Osés, S.M., Pascual-Maté, A., de la Fuente, D., de Pablo, A., Fernández-Muiño, M.A., Sancho, M.T., 2016, Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*, *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 78, 29-33.

Özçelik, S., Coşkun, K.A., Yünlü, Ö., Alim, A., Malatyali, E., 2012, The prevalence, isolation and morphotyping of potentially pathogenic free living amoeba from tap water and environmental water sources in Sivas, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 36(4), 198-203.

Özpınar, N., Özçelik, S., Yünlü, Ö., 2017, Isolation and morphotyping of *Acanthamoeba spp.* and *Vermamoeba spp.* from hospital air-conditioning systems, *Cumhuriyet Medical Journal*, 39 (1), 369-373.

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.

Pelegri, P.B., Franco, O.L., 2005, Plant gamma-thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *International Journal of Biochemical Cell Biology*, 37 (11), 2239-2253.

Pickup, Z.L., Pickup, R., Parry, J.D., 2007, Growth of *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis* on live, heat-killed and DTAF-stained bacterial prey, *FEMS Microbiology Ecology*, 61 (2), 264–272.

Pongtharangkul, T., Demirci, A., 2004, Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. *Applied microbiology and biotechnology*, 65 (3), 268-272.

Rasigade, J.P., Vandenesch, F., 2014, *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues, *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 510-514.

Rasmussen, M.A., Carlson, S.A., Franklin, S.K., McCuddin, Z.P., Wu, M.T., Sharma, V.K., 2005, Exposure to rumen protozoa leads to enhancement of pathogenicity of and invasion by multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* bearing SGI1, *Infection and immunity*, 73 (8), 4668-4675.

Rogers, A.M., Montville, T.J., 1991, Improved agar diffusion assay for nisin quantification., *Food Biotechnology*, 5 (2), 161-168.

Rossi, F., García, P., Ronzon, B., Curcio, D., Dowzicky, M.J., 2008, Rates of antimicrobial resistance in Latin America (2004-2007) and in vitro activity of the glycyclcycline tigecycline and of other antibiotic, *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12, 405-415.

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.

Rowbotham, T.J., 1990, Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool, *Journal of clinical pathology*, 43 (6), 479-483.

Salgado, M., Manning, E.J., Monti, G., Bólske, G., Soderlund, R., Ruiz, M., Kruze, J., 2011, European hares in Chile: a different lagomorph reservoir for *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis, *Journal of wildlife diseases*, 47 (3), 734-738.

Samba-Louaka, A., Delafont, V., Rodier, M. H., Cateau, E., Héchard, Y., 2019, Free-living amoebae and squatters in the wild: ecological and molecular features, *FEMS Microbiology Reviews*, 43 (4), 415-434.

Sanchez, S., Flores, M.E., Demain, A.L., 1988, Nitrogen regulation of penicillin and cephalosporin fermentations, *Nitrogen source control of microbial processes*, 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.

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.

Scheid, P., Schwarzenberger, R., Schacht, E., Splettstoesser, W., 2011, Free-living amoebae as hosts and vehicles of *Francisella spp.*, *Proceedings of the Medical Biodefense conference, Medical Corps International Forum*.

Schilcher, K., Horswill, A.R., 2020, *Staphylococcal* biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84 (3), 26-19.

Schuppler, M., 2014, How the interaction of *Listeria monocytogenes* and *Acanthamoeba spp.* affects growth and distribution of the food borne pathogen, *Applied microbiology and biotechnology*, 98 (7), 2907-2916.

Schuster, F.L., 2002, Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas, *Clinical microbiology reviews*, 15 (3), 342-354.

Schuster, F.L., Visvesvara, G.S., 2004, Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals, *International journal for parasitology*, 34 (9), 1001-1027.

Serrano-Luna, J., Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., Ortiz-Estrada, G., de la Garza, M., 2013, Proteases from *Entamoeba spp.* and pathogenic free-living amoebae as virulence factors, *Journal of Tropical Medicine*.

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., Cruz, Soares, N., Khan, N.A., 2021, Crocodile Gut Microbiome Is a Potential Source of Novel Bioactive Molecules, *ACS Pharmacology & Translational Science*, 4 (3), 1260-1261.

Siddiqui, R., Makhlof, Z., Khan, N.A., 2021, The increasing importance of *Vermamoeba vermiformis*, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 68 (5), e12857.

- Sissons, S., Alsam, G., Goldsworthy, M., Lightfoot, E.L., Jarroll, M., Khan N.A., 2006, Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis, *BMC microbiology*, 6 (1), 1-8.
- Snodgrass, W.R., Anderson, T., 1937, Prontosil in erysipelas. *British Medical Journal*, 2 (3993), 101.
- Strassmann, J.E., Shu, L., 2017, Ancient bacteria–amoeba relationships and pathogenic animal bacteria, *PLoS biology*, 15 (5).
- Şenler, N.G., Yıldız, İ., 2010, Tatlı su protozoonları ve önemi, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3 (1), 7-16.
- 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).
- Taylor, T.A., Unakal, C.G., 2017, *Staphylococcus aureus*; StatPearls., *Treasure Island, FL, USA*.
- Tezcan-Merdol, D., Ljungström, M., Winiecka-Krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L., Rhen, M., 2004, Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhysodes*, *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6), 3706-3714.
- 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.
- Thomas, V., McDonnell, G., 2007, Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns, *Letters in applied microbiology*, 45 (4), 349-357.
- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., Maillard, J.Y., 2010, Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS microbiology reviews*, 34 (3), 231-259.
- Thong, Y., Ferrante, A., 1986, Migration patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp, *Infection and immunity*, 51 (1), 177-180.

- Tong, S.Y, Davis J.S, Eichenberger, E., Holland, T.L, Fowler, V.G., 2015, *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management, *Clinical Microbiology Reviews*, 28 (3), 603-61.
- 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.
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Fowler, V.G., 2019, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research, *Nature Reviews Microbiology*, 17 (4), 203-218.
- Ugonabo, J.A., Gugnani, 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.
- Üstüntürk-Onan, M., 2020, Isolation and identification of free-living amoebae isolated from well water in Istanbul, *Journal of Water and Health*, 18 (6), 1139-1145.
- Valladares, M., Reyes-Batlle, M., Martín-Navarro, C.M., López-Arencibia, A., Dorta-Gorrín, A., Wagner, C., Lorenzo-Morales, J., 2015, Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain., *Archives of microbiology*, 197 (5), 639-643.
- Van der Henst, C., Scignari, T., Maclachlan, C., Blokesch, M., 2016, An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*, *International Society for Microbial Ecology*, 10 (4), 897–910.
- Vigers, A. J., Roberts, W. K., Selitrennikoff, C. P., 1991, A new family of plant antifungal proteins, *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 4 (4), 315-323.

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.

Walochnik, J., Obwaller, A., Aspöck, H., 2000, Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp., *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10), 4408-4413.

Winiecka-Krusnell, J., Linder, E., 2001, Bacterial infections of free-living amoebae, *Research in microbiology*, 152 (7), 613-619.

Winnie, F.Y., Siddiqui, R., Sagathevan, K., Khan, N.A., 2020, Identification of antibacterial molecule(s) from animals living in polluted environments, *Current pharmaceutical biotechnology*, 21 (5), 425-437.

Yazar, S., Gürbüz, E., Sönmez, M.F., Çetinkaya, Ü., Kuk, S., 2016, Investigation of potentially pathogenic free-living amoebae and their in vivo pathogenicity in water supplies of Turkey, *Bulletin Microbiology*, 50 (3), 449-59.

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., Binay, A.R., 2014, Growth ability of Gram negative bacteria in free-living amoebae, *Experimental parasitology*, 145, 121-126.

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*, 54 (1), 50-64.

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, *European Journal of Biology*, 69 (1), 17-23.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Şevval Maral ÖZCAN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Marmara Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	13.06.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	Marmara Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Mikrobiyoloji

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

Makale ve Bildiriler

Özcan, Ş.M., Akyüz-Çubukçu, D., Sesal, N.C., Koca, A., 2017, Gram Negatif Bakterilerdeki Sinyal Moleküllerini Saptamaya Yönelik Elektrokimyasal Biyosensör, *3rd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies*, İstanbul, Türkiye.

Özcan, Ş.M., Sesal, N.C., Şener, M.K., Koca, A., 2020, An alternative strategy to detect bacterial contamination in milk and water: a newly designed electrochemical biosensor, *European Food Research and Technology*, 246 (6), 1317-1324.

Özcan, Ş.M., Zeybek, Z., 2021, The Effect of Cell-Free Supernatants of Free-Living Amoeba against Some *Staphylococcus* Bacteria: First Findings from Turkey, *European Journal of Biology*, 80 (1), 29-34.

Özcan, Ş.M., Zeybek, Z., 2021, Effects of free-living amoeba on *Staphylococcus* strains: first findings, 2nd *International Aquatic Biotechnology Symposium*, İstanbul, Türkiye.

Doğanay, D., Özcan, Ş.M., Şentürk, A.M., Ölgen, S., 2021, Antimicrobial Evaluation, Molecular Docking and ADME Properties of Indole Amide Derivatives, *Letters in Drug Design & Discovery*, 18.

