MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOLU-ALADAĞLAR BÖLGESİNDEN TOPLANAN LİKEN TÜRLERİNİN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM SENSING MEKANİZMASI VE BİYOFİLM FORMU ÜZERİNE ETKİSİ

EZGİ UÇARKUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU
İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İSTANBUL, 2017

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOLU-ALADAĞLAR BÖLGESİNDEN TOPLANAN LİKEN TÜRLERİNİN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM SENSING MEKANİZMASI VE BİYOFİLM FORMU ÜZERİNE ETKİSİ

EZGİ UÇARKUŞ

520114006

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU
İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İSTANBUL, 2017

MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES

EFFECT OF LICHEN SPECIES THAT COLLECTED FROM BOLU-ALADAGLAR REGION ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM SENSING MECHANISM AND BIOFILM FORMATION

EZGİ UÇARKUŞ

520114006

MASTER THESIS
Department of Biology
Biology Program

THESIS ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU
THESIS CO-ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. N. Cenk SESAL

ISTANBUL, 2017

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini benden esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile bana her zaman yol gösteren, çalışmalarımın her adımında bana yardım eden saygıdeğer danışmalarım Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU ve Doç. Dr. N. Cenk SESAL'a yardımlarından ve desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince bilgileri ile beni aydınlatan ve yardımlarını benden esirgemeyen çok değerli hocalarım Prof. Dr. Meral BİRBİR, Doç. Dr. Şener AKINCI, Doç. Dr. Filiz VARDAR ve Ar. Gör. Salim SÜNER'e emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Gerek eğitim hayatım gerek sosyal hayatımda her zaman yanımda olan, desteklerini ve yardımlarını benden esirgemeyen, hayatıma renk ve neşe katan canım arkadaşlarım Şevval Maral ÖZCAN, Nazlıhan YILDIRIM, Buse BERBER ve Busecan AKSOYDAN'a ve tez çalışmalarımda yardım ve destekleriyle her zaman yanımda olan Barış GÖKALSIN, Birkan AÇIKGÖZ ve Didem BERBER'e teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden bu yana her zaman yanımda olan, sevgi ve destekleri ile bana güç katan, karşılaştığım tüm zorluklarla mücadele etmemde bana yardımcı olan arkadaşlarım Mehveş MERTCAN, Orçun TOKSÖZ ve Selin ÖZEN'e dostluklarından dolayı teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca sevgisini ve desteğini benden esirgemeyen, aldığım tüm kararlarda yanımda duran ve başarılarımın en büyük mimarı olan canım annem Mahmure BESLER'e ve desteğini ve sevgisini benden esirgemeyen canım babam Vedat UÇARKUŞ'a, büyük bir sevgi ve özveri göstererek bugünlere gelmemi sağlayan canım teyzem Neziha ŞENDİR ve rahmetli anneannem Münevver BESLER'e teşekkür ederim.

Bu tez kapsamındaki çalışmalara FEN-C-YLP-250416-0193 no'lu proje ile destek olan Marmara Üniversitesi BAPKO ve 113S306 (COST FA 1202) no'lu proje ile destek olan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Ocak / 2017 **Ezgi Uçarkuş**

İÇİNDEKİLER / TABLE OF CONTENTS **SAYFA**

TEŞEKKÜRLER (ACKNOWLEDGEMENT) **i**

İÇİNDEKİLER / TABLE OF CONTENTS **ii**

ÖZET **v**

ABSTRACT **vi**

SEMBOLLER / SYMBOLS **vii**

KISALTMALAR / ABBREVIATIONS **viii**

ŞEKİLLERİN LİSTESİ / LIST OF FIGURES **ix**

TABLO LİSTESİ / LIST OF TABLES **xii**

1. GİRİŞ / INTRODUCTION **1**

1.1. Quorum Sensing (Salt Çoğunluk Algılama) Mekanizması 2

1.2. Biyofilm Oluşumu 3

1.2.1. Bakterinin yüzeye tutunması 4

1.2.2. Geri dönüşümsüz tutunma 4

1.2.3. Kolonizasyon 4

1.2.4. Kopma 4

1.3. *Pseudomonas aeruginosa* Hakkında Genel Bilgiler 5

1.3.1. Morfolojisi ve özellikleri 6

1.3.2. Epidemiyolojisi 6

1.3.3. *Pseudomonas aeruginosa* ve antibiyotik direnci 7

1.4. *Pseudomonas aeruginosa* ve Quorum Sensing Mekanizmaları 8

1.4.1. *lasI/lasR* sistemi 10

1.4.2. *rhl/rhlR* sistemi 10

1.4.3. Kinolon sinyal sistemi 10

1.5. *P. aeruginosa*'da Biyofilm Formunun Oluşması 11

1.6. Quorum Sensing ve Biyofilm İnhibisyonu 12

1.7. Likenlerin QSI Olarak Kullanımları 13

1.7.1. QS inhibisyonu çalışmalarında test edilecek liken türleri 14

1.7.1.1. *Evernia divaricata* (L.) Ach. 15

1.7.1.2. *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. 16

1.7.1.3. *Platismatia glauca* (L.) W.L.Culb. & C.F.Culb. 16

2. MATERYAL VE YÖNTEM / MATERIAL AND METHOD 18
2.1. Materyal 18
2.1.1. Bakteri suşları 18
2.1.2. Kullanılan sarf ve kimyasallar 18
2.1.3. Kullanılan cihazlar 19
2.1.4. Besiyerlerinin hazırlanması 20
2.1.4.1. Sıvı besiyeri – Lysogeny Broth (LB) 20
2.1.4.2. Sıvı minimal besiyeri – M9 Minimal Medium 20
2.1.4.3. Katı besiyeri – Lysogeny Broth Agar (LB Agar) 21
2.1.4.4. Soft Agar 21
2.1.5. Kimyasalların hazırlanması 21
2.1.5.1. Liken aseton özütlerinin hazırlanması 21
2.2. Yöntem 22
2.2.1. Bakteri suşlarının temini, saklanması ve çoğaltılması 22
2.2.2. Liken aseton özütlerinin *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerinde etkileri 23
2.2.3. Liken aseton özütleri ile QS inhibisyon testlerinin yapılması 23
2.2.4. Liken aseton özütleri ile biyofilm testlerinin yapılması 24
2.2.5. Swarming – Motility (Yayılma – Motilite Testleri) 25
3. BULGULAR VE TARTIŞMA / RESULTS AND DISCUSSION 26
3.1. Bulgular 26
3.1.1. Liken aseton özütlerinin *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerindeki etkileri 26
3.1.1.1. *E. divaricata* aseton özütünün *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerindeki etkileri 27
3.1.1.2. *H. tubulosa* aseton özütünün *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerindeki etkileri 30
3.1.1.3. *P. glauca* aseton özütünün *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerindeki etkileri 33
3.1.2. Liken aseton özütleri ile gerçekleştirilen QS inhibisyonu bulguları 35
3.1.2.1. *rhlA-gfp* suşunun QS inhibisyon bulguları 36

3.1.2.2. *lasB-gfp* suşunun QS inhibisyon bulguları 42
3.1.3. Liken aseton özütleri ile yapılan biyofilm testlerinin bulguları 49
3.1.4. Liken aseton özütleri ile gerçekleştirilen swarming-motility (yayılım-motilite) testlerinin bulguları 53
3.1.4.1. *E. divaricata* aseton özütü ile gerçekleştirilen swarming-motility testlerinin bulguları 54
3.1.4.2. *H. tubulosa* aseton özütü ile gerçekleştirilen swarming-motility testlerinin bulguları 55
3.1.4.3. *P. glauca* aseton özütü ile gerçekleştirilen swarming-motility testlerinin bulguları 56
3.2. Tartışma 56
4. SONUÇLAR/ CONCLUSIONS 62
KAYNAKLAR/REFERENCES 64
ÖZGEÇMİŞ 73

ÖZET

BOLU-ALADAĞLAR BÖLGESİNDEN TOPLANAN LİKEN TÜRLERİNİN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM SENSING MEKANİZMASI VE BİYOFİLM FORMU ÜZERİNE ETKİSİ

Bakterilerin meydana getirdikleri antibiyotik direnci ve biyofilm formu nedeniyle bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede sorunlar ortaya çıkmaktadır. Biyofilm oluşumu ve antibiyotik direnci gibi fizyolojik özelliklerin Quorum Sensing (QS) mekanizması sonucunda meydana geldiği bilinmektedir. Bu sebeple, bakterileri öldürmeden kimyasal sinyal molekülleri aracılığıyla gerçekleştirdikleri QS mekanizmasını inhibe edecek, doğa ve insan sağlığıyla dost biyolojik materyallere duyulan ihtiyaç artmaktadır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, tıbbi özellikleri itibariyle dünyada ve ülkemizde antik çağlardan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılan likenlerin Quorum Sensing inhibitörü (QSI) olarak kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Bolu-Aladağlar bölgesinden toplanan *Evernia divaricata, Hypogymnia tubulosa* ve *Platismatia glauca* türlerine ait aseton özütlerinin *Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşlarının QS mekanizması, biyofilm oluşumu ve swarming-motility özellikleri üzerindeki etkinlikleri incelenmiştir. *E. divaricata* aseton özütünün 35 µg/ml'lik dozu yaklaşık %38, *H. tubulosa* aseton özütünün 25 µg/ml'lik dozu yaklaşık %50 ve *P. glauca* aseton özütünün 25 µg/ml'lik dozu yaklaşık %22 oranında QS inhibisyonu gerçekleştirmiştir. Liken aseton özütlerinin düşük dozları biyofilm formunu yüksek dozlara göre daha yüksek oranda inhibe etmiş, özellikle *H. tubulosa* aseton özütünün 12,5 µg/ml'lik dozu %55 oranında biyofilm inhibisyonu sağlayarak en yüksek anti-biyofilm etkisine sahip liken türü olarak bulunmuştur. *E. divaricata* ve *P. glauca* aseton özütleri swarming-motility üzerinde etkinlik göstermemiş, *H. tubulosa* aseton özütü ise swarming-motility üzerinde neredeyse %100 inhibisyon sağlamıştır.

Elde edilen sonuçlarda *H. tubulosa*'ya ait aseton özütünün *P. aeruginosa* üzerinde en yüksek QSI potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir ve *P. aeruginosa* için biyofilm ve swarming-motility inhibitörü potansiyelinin de yüksek olduğu tespit edilmiştir. *E. divaricata* ve *P. glauca* aseton özütlerinin de belirli oranlarda QSI potansiyeline sahip oldukları görülmüştür. Böylece likenlerden elde edilen özütlerin antibiyotiklere yardımcı ilaç geliştirmede kullanılabilme potansiyeline dair ön bilgiler elde edilmiştir.

ABSTRACT

EFFECT OF LICHEN SPECIES THAT COLLECTED FROM BOLU-ALADAGLAR REGION ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM SENSING MECHANISM AND BIOFILM FORMATION

Antibiotic resistance and biofilm formation constituted by bacteria cause problems to struggle with infections. It is known that physiological properties such as biofilm formation and antibiotic resistance occur as a result of Quorum Sensing (QS) mechanism. For this reason, there is a growing need to utilize natural and human-friendly biological materials that will inhibit the QS mechanism through chemical signaling molecules without killing bacteria.

In the light of this information, potentials of Quorum Sensing Inhibitors (QSI) of lichens used in the treatment of many diseases since ancient times in the world and in our country due to their medical characteristics have been researched. The acetone extracts of *Evernia divaricata*, *Hypogymnia tubulosa* and *Platismatia glauca* lichen species collected from the Bolu-Aladağlar region were investigated on the QS mechanism, biofilm formation and swarming-motility properties of *Pseudomonas aeruginosa* bacterial strains. Acetone extracts of *E. divaricata* showed QS inhibition of approximately 38% at 35 μg / ml, approximately 50% at 25 μg / ml of *H. tubulosa* and approximately 22% at 25 μg / ml of *P. glauca*. Low doses of acetone extracts inhibited the biofilm form in higher rates than their high doses, especially *H. tubulosa* acetone extract 12.5 μg / ml indicated the highest anti-biofilm effect providing 55% biofilm inhibition. *E. divaricata* and *P. glauca* extracts showed no activity on swarming-motility, whereas *H. tubulosa* extract almost 100% inhibited swarming-motility.

Among the lichen species, the acetone extract of *H. tubulosa* showed the highest QSI potential on *P. aeruginosa,* and also high potential for biofilm and swarming-motility inhibitor. The acetone extracts of *E. divaricata* and *P. glauca* were found to have QSI potency at certain ratios. In this way, preliminary information on the potential for use of extracts obtained from lichens for antibiotic-assisted drug development has been obtained.

SEMBOLLER / SYMBOLS

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
3-oxo-C12-HSL	: N-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserin Lakton
C4-HSL	: N-bütiril Homoserin Lakton
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
l	: Litre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
mg	: Miligram
$MgSO_4$	: Magnezyum Sülfat
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
NaCl	: Sodyum Klorür
nm	: Nanometre

KISALTMALAR / ABBREVIATIONS

AHL	: Açil Homoserin Lakton (Acyl Homoserine Lactone)
AI	: Otoindüktör (Autoinducer)
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu (Acquired Immuno Deficiency Syndrome)
AIP	: Otoindükleyici Peptidler (Autoinducing Peptides)
CDC	: Hastalıklar Kontrol ve Koruma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECDC	: Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control)
GFP	: Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein)
OD	: Optik Yoğunluk (Optical Density)
PAI	: *Pseudomonas aeruginosa* otoindüktör molekülleri
PQS	: *Pseudomonas* Kinolon Sinyali
QQ	: Salt Çoğunluk Baskılama (Quorum Quenching)
QS	: Salt Çoğunluk Algılama (Quorum Sensing)
QSI	: Quorum Sensing İnhibitörü (Quorum Sensing Inhibitor)
UV	: Ultraviyole (Ultraviolet)

ŞEKİLLERİN LİSTESİ / LIST OF FIGURES **SAYFA**

Şekil 1.1. Bakterilerde biyofilm formunun mekanizması 4

Şekil 1.2. *P. aeruginosa* QS sistemleri ve gen regülasyonları 9

Şekil 1.3. *P. aeruginosa* QS mekanizmasında kullanılan sinyal molekülleri 9

Şekil 1.4. *Evernia divaricata* genel görünüşü 15

Şekil 1.5. *Hypogymnia tubulosa* genel görünüşü 16

Şekil 1.6. *Platismatia glauca* genel görünüşü 17

Şekil 2.1. Biyofilm testlerine ait resimler 25

Şekil 3.1. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 4,375 – 70 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği 27

Şekil 3.2. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 4,375 – 70 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği 28

Şekil 3.3. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun 4,375 – 70 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği 29

Şekil 3.4. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği 30

Şekil 3.5. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği 31

Şekil 3.6. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği 32

Şekil 3.7. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği 33

Şekil 3.8. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen 34

absorbans grafiği
Şekil 3.9. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği 35
Şekil 3.10. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 2,187 – 35 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği 36
Şekil 3.11. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 2,187 – 35 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % grafiği 37
Şekil 3.12. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 1,562 – 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği 38
Şekil 3.13. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 1,562 – 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % grafiği 39
Şekil 3.14. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 1,562 – 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği 40
Şekil 3.15. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 1,562 – 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % grafiği 41
Şekil 3.16. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 1 – 16 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda penisillik asit muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği 42
Şekil 3.17. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 2,187 – 35 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği 43
Şekil 3.18. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 2,187 - 35 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % grafiği 44
Şekil 3.19. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 2,187 – 35 µg/ml arasındaki 45

konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği
Şekil 3.20. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 2,187 - 35 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % grafiği 46
Şekil 3.21. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 2,187 – 35 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği 47
Şekil 3.22. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 2,187 - 35 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % grafiği 48
Şekil 3.23. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 1 – 16 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda penisillik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği 49
Şekil 3.24. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590nm) grafiği 50
Şekil 3.25. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590nm) grafiği 51
Şekil 3.26. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590nm) grafiği 52
Şekil 3.27. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun penisillik asit ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD:590 nm) grafiği 53
Şekil 3.28. Swarming-motility testlerinde kullanılan kontrol grupları 54
Şekil 3.29. *E. divaricata* aseton özütünün 3 farklı konsantrasyonu ile muamele edilmiş *P. aeruginosa* bakterisinin petri üzerindeki yayılımları 54
Şekil 3.30. *H. tubulosa* aseton özütünün 3 farklı konsantrasyonu ile muamele edilmiş *P. aeruginosa* bakterisinin petri üzerindeki yayılımları 55
Şekil 3.31. *P. glauca* aseton özütünün 3 farklı konsantrasyonu ile muamele edilmiş *P. aeruginosa* bakterisinin petri üzerindeki yayılımları 56

TABLO LİSTESİ / LIST OF TABLES **SAYFA**

Tablo 2.1. Liken aseton özütlerinin miktarlarına ait bilgiler 22

Tablo 2.2. Çalışmalarda kullanılan suşlar 23

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ / INTRODUCTION

Bakteri kaynaklı enfeksiyon ve hastalıkların tedavisinde uzun yıllardır antibiyotikler kullanılmaktadır. Antibiyotikler, bakterileri öldürerek ya da bakteri konsantrasyonunu patojen etki gösteremeyecekleri düzeye indirerek etki göstermektedirler. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, kullanılmakta olan çeşitli antibiyotiklere karşı bakterilerin direnç kazandıklarını, bunun sonucunda da antibiyotiklerin yetersiz kaldığı durumların ortaya çıktığını göstermektedir [1]. Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 2013 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 2 milyondan fazla bakteri kaynaklı enfeksiyonun meydana geldiğini ve bunlardan 23000'inin antibiyotik direncine bağlı olarak ölümle sonuçlandığını açıklamıştır. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Center for Disease Prevention and Control, ECDC) Avrupa'da bakteri kaynaklı enfeksiyonların 25000'inin antibiyotik direnci sebebiyle ölümle sonuçlandığını belirtmiştir. ECDC verilerine göre Avrupa'da bakteriyel enfeksiyonlardan kaynaklı sağlık problemleri sebebiyle yılda 15 milyar Euro, CDC verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde ise 35 milyar dolar kayıp meydana gelmektedir [2, 3].

Türkiye'de antibiyotik direnci ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda, özellikle Gram negatif bakterilerde antibiyotik direncinin arttığı görülmektedir. Hastane kaynaklı enfeksiyonların, ölüm riskini 2-3 kat artırırken aynı zamanda yatan hastalarda pnömoni ve nozokomiyal bakteriyeminin görülme oranını da yükselttiği belirtilmiştir [4].

Tüm dünyada antibiyotik direncinin artması, global bir sorun haline gelmektedir. Özellikle bakterilerin çoklu direnç geliştirmeleri sonucu kronik enfeksiyonlar meydana gelmekte, bu durum da toplum sağlığını ciddi boyutlarda tehdit etmektedir. Son yıllarda, bakterilerde meydana gelen direnç mekanizmaları ile ilgili çalışmalara ağırlık verilmiş, bu çalışmalar sonucunda da bakterilerde meydana gelen antibiyotik direncinde "Quorum Sensing" mekanizmasının rol aldığı görülmüştür [5, 6].

1.1. Quorum Sensing (Salt Çoğunluk Algılama) Mekanizması

Quorum Sensing (QS), bakterilerin "otoindükleyici" (AI) adı verilen kimyasal sinyal molekülleri aracılığıyla, populasyon yoğunluğuna bağlı olarak gerçekleştirdikleri hücre-hücre iletişim mekanizmasıdır. Bakterilerin populasyonları arttığında, ortamdaki AI molekülleri de artmakta, bu moleküllerin yoğunluğu belirli bir eşik düzeyini geçtiğinde ortamda bulunan bakteriler tarafından algılanmaktadır. Bakteriler tarafından algılanıp hücre içerisine alınan AI molekülleri, QS mekanizması ile kontrol edilen hedef genlerin ekspresyonunun yapılmasını sağlamaktadır [7, 8].

QS mekanizması, tür içi ve/veya türler arası olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bakterilerin tür içi QS mekanizmasında kullanılan sinyal molekülleri Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde farklılık göstermektedir. Gram pozitif bakteriler QS mekanizmasında "Otoindükleyici peptidler" (AIP) adı verilen sinyal moleküllerini kullanmaktadır. Gram negatif bakteriler ise QS mekanizmasında "Açil Homoserin Lakton" (AHL) adı verilen molekülleri kullanmaktadır. [9, 10]. AHL molekülleri ilk olarak *Vibrio fischeri* bakteri türünde belirlenmiştir. Bakterinin yoğunluğu belirli bir düzeye ulaştığında, sentezelenen sinyal moleküllerinin yoğunluğunda da artış gözlenmiş, bakterinin AHL molekülleri aracılığıyla biyolüminesans gerçekleştirdiği belirlenmiştir [11].

Gram negatif bakteriler QS mekanizmasında Lux sistemini kullanmaktadır. Lux sistemi iki öğeden meydana gelmektedir. Bu öğelerden biri AHL moleküllerini S-Adenozil Metiyoninden sentezleyen LuxI proteini, diğeri ise transkripsiyonel düzenleyici olan LuxR proteinidir. AHL molekülleri küçük boyutta ve lipofilik karakterde olmalarından dolayı hücre membranı boyunca kolayca difüze olmaktadır. LuxI proteini tarafından sentezlenen AHL molekülleri eşik değerin üstünde bir yoğunluğa ulaştıkları zaman ortamda bulunan bakteri hücreleri tarafından algılanıp hücre membranından difüze olarak sitoplazmaya geçer. Sitoplazmaya geçen AHL moleküllerinin düzenleyici olan LuxR proteini tarafından algılanmasıyla transkripsiyon faktörleri promotera bağlanır ve hedef genin ekspresyonu başlar [12, 13].

QS mekanizması, bakterilerin bulundukları ortama adapte olmaları ve üstünlük sağlayıp yaşam döngülerini devam ettirmeleri için bakterilere oldukça önemli avantajlar kazandırmaktadır. Bakterilerin virulens, biyofilm, antibiyotik direnci, pigment üretimi,

motilite gibi özellikleri QS mekanizması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bakterilerin bulundukları ortamdaki pH, sıcaklık değişimleri, dezenfektan ve antibiyotik varlığı, UV ışınları gibi olumsuz ortam koşullarına adapte olabilmeleri QS mekanizması ile sağlanmaktadır. QS mekanizması sonucunda bakteriler bulundukları ortamdaki olumsuz koşullara ve stres faktörlerine karşı daha dayanıklı olabilecekleri formlara dönüşebilmektedir [14, 15].

Bakterilerin QS mekanizması sonucu meydana gelen antibiyotik direnci ve biyofilm formu üzerinde en çok çalışılan konulardandır. Biyofilm formu meydana getiren bakterilerle mücadelede ciddi sorunların ortaya çıkması, bu yapının daha fazla araştırılması ihtiyacını doğurmuştur. [16, 17]. QS mekanizması ile biyofilm formunun arasındaki ilişkinin çözümlenmesi amacıyla özellikle son yıllardaki çalışmaların sayısı gittikçe artmakta ve biyofilm formuyla mücadele önem kazanmaktadır.

1.2. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir eksopolisakkarid matriks içerisine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye veya bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde yaşayan mikroorganizmaların topluluğudur. Biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, eksopolisakkarid matriks ve canlı veya cansız yüzeydir [18].

Biyofilmin yapısı %97 oranında su olmak üzere %2-5 oranında mikroorganizma, %1-2 oranında polisakkarid, %1-2 oranında protein, %1-2 oranında DNA ve iyonlardan oluşmaktadır. Biyofilm, tek bir bakteri türü tarafından oluşabileceği gibi, birden fazla bakteri türünü de yapısında bulundurabilmektedir. Farklı türlerden oluşan biyofilmde, her tür kendi kolonisini oluşturur. Bu koloniler birbirlerinden kanallar aracılığı ile ayrılırlar. Bu kanallar içerisinde devam eden su akışı, besin maddelerinin ve oksijenin difüze olmasını sağlamaktadır [19].

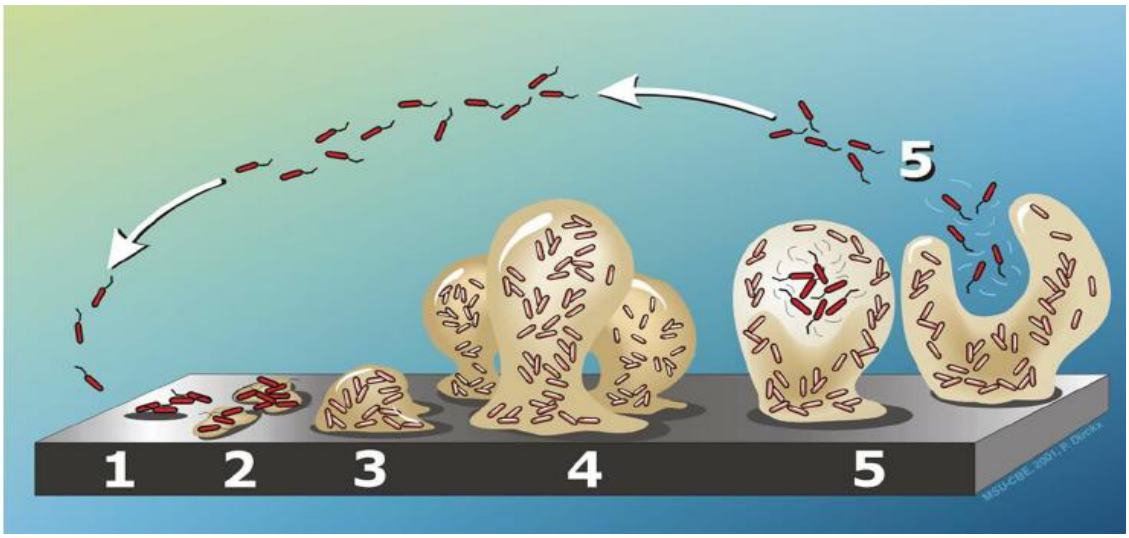
Olgun bir biyofilm formunun meydana gelmesi, sistemin yapısına, bakterinin türüne ve çevresel koşullara bağlı olarak birkaç saat ile birkaç hafta arasında zaman alır. Biyofilm oluşumu basamaklar halinde gerçekleşen bir olaydır. Biyofilm formu 4 aşamada meydana gelmektedir [Şekil 1.1].

1.2.1. Bakterinin yüzeye tutunması: Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben bakteriler yüzeye geri dönüşebilir özellikte tutunurlar. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasında elektrostatik veya fiziksel etkileşimler rol oynamaktadır.

1.2.2. Geri dönüşümsüz tutunma: Yüzeye tutunan bakteri hücreleri, hücre membranındaki proteinlerin uyarımı sonucunda eksopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye başlar. Eksopolisakkarid yapısının sentezlenmesiyle bakteri hücreleri birbirine ve yüzeye tutunur. Eksopolisakkarid aynı zamanda bakterilerin olumsuz çevre koşullarından korunmasını sağlamaktadır.

1.2.3. Kolonizasyon: Yüzeye tutunan bakteriler bölünerek çoğalırlar ve biyofilm yapısının en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluştururlar. Oluşan mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakterilerin de tutunmasıyla kolonizasyon sağlanır.

1.2.4. Kopma: Biyofilmin üst kısmından kopan bakteri hücreleri yeni yüzeylerde biyofilm oluşturabilir. Biyofilm oluştuktan sonra bakteride genetik düzenlemeler meydana gelir. Bu genetik düzenlemelerin sonucunda hareketi sağlayacak flagellalar sentezlenir, üst tabakadan kopmalar gerçekleşir ve kopan planktonik bakteri hücreleri yeni yüzeylerde biyofilm formu meydana getirmek üzerea ayrılır [20, 21].



Şekil 1.1. Bakterilerde biyofilm formunun mekanizması [22]. 1- Bakterinin yüzeye tutunması 2- Geri dönüşümsüz tutunma 3- Büyüme evresi I 4- Büyüme evresi II 5- Kopma

Bakterilerin biyofilm formu meydana getirmeleri bakterilere pek çok avantaj sağlamaktadır. Ortam koşullarının elverişsiz olduğu durumlarda biyofilm formu içerisinde yer alan bakteriler yaşam döngülerini devam ettirebilmekte, dezenfektan ve/veya antibiyotiklerin varlığında da bu kimyasal bileşenlere karşı daha dayanıklı olmaktadırlar. Yapılan çalışmalara göre, biyofilm formu meydana getiren bakterilerin, planktonik türlere göre antibiyotiklere karşı yaklaşık 1000 kat daha dirençli oldukları belirlenmiştir [23]. Kronik enfeksiyonların ortaya çıkmasında biyofilm formunun önemli bir role sahip olduğu ve hastane kaynaklı enfeksiyonların %60'ından fazlasının biyofilm formu ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır [24]. Son yıllardaki çalışmalar, özellikle birden fazla bakteri türünün oluşturduğu biyofilmlerde, bakterinin direnç genlerine ait plazmidlerin türler arasında konjugasyon ile aktarıldığı ve bu şekilde türler arasında antibiyotik direncine sahip genlerin paylaşıldığını ortaya koymaktadır. Geliştirdiği biyofilm formu ile yüksek antibiyotik direncine sahip olan başlıca bakteriler arasında *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* ve Enterokoklar yer almaktadır [25, 26].

Hastane kaynaklı patojenlerden biri olan *Pseudomonas aeruginosa,* meydana getirdiği biyofilm formu ile kronik enfeksiyonlara ve hatta ölümlere sebebiyet veren en önemli bakteri türlerinden biridir. Özellikle kistik fibröz hastalarının akciğerlerinde oluşturduğu biyofilm formu ile antibiyotik direncine sahip olan ve meydana getirdiği kronik enfeksiyonlarla mücadelede ciddi sorunlar yaşanan bu bakterinin Quorum Sensing mekanizması ve biyofilm formu üzerine yapılan çalışmalar önem kazanmaktadır [27, 28].

1.3. *Pseudomonas aeruginosa* Hakkında Genel Bilgiler

Pseudomonas aeruginosa, çoğunlukla immün sistemi baskılanmış ya da yetersiz olan kişilerde enfeksiyonlara yol açtığından dolayı fırsatçı patojen olarak bilinen Gram negatif bir bakteridir. Doğada yaygın olarak toprak, su ve bitkilerde bulunan ve çevre koşullarına kolaylıkla uyum sağlayabilen bir yapıdadır. Konak canlının immün sisteminin zayıfladığı durumlarda ciddi deri, idrar ve solunum yolu enfeksiyonlara sebep olabilmektedir [29, 30]. *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonların ölüme sebebiyet verme oranları da oldukça yüksektir. Özellikle kistik fibröz hastalarında kronik enfeksiyonlara neden olabilen, geliştirdiği çoklu ilaç direnci nedeniyle mücadelede sorunların ortaya çıkmasına sebebiyet veren önemli bir patojendir [31]. Amerika Birleşik Devletleri'nde

2003 yılında yapılan bir çalışmada, yoğun bakım ünitelerinde hastane kaynaklı kan yolu enfeksiyonlarının %34'üne, pnömonilerin %24'üne, idrar yolları enfeksiyonlarının %16,3'üne ve cerrahi bölge enfeksiyonlarının 9,5'ine *P.* aeruginosa'nın neden olduğu görülmüştür [32].

1.3.1. Morfolojisi ve özellikleri

P. aeruginosa zorunlu aerob, 0,5 – 1 μm genişliğinde, 1,5 – 5 μm uzunluğunda, düz ya da hafif kıvrımlı basil veya kokobasil morfolojisinde, ortalama 37°C'de sporsuz üreyen Gram negatif ve nonfermentatif bir bakteridir. *P. aeruginosa* kolonileri üredikleri besiyerinde türe has bir koku meydana getirirler. Tek bir kutbunda bulunan flagellası ile hareketli bir formdadır. Mikroskop altında genellikle tek olarak, bazen de zincir şeklinde gözlenebilir. *P. aeruginosa'*nın en karakteristik özelliği 'piyosiyonin' adı verilen yeşil renkli pigmentler üretmesidir. Bu özelliği sayesinde bulunduğu ortamdan kolayca izole edilebilmektedir. Bazı suşları piyorubin (kırmızı), piyomelanin (siyah) ve piyoverdin (sarı) adı verilen farklı renklerde pigmentler üretmektedir [33, 34, 35].

1.3.2. Epidemiyolojisi

P. aeruginosa, distile su gibi çok az besin kaynağının bulunduğu ortamlarda dahi kolaylıkla üreyebilen, yüksek sıcaklık gibi farklı fiziksel şartlara kolaylıkla adapte olabilen önemli bir fırsatçı patojendir. *P. aeruginosa* sağlıklı insanlarda enfeksiyonlara nadiren sebebiyet veren, çoğunlukla immün sistemi baskılanmış kişilerde ağır enfeksiyonlara yol açan bir bakteridir [36].

P. aeruginosa genellikle nemli ortamları seçtiğinden insanlarda kulak, perine, aksilla gibi nemli vücut bölgelerinde kolonize olurlar. Hastanelerde ise, solunum cihazları, kataterler, sondalar, ilaçlar, dezenfeksiyon solüsyonları, lavabo ve musluk yüzeyleri, besin maddeleri gibi nemlilik oranı yüksek yerlerde bulunurlar [37].

Özellikle kistik fibröz hastalarının akciğerlerde meydana getirdiği koloniler sebebiyle ciddi alt solunum yolu enfeksiyonlarına yol açar ve ilerleyen dönemde ölüme sebebiyet verebilir [38]. *P. aeruginosa*'nın sebep olduğu enfeksiyonlar arasında pnömoni, bakteriyemi, solunum yolu ve idrar yolu enfeksiyonları, merkezi sinir sistemi ve kulak enfeksiyonları yer almaktadır. Yanıkları bulunan hastaların derilerinde, kemoterapi alan

kanser hastalarında, cerrahi operasyon yapılmış hastalarda ve Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu (Acquired Immun Deficiency Syndrome, AIDS) hastalarında meydana gelen enfeksiyonların birçoğundan sorumludur. AIDS hastalarında *P. aeruginosa*'dan kaynaklı bakteriyemiden ölüm oranının %50, pnömoni ve septisemiden ölüm oranının ise yaklaşık %30 olduğu belirtilmektedir [39].

1.3.3. *Pseudomonas aeruginosa* ve antibiyotik direnci

P. aeruginosa kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde beta-laktam (penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler, beta-laktamaz inhibitörleri), aminoglikozit ve kinolon grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak, *P. aeruginosa*'da meydana gelen tekli ve çoklu antibiyotik direnci sonucunda, kullanılan bu antibiyotiklerin yetersiz ya da etkisiz kaldığı durumlar ortaya çıkmaktadır. *P. aeruginosa*'nın bazı suşları aminoglikozidleri, sefalosporinleri, florokinolonları ve karbapenemleri içeren antibiyotiklerin neredeyse tümüne karşı direnç göstermektedir [3].

CDC'nin 2013 yılındaki verilerine göre, yılda 51000 *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyon meydana gelmekte ve bunların 6700'üne çoklu antibiyotik direnci geliştirmiş *P. aeruginosa* neden olmaktadır. Meydana gelen bu enfeksiyonlardan 440'ı ise antibiyotik direncine bağlı olarak ölümle sonuçlanmaktadır [3].

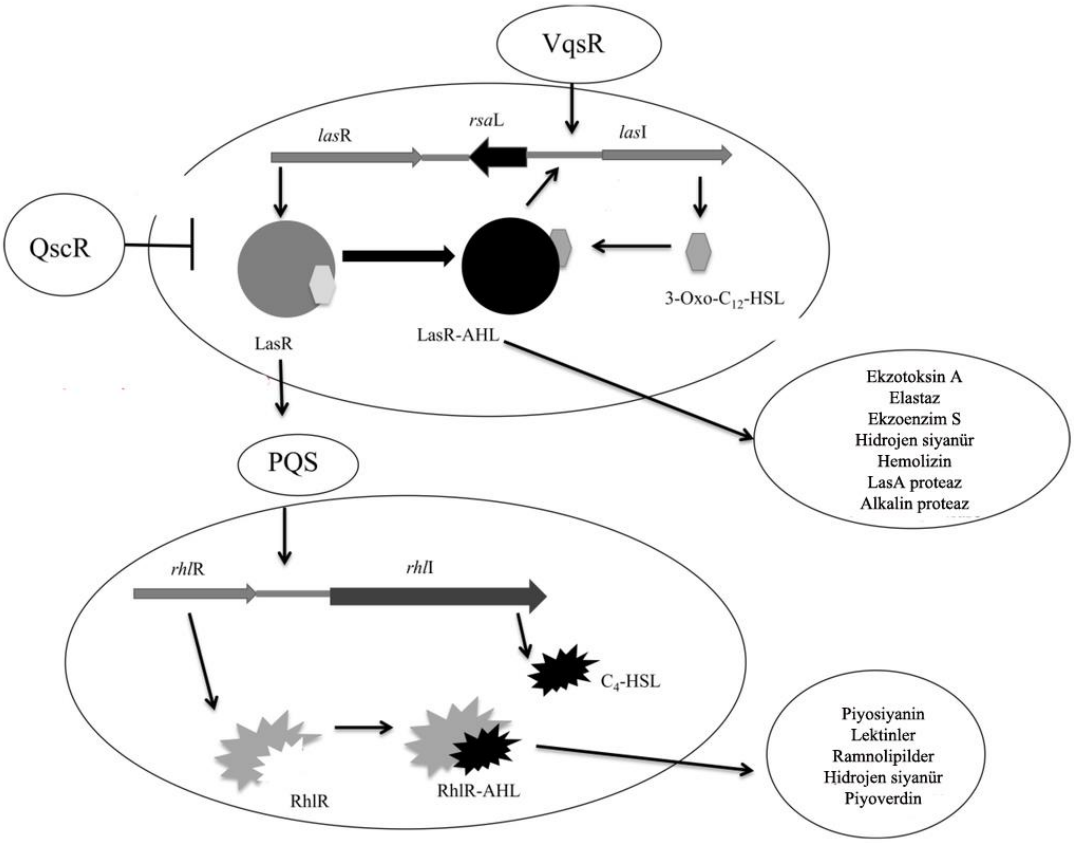
ECDC'nin 2014 yılındaki verilerine göre, Avrupa'daki ülkelerin çoğunluğunda *P. aeruginosa*'nın tüm antibiyotik gruplarına karşı %10'dan fazla oranda antibiyotik direnci gösterdiği rapor edilmiştir. Karbapanem direncinin Avrupa'daki tüm ülkelerde ortak sorun olduğu ve direnç oranlarının % 4,4 ile % 58,5 arasında değiştiği bildirilmiştir. *P. aeruginosa* suşlarının karbapanem direnci 2011 yılında %16,8 oranında iken, 2014 yılında bu oran %18,3'e yükselmiştir. *P. aeruginosa* izolatlarının yaklaşık %14,9'unun en az üç antibiyotik grubuna, %5,5'inin ise tüm antibiyotik gruplarına karşı dirençli olduğu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir [2].

P. aeruginosa'nın meydana getirdiği antibiyotik direncinin yüksek oranlarda ve yaygın olarak görülmesi sonucunda, bu bakteriden kaynaklı enfeksiyonlarla mücadelede yeni yolların keşfedilmesi önem kazanmıştır. Bu alanda yapılan çalışmalar, antibiyotik direncinin QS mekanizması sonucunda oluştuğunu göstermektedir [40, 41].

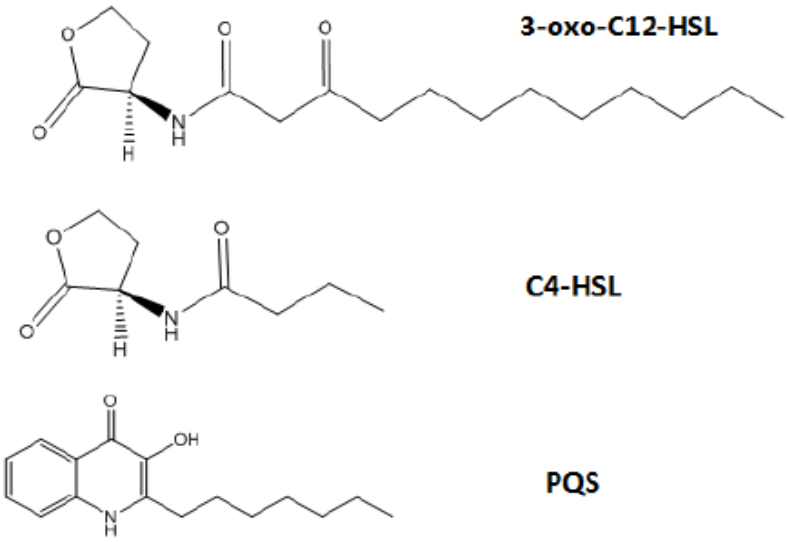
1.4. *Pseudomonas aeruginosa* ve Quorum Sensing Mekanizmaları

Birçok bakteri türünün gerçekleştirdiği gibi, *P. aeruginosa* da QS mekanizması sonucunda genlerini düzenleyip bazı fizyolojik özellikler kazanmaktadır. *P. aeruginosa*, pek çok Gram negatif bakteri gibi QS mekanizmasında kimyasal sinyal molekülleri olarak AHL'leri kullanmaktadır. *P. aeruginosa* QS sinyal molekülleri olarak 3-oxo-C_{12}-HSL ve C_4-HSL üretmektedir. Üretilen bu AHL moleküllerinin algılanıp hücre içerisine alınabilmesi için belirli bir eşik değeri geçmesi gerekmektedir. AHL molekülleri eşik değerin üzerine ulaştıklarında hücre içerisine alınmakta ve hedef genlerin ekspresyonu başlatılmaktadır [42, 43].

P. aeruginosa QS mekanizması luxI-luxR sistemlerine homolog olan lasI/lasR ve rhlI/rhlR sistemlerinden meydana gelmektedir (Şekil 1.1). lasI ve rlhI, AHL moleküllerinin sentezlenmesinde görev almaktadır. lasR ve rhlR ise *Pseudomonas* otoindükleyicilerinin (AIP) bağlandığı ve hedef genin ekspresyonunun başlatılmasında görev alan transkripsiyonel faktörlerdir. lasI, PAI-1 molekülünün, rhlI ise PAI-2 molekülünün sentezlenmesinden sorumludur. QS mekanizmasında sinyal molekülleri olarak kullanılan PAI-1 ve PAI-2 farklı zincir uzunluklarına sahip AHL molekülleridir. PAI-1, 3-oxo-C_{12}-AHL, PAI-2 ise C_4-AHL olarak tanımlanan QS sinyal molekülleridir [44, 45]. Las sistemi, LasA proteaz, alkalin proteaz, elastaz gibi enzimlerin ve hidrojen siyanür, ekzotoksin A ve hemolizin gibi virülens faktörlerinin sentezlenmesini sağlarken, Rhl sistemi de piyosiyanin ve piyoverdin gibi renk pigmentlerinin ve lektin ve ramnolipid gibi lipidlerin sentezlenmesinden sorumludur. *P. aeruginosa* QS sistemlerindeki transkripsiyonel faktörler ile sentezlenen sinyal molekülleri farklı olsa da, bu iki sistem birbirinden tamamen bağımsız olarak çalışmamaktadır. Las sisteminin Rhl sistemini kontrol etmesinin yanı sıra, bazı genlerin ekspresyonun gerçekleşebilmesi için her iki sistemin de çalışması gerekmektedir. Las ve Rhl sistemlerinin haricinde *Pseudomonas* kinolon sinyal sistemi (PQS) olarak adlandırılan üçüncü bir QS sistemi daha bulunmaktadır [46].



Şekil 1.2. *P. aeruginosa* QS sistemleri ve gen regülasyonları [47**].**



Şekil 1.3. *P. aeruginosa* QS mekanizmasında kullanılan sinyal molekülleri [48].

1.4.1. *lasI/lasR* sistemi

LasI/LasR sisteminde, "N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserin lakton" (3-oxo-C12-HSL; PAI-1) sinyal molekülü LasI tarafından sentezlenmektedir. Bakteri yoğunluğu arttıkça sentezlenen sinyal molekülü de artmakta, eşik değerin üzerinde bir yoğunluğa ulaştığında bakteri hücreleri tarafından algılanıp hücre içerisine alınmaktadır. Hücre içerisine alınan sinyal molekülleri LasR'ye bağlanıp hedef genlerin ekspresyonunu başlatmaktadır. Las sistemi sonucunda PQS sentezi, alkalin proteaz, elastaz ve lipaz üretimi, yüzme, kayma ve titreme hareketleri gibi fizyolojik özelliklerden sorumlu genlerin regülasyonu gerçekleştirilmektedir [49, 50].

1.4.2. *rhlI/rhlR* sistemi

RhlI/RhlR sisteminde "N-butanoyl-L-homoserin lakton" (C4-HSL; PAI-2) sinyal molekülü RhlI tarafından sentezlenmektedir. Bakteri popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak sentezlenmesi artan sinyal molekülleri, eşik değerin üzerinde yoğunluğa ulaştıklarında hücre içerisine alınmaktadır. Hücre içerisine alınan sinyal molekülleri RhlR'ye bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu başlatmaktadır. Rhl sistemi sonucunda ramnolipid, elastaz, piyosiyanin, lektin A ve B üretimi, kayma ve titreme hareketleri gibi fizyolojik özelliklerin oluşmasını sağlayan genlerin regülasyonu gerçekleşmektedir [49, 50].

1.4.3. Kinolon sinyal sistemi

P. aeruginosa, Pseudomonas Kinolon Sinyali (PQS) adı verilen üçüncü bir QS sistemine daha sahiptir. Bu sistem, 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon (PQS) sinyaline dayanmaktadır. PQS molekülünün sentezlenmesi için LasR genine ihtiyaç vardır. PQS, elastaz B ve RhlI genlerinin ekspresyonunu artırmaktadır. LasI/LasR sistemi PQS moleküllerinin sentezlenmesini gerçekleştirir, sentezlenen PQS molekülleri de RhlI/RhlR sisteminin aktivasyonunu sağlar. Böylece bu üç sistem arasında bir bağlantı oluşur [51].

1.5. *P. aeruginosa*'da Biyofilm Formunun Oluşması

Birçok bakteride olduğu gibi, *P. aeruginosa*'nın biyofilm formu oluşturmasında da QS sistemi rol almaktadır. QS sonucu bakteride biyofilm formu oluşturan genlerin ekspresyonu gerçekleşir ve biyofilm formu meydana gelir [52].

P. aeruginosa'da biyofilm oluşumu flagellanın canlı veya cansız bir yüzeye tutunması ile başlar. Tutunmanın ardından bakteri hücreleri tabakalar halinde çoğalmaya başlar ve Tip VI piliye bağlı olarak seğirme (twitching) adı verilen hareketi gerçekleştirirler. Bu hareket sonucunda mikrokoloniler oluşur ve bu mikrokoloniler olgun biyofilm yapısını meydana getirmek üzere farklılaşırlar. Olgunlaşma aşamasında ekstraselüler polisakkarit maddeler, ekstraselüler DNA ve proteinlerden meydana gelen bir matriks oluşur. Olgunlaşmanın ileriki aşamalarında biyofilm içerisindeki bakteri hücreleri ramnolipid sentezleyerek su kanallarını meydana getirirler. Meydana gelen su kanalları, dış ortamdaki besinlerin içeri alınırken hücresel atık ürünlerinin de dış ortama atılmasını sağlamaktadır. Olgunlaşmanın ardından son aşama olan kopma meydana gelir ve biyofilm tabakasının en üst kısmında yer alan bakteriler ekstraselüler matriksin açılmasıyla biyofilm formunu terk ederler [53, 54].

Hastane kaynaklı *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların %60'tan fazlası biyofilm formu ile ilişkidir. Biyofilm formu nedeniyle enfeksiyonların şiddeti artmakta, hastalık süresi uzamakta ve antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek oranlarda direnç görülmektedir. Cerrahi cihaz ve malzemelerin yüzeylerinde de biyofilm formunun oluşması sebebiyle özellikle cerrahi müdahale görmüş ve yatan hastalarda kronik enfeksiyonların ve ölümlerin görülme yüzdesi artmaktadır. Biyofilm formu içerisinde yer alan bakteriler, sahip oldukları direnç genleri plazmidlerini konjugasyon ile diğer türlere aktarabilmektedir. Bunun bir sonucu olarak bakteri türlerinden farklı antibiyotik gruplarına karşı hızla artan oranlarda direnç gelişimi görülmektedir [55, 56].

*P. aeruginosa'*nın bulunduğu ortamdaki stres koşullarına biyofilm formu meydana getirerek cevap vermesi tedavide ciddi problemlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmasında QS mekanizmasındaki Las sisteminin rol alması nedeniyle, bakterinin QS sisteminin inhibisyonu yönündeki çalışmalar önem kazanmıştır [57, 58].

1.6. Quorum Sensing ve Biyofilm İnhibisyonu

Bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde uzun yıllardır kullanılan antibiyotiklerin yanlış kullanımları sonucunda bakterilerde artan bir hızla antibiyotik direnci gelişmeye başlamıştır. Antibiyotiklerin bakterileri öldürerek etki etmeleri sonucunda bakteriler strese girmekte ve bunun sonucu olarak da antibiyotik direnci geliştirip biyofilm formu oluşturmaktadır. Meydana gelen biyofilm formu ve antibiyotik direncinin geri dönüşümsüz olması nedeniyle, bu iki olayın oluşmasının önüne geçilmesi önem kazanmıştır. Bakterilerin antibiyotik direnci ve biyofilm formu geliştirmelerinde QS mekanizmasının rol oynaması, bu sistemin inhibe edilmesi üzerine olan çalışmaların artmasına sebep olmuştur [59, 60]. Bakterilerin yaşam döngülerine etki etmeden ve onları strese maruz bırakmadan QS mekanizmasının inhibe edilmesi ve biyofilm formu oluşturmalarının da önüne geçilmesi son yıllarda en çok çalışılan konulardan biri haline gelmştir. QS mekanizmasının inhibe edilmesiyle antibiyotik direnci ve biyofilm formundan kaynaklanan kronik enfeksiyonların önlenebileceği düşünülmektedir [61].

QS sistemini inhibe ettiği bilinen ilk metabolitler Avustralya'ya özgü bir kırmızı alg olan *Delisea pulchra*'dan izole edilen halojenli furanonlardır. Bu franonlar, AHL reseptör proteinini parçalayarak Gram negatif bakterilerde AHL sistemi tarafından düzenlenen süreçleri engellemektedir [62]. Bitkilerden elde edilen ekstreler de, kimyasal yapıları QS sinyal moleküllerine benzerlik gösterdiği için Quorum Sensing inhibitörleri (QSI) olarak kullanılabilemektedir [63]. Zhang ve ark. yaptıkları bir çalışmada *Rosa rugosa* çayından elde ettikleri polifenol bileşenleri ile *Chromobacterium violaceum* bakterisinin QS sistemi tarafından kontrol edilen mor pigment oluşumunu inhibe etmişlerdir [64]. Rekha ve ark.,'nın yaptıkları çalışmada *Centella asiatica*'nın flavanoid yönünden zengin fraksiyonunun Gram negatif bakteriler üzerinde QSI etkisine sahip olduğu görülmüştür [65].

Literatürde, doğal moleküllerin bakterilerin QS mekanizmasını inhibe ettikleri gösterildiğinden, doğadaki potansiyel QSI molekülleri üzerinde yapılan çalışmalar son yıllarda hız kazanmaktadır. Likenler de ürettikleri sekonder metabolitler ile antimikrobiyal olarak tıp ve eczacılık alanında uzun yıllardır kullanılmakta ve bu özelliklerinden dolayı QSI potansiyeline sahip doğal kaynaklar arasında yer almaktadır.

1.7. Likenlerin QSI Olarak Kullanımları

Likenler, algler ile mantarların morfolojik ve fizyolojik ilişkileri ve simbiyotik birlikleri sonucunda oluşan organizmalardır. Liken yapısında bulunan algler fotobiyont, mantarlar ise mikobiyont olarak adlandırılmaktadır. Fotobiyontlar *Chlorophyta* (yeşil algler) ve *Cyanobacteria* (mavi-yeşil algler) sınıfından, mikobiyontlar ise çoğunlukla *Ascomycetes* olmak üzere *Basidiomycetes* ve *Deuteromycetes* sınıfındandır. Likenleri oluşturan alg ve mantar türleri morfolojik olarak transformasyona uğrayarak doğadaki serbest formlarından farklı bir morfolojiye sahip olurlar. Meydana gelen liken türü, kendini oluşturan her iki bileşenine de benzemeyen farklı bir morfolojik bütünlük gösterir. Yeryüzünde yaklaşık olarak 20000 kadar liken türü olduğu bilinmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalar sonucunda da Türkiye'de 1000'den fazla liken türü kaydedilmiştir [66, 67].

Likenler atmosferik kirlilik için indikatör görevi görmektedirler. Yüksek organizasyonlu bitkilerin aksine gelişmiş kök, gövde ve yaprak gibi organları olmadığı için havadaki nem ile birlikte kirletici faktörleri de direkt olarak talluslarında biriktirirler. Bu nedenle, hava kirliliğinin fazla olduğu bölgelerde kirletici faktörlere hassas olan liken türleri yerlerini daha dayanıklı türlere bırakırlar [68].

Likenler, mantar partnerleri tarafından üretilen ve sadece likenlere özgü olan sekonder metabolitlere sahiptir. Bu sekonder metabolitlerin büyük bir çoğunluğu asit yapısında olduğundan bu maddelere liken asitleri de denilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda 1000'den fazla liken sekonder metaboliti tanımlanmıştır. Liken sekonder metabolitlerinden tıp ve eczacılığın yanı sıra parfümeri, boya ve kimya endüstrisinde yararlanılmaktadır. Liken sekonder metabolitlerinin antibakteriyel, antifungal, antikanser ve antioksidan gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır [69, 70, 71]. Liken özütleri ve sekonder metabolitleri ile yapılan çalışmalarda pek çok liken türünün bakteriler ve mantarlar üzerinden antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu keşfedilmiştir [72, 73, 74, 75]. Manojlavic ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, *Evernia prunastri* ve *Pseudevernia furfuracea* liken türlerine ait sekonder metabolitlerin *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Bacillus mycoides* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu bulmuşlardır [76]. Kosanic ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada ise, *Cladonia* cinsine ait

bazı liken türlerinin yine bu 5 bakteri türü üzerinde antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu belirtilmiştir [77]. Nithyanand ve ark.'ları, liken sekonder metabolitlerinden olan usnik asidin *Streptococcus pyogenes* bakteri türü üzerinde hem antibakteriyel aktivite gösterdiğini hem de bakterinin biyofilm formunu inhibe ettiğini rapor etmişlerdir [78].

Yapılan çalışmalar sonucunda, liken sekonder metabolitlerinin ve bu metabolitleri içeren özütlerin pek çok bakteri üzerinde antibakteriyel etkinlik gösterdiği ve bakterilerin biyofilm formu oluşturmalarını inhibe ettiği görülmektedir. Sahip oldukları biyolojik aktiviteleri sonucunda likenlerin QSI olarak kullanılma potansiyellerinin araştırılması önem kazanmaktadır. Bakterilerin QS mekanizmasının likenlerden elde edilen özütler ve sekonder metabolitler ile inhibe edilmesi durumunda bakterilerin biyofilm formu oluşturmalarının önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

1.7.1. QS inhibisyonu çalışmalarında test edilen liken türleri

Gram negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkinlikleri literatürde yer alan çalışmalar ile kanıtlanmış liken türlerinden *Evernia divaricata, Hypogymnia tubulosa* ve *Platismatia glauca* QSI potansiyellerinin araştırılması için seçilmiştir. Aslan ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada *E. divaricata*'ya ait özütlerin Gram negatif ve Gram pozitif farklı bakteri türleri üzerinde antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur [79]. Shrestha ve ark.'larının yaptığı çalışmada, *P. glauca* aseton özütünün *P. aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir [80]. Yılmaz ve ark.'larının gerçekleştirdiği çalışmada, *H. tubulosa'*nın aseton, kloroform, etanol, dietileter ve petrolyum eter özütlerinin antibakteriyel etkinlikleri test edilmiş ve özellikle dietil eter ile aseton özütlerinin farklı bakteri türleri üzerinde antibakteriyel etkinlik gösterdiği saptanmıştır [81].

Özellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkinlikleri çeşitli çalışmalar ile belirlenen bu 3 liken türü, *P. aeruginosa* QS sistemi ve biyofilm formu üzerindeki etkinliklerinin incelenmesi amacıyla tez çalışmamızda kullanılmak üzere seçilmiştir.

1.7.1.1. *Evernia divaricata* (L.) Ach.

Evernia divaricata, dalsı-çalımsı morfoloji gösteren, yeşilimsi griden grimsi sarıya kadar değişen renklerde, 5 – 15 cm uzunluğunda, düzenli/düzensiz bir şekilde ikiye bölünmüş tallusa sahip, *Ascolichenes* ailesine ait bir liken türüdür (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. *Evernia divaricata* genel görünüşü

E. divaricata, Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'da geniş yayılım göstermektedir. Genellikle nemlilik oranı yüksek bölgelerde ve ormanlarda ağaç dalları ve gövdelerinde, özellikler koniferler üzerinde bulunmaktadır. Genellikle maksimum 15 cm uzunluğunda olmasına rağmen 30 cm'e kadar ulaştığı durumlar da gözlenmektedir [82, 83]

Evernia divaricata, antik çağlardan beri öksürüğün ve baş ağrılarının giderilmesinde, pnömonide, akciğer tüberkülozuna bağlı ani ateş yükselmelerinde, travmaya bağlı ortaya çıkan enfeksiyonlarda ve yılan zehirlenmelerinde geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. *E. divaricata*'nın sahip olduğu bu tür biyolojik aktivitelerin, içerdiği sekonder metabolitlerden meydana geldiği yapılan çalışmalar neticesinde bulunmuştur [84].

*E. divaricata'*nın içerdiği sekonder metabolitler evernik asit, divarikatik asit ve usnik asit olarak tanımlanmıştır. Evernik asit, $C_{17}H_{16}O_7$; divarikatik asit, $C_{21}H_{24}O_7$; usnik asit, $C_{18}H_{16}O_7$ moleküler formuna sahip antibakteriyel, antikanser ve antioksidan aktivite gösteren sekonder metabolitlerdir. Özellikle usnik asit, üzerinde en çok çalışılan liken sekonder metaboliti olup, *Alectoria, Cladonia, Usnea, Lecanora, Ramalina* ve *Evernia* cinslerinde yaygın olarak bulunmaktadır [85].

1.7.1.2. *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav.

Hypogymnia tubulosa, yapraksı morfoloji gösteren, yeşilimsi griden soluk yeşile kadar değişen renklerde, 3 - 8 cm uzunluğunda, başlık şeklinde soraller ie sonlanan tallus lobları yukarı doğru tüp şeklinde gelişme gösteren *Ascolichenes* ailesine ait bir liken türüdür (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. *Hypogymnia tubulosa* genel görünüşü

H. tubulosa, silisli kayaçlar, ağaçlar ve gövde sapları gibi asidik substratları seçme eğilimine sahiptir ve bundan dolayı deniz kıyısından dağlık bölgelere kadar geniş bir habitat alanı vardır [82, 83].

H. tubulosa'nın yapısında temel olarak bulunan sekonder metabolitler atranorin, physodic asit ve 3-hidroksipropanoik asit olarak tanımlanmıştır. Bununla beraber çok sık olmasa da yapısında 2'-O-methylphysodic asit bulundurduğu durumlar da bulunmaktadır. Atranorin, $C_{19}H_{18}O_8$; physodic asit, $C_{26}H_{30}O_8$; 3- hidroksipropanoik asit, $C_3H_6O_3$ ve 2'-O-methylphysodic asit, $C_{27}H_{32}O_8$ moleküler formuna sahip sekonder metabolitlerdir. [85].

1.7.1.3. *Platismatia glauca* (L.) W.L.Culb. & C.F.Culb.

Platismatia glauca, yapraksı morfoloji gösteren, üst yüzeyi soluk ve mat griden yeşilimse griye kadar değişen renklerde, alt yüzeyi tamamıyla siyah veya kahverengi veya beyaz alacalı olabilen, 1 – 6 uzunluğunda ve 1,5 cm genişliğinde tallusa sahip, *Ascolichenes* ailesine ait bir liken türüdür (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. *Platismatia glauca* genel görünüşü

P. glauca, genellikle konifer cinsi ağaçlar, kaya ve toprak üzerinde bulunmaktadır. Genellikle asidik ve yıkanmış habitatlarda yayılım gösteren kozmopolitan bir türdür [82, 83].

P. glauca'nın yapısında bulunan sekonder metabolitler atranorin, kaperatik asit ve kloroatranorin olarak bulunmuştur. Atranorin, $C_{19}H_{18}O_8$; kaperatik asit, $C_{21}H_{38}O_7$ ve kloroatranotin, $C_{19}H_{17}ClO_8$ moleküler formülüne sahip sekonder metabolitlerdir [85].

Antik çağlardan beri sağlık, kozmetik ve endüstri alanlarında kullanılan likenlerin içerdikleri sekonder metabolitler sebebiyle anti-QS etkinliğe sahip olabilecekleri düşünülmüş ve yüksek antibakteriyel etki gösteren *Evernia divaricata*, *Hypogymnia tubulosa* ve *Platismatia glauca* liken türleri çalışmalarda test edilmek üzere seçilmiştir. Liken aseton özütlerinin, meydana getirdiği antibiyotik direnci ve biyofilm formu nedeniyle kronik enfeksiyonlara sebep olan *Pseudomonas aeruginosa* QS mekanizması ve biyofilm formu üzerine etkileri araştırılarak, antibiyotiklerin yetersiz kaldığı durumlarda alternatif bir yöntem olarak likenlerin kullanılabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu tez kapsamında, *E. divaricata, H. tubulosa* ve *P. glauca* liken türlerinin QSI potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda, belirlenen liken türleri Bolu-Aladağlar bölgesinden toplanmış, aseton özütleri elde edilmiştir. Liken türlerine ait aseton özütlerinin anti-QS etkinliği biyosensör suşlar (*P. aeruginosa* lasB-gfp ve *P. aeruginosa* rhlA-gfp) kullanılarak floresan ışıma ölçümlerine göre gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, liken aseton özütlerinin QS sistemi tarafından düzenlenen biyofilm ve swarming-motility (yayılım-motilite) sistemleri üzerinde inhibisyon testleri yapılmıştır.

BÖLÜM 2

2. MATERYAL VE YÖNTEM / MATERIAL AND METHOD

2.1. Materyal

2.1.1. Bakteri suşları

1. *P. aeruginosa* PAO1 Yabanıl tip (Wild type)
2. *P. aeruginosa lasB-gfp*
3. *P. aeruginosa rhlA-gfp*

2.1.2. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar

1. LB Broth Besiyeri (Sigma-Almanya)
2. M9 Minimal Besiyeri (Amresco-ABD)
3. Bacto agar (Sigma-Almanya)
4. Etil Alkol (Merck-ABD)
5. Aseton (Merck-ABD)
6. Pudralı Lateks Eldiven (Beybi)
7. Alüminyum Folyo
8. Cam Deney Tüpleri
9. Portüp
10. Porselen Havanlar ve Tokmaklar (Superior)
11. Polistiren 96 Kuyucuklu Siyah Optik Mikroplaka (Thermo NUNC-ABD)
12. 96 Kuyucuklu Şeffaf Mikroplaka
13. Plastik Petri Kapları (Fıratmed-Türkiye)
14. Bek Alevi
15. Platin Öze
16. Eküvyon çubuk
17. Cam baget
18. Pipet Ucu (10µl, 100 µl, 1000 µl) (Axygen-ABD)
19. Quartz Spektrofotometre Küveti (1400 µl) (Hellma-Almanya)
20. Ultra Saf Su (ddH2O)
21. 0.45 µm'lik Filtre (Whatman-İngiltere)

22. Dimetil sülfoksit (Sigma-Almanya)
23. Gliserol (Merck-ABD)
24. Gentamisin (Duchefa-Hollanda)
25. Tetrasiklin (Duchefa-Hollanda)
26. Tiyamin (Duchefa-Hollanda)
27. Kazamino asitler (BD-ABD)
28. Glukoz (Merck-ABD)
29. Kristal viyole (Sigma-Almanya)
30. *Evernia divaricata* aseton özütü
31. *Hypogymnia tubulosa* aseton özütü
32. *Platismatia glauca* aseton özütü

2.1.3. Kullanılan cihazlar

1. **Multimod Mikroplaka Okuyucu ve Görüntüleyici (Biotek-ABD):** Bakterilerin floresan, absorbans ve biyofilm ölçümleri için kullanılmıştır.
2. **Ultra Derin Dondurucu (Esco-Singapur):** Bakteri suşlarının -86ºC'de uzun süreli saklanmasında (6 ay) kullanılmıştır.
3. **Derin Dondurucu (Vestel-Türkiye):** Bakteri suşlarının -20ºC'de kısa süreli saklanmasında (1-3 ay) kullanılmıştır.
4. **Manyetik Karıştırıcı (WiseStir-Almanya):** Besiyerleri ve kimyasalların hazırlanmasında ve karışımların homojenize edilmesinde kullanılmıştır.
5. **UV-VIS Spektrofotometre (Beckman-Coulter-ABD):** Sıvı bakteri süspansiyonlarının yoğunluk ölçümlerinde kullanılmıştır.
6. **Dijital Hassas Terazi (Ohaus-ABD):** Besiyeri ve katı kimyasalların tartımında kullanılmıştır.
7. **İnkübatör (Memmert-Almanya):** Besiyerlerine inokülen edilen bakteri suşlarının üretilmesi ve çoğaltılmasında kullanılmıştır.
8. **Vorteks (Heidolph-Almanya):** Sıvı bakteri kültürlerinin ve kimyasalların çalkalanmasında kullanılmıştır.
9. **Buzdolabı (Siemens-Almanya):** Hazırlanan kimyasalların ve besiyerlerinin +4ºC'de saklanmasında kullanılmıştır.

10. **Otoklav (Nüve-Türkiye):** Besiyerlerinin ve laboratuvar malzemelerinin sterilizasyon işlemlerinde kullanılmıştır.
11. **Mikropipetler (1000 µl, 100 µl, 10 µl) (Thermo/ Finnpipette-ABD):** Besiyerleri, sıvı bakteri kültürleri ve sıvı kimyasalların aktarımında kullanılmıştır.
12. **Mikrodalga Fırın (Phillips-ABD):** Besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.
13. **Class II Ayaklı Steril Güvenlik Kabini (Esco ve Faster-Singapur ve İtalya):** *In vitro* süreçte gerçekleşen tüm deneylerin yapılmasında ve kimyasalların hazırlanmasında kullanılmıştır.

2.1.4. Besiyerlerinin Hazırlanması

2.1.4.1. Sıvı besiyeri - Lysogeny Broth (LB)

- 10 g Tripton
- 5 g Maya özütü
- 5 g NaCl

20 g LB broth tartılarak alınmış ve bir miktar distile suda çözülmüştür. Hacmi 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.4.2. Sıvı minimal besiyeri - M9 Minimal Medium

- 10,5 g M9 Broth
- 5 g Glukoz
- 5 g Kazamino Asitler
- 2 mM $MgSO_4$
- 0,1 mM $CaCl_2$

LB besiyerinin oto-floresansı nedeniyle floresan ölçümlerini etkilememesi için deneylerde M9 minimal besiyeri kullanılmıştır. 10,5 g M9 broth tartılmış ve bir miktar distile su ile çözüldükten sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri oda sıcaklığına ulaştıktan sonra glukoz, kazamino asitler, tiyamin, $MgSO_4$ ve $CaCl_2$ eklenmiş, daha sonra son hacim didistile su ile 1000 ml'ye t suşlar için 30µg/ml son konsantrasyon olacak şekilde gentamisin antibiyotiği eklenmiştir.

2.1.4.3. Katı besiyeri - Lysogeny Broth Agar (LB Agar)

- 10 g Tripton
- 5 g Maya özütü
- 5 g NaCl
- 12 g Bacto agar

LB brothtan toz olarak 20 g tartılmış ve 12 g Bacto agar eklenerek bir miktar distile suda çözdürülmüştür. Ardından hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Otoklavdan çıktıktan sonra soğutularak steril koşullarda 90 mm çapındaki petri kaplarına 15'er ml dağıtılmıştır. Katılaşan besiyerleri kullanıma kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

2.1.4.4. Soft Agar

20 g LB broth ve 0,12 g Bacto agar bir miktar distile suda çözdürülmüştür. Ardından hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra deneylerde kullanılmak üzere oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir.

2.1.5. Kimyasalların hazırlanması

2.1.5.1. Liken aseton özütlerinin hazırlanması

Bolu-Aladağlar bölgesinden toplanan *Evernia divaricata, Hypogymnia tubulosa* ve *Platismatia glauca* liken türleri yabancı maddelerden temizlendikten sonra yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan liken örneklerinin her birinden 5 g tartılarak alınmış ve steril havanlarda herhangi bir çözücü eklemeden ezilerek toz haline getirilmiştir. Toz halindeki liken örnekleri kağıt poşetler içerisine alınmış ve steril falkon tüplerin içerisine yerleştirilmiştir. Her bir liken örneğinin üzerine 70 ml aseton çözücüsü eklenmiş ve örnekler karanlık bir ortamda 24 saat boyunca bekletilmiştir. Aseton, liken sekonder metabolitlerinin yüksek verimle elde edilmesini sağladığı için özüt çıkarma işlemlerinde çözücü olarak seçilmiştir. 24 saatlik beklemenin ardından aseton çözücüsü içerisindeki liken örnekleri filtre kağıtları ile süzülmüş ve steril cam petrilerin içerisine dökülerek

çözücünün ortam uzaklaşması için 24 saat bekletilmiştir. Bekleme süresince liken aseton özütlerinin oksidasyona uğramaması için cam petrilerin üzeri filtre kağıtları ile kapatılmıştır. Toz halindeki liken özütleri steril spatüller ile kazınarak steril falkon tüplerin içerisine konulmuştur. Toz halindeki liken özütleri tartılmış ve miktarları not edilmiştir. Her bir liken türüne ait aseton özütlerinin kuru ağırlık miktarları Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Steril falkon tüpler içerisindeki toz liken özütleri 5 ml %100'lük dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülmüştür ve 0,45 µm'lık filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Deneylerde kullanılmak üzere her bir liken özütünden 10 µl alınmış ve steril distile su ile 1000 µl'ye tamamlanarak DMSO oranı %1 olacak şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilen dozlardaki liken özütlerinin final konsantrasyonları Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Liken aseton özütlerinin miktarlarina ait bilgiler

Liken Türü	**Aseton Özütü Toz Ağırlık (g)**	**Aseton Özütü Stok Konsantrasyonu (mg/ml)**
Evernia divaricata	0,12974	25,948
Hypogymnia tubulosa	0,09736	19,472
Platismatia glauca	0,09772	19,944

2.2. Yöntem

2.2.1. Bakteri suşlarının temini, saklanması ve çoğaltılması

Floresan biyosensör suşlar, QS ile düzenlenen *lasB* ve *rhlA* genleri ile GFP füzyonu ve marker olarak gentamisin direnç geni bulundurmaktadır. Böylece bakterinin QS mekanizması aktif iken ilgili genlerin ekspresyonu gerçekleşmekte, buna bağlı olarak GFP sentezlenmekte ve floresan ışıma ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla floresan miktarı, bakteri yoğunluğu ve QS mekanizmasının çalışmasıyla orantılı olarak gerçekleşmektedir.

Kullanılan biyosensör bakteri suşları Kopenhag Üniversitesi, Tim Holm Jakobsen ve Michael Givskov'dan, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bakteri suşu Yeditepe Üniversitesi'nden temin edilmiştir (Tablo 2.2). Bakteri stok kültürleri, -86 °C'de %50 gliserol içerisinde muhafaza edilmiştir. Stok kültürden deney sırasında kullanmak üzere

LB broth besiyerine ardı ardına 2 kez pasaj alınmıştır. Sıvı besiyerinde gelişen kültürlerin saflığı plağa çizim yöntemi ile kontrol edilmiştir.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan suşlar.

P. aeruginosa	**Suş**	**Özellikler**
	PAO1	Yabanıl tip (Wild type)
	rhlA-gfp	$Gm^{r\text{-}30\gamma}$; PAO1-ATCC, $P_{rhlA\text{-}gfp}$(ASV)-P_{lac}-*rhlR*-mini-Tn5 türevi: pMHRA [86]
	lasB-gfp	$Gm^{r\text{-}30\gamma}$; PAO1-ATCC, $P_{lasB\text{-}gfp}$(ASV)-P_{lac}-*lasR*-mini-Tn5 türevi: pMHLAS [87]

2.2.2. Liken aseton özütlerinin *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerinde etkileri

Liken aseton özütlerinin *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerindeki etkileri 96 kuyucuklu şeffaf plakalar kullanılarak seri mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiştir. Mikroplaka kuyucuklarına 100 µl LB broth besiyeri konulmuştur. Yatay sıralarda bulunan ilk kuyucuklara *E.divaricata, H. tubulosa* ve *P. glauca* aseton özütlerinin her birinden ayrı ayrı olacak şekilde 100 µl eklenmiş, pipetaj yapılarak kuyucuklardan 100 µl çekilmiş ve bir sonraki kuyucuğa eklenmiştir. Bu işlem 5 kuyucuk boyunca tekrarlanmış ve her bir liken grubunda ½ oranında azalan bir seri dilüsyon elde edilmiştir. *P. aeruginosa* suşları 1 Mc Farland standardında (yaklaşık $3x10^8$ kob/ml) ayarlanmış ve kör olarak belirlenen kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 100 µl bakteri süspansiyonları eklenmiştir. Kör olarak LB broth besiyeri, kontrol grupları olarak LB broth besiyeri ile bakteri süspansiyonu ve antibiyotik olarak tetrasiklin kullanılmıştır. Mikroplakalar Cytation 3 (BioTek) cihazına konulmuş ve 37°C'de OD:600 nm'de ölçümler alınmıştır. Tüm testler 3 kez tekrarlanmıştır.

2.2.3. Liken aseton özütleri ile QS inhibisyon testlerinin yapılması

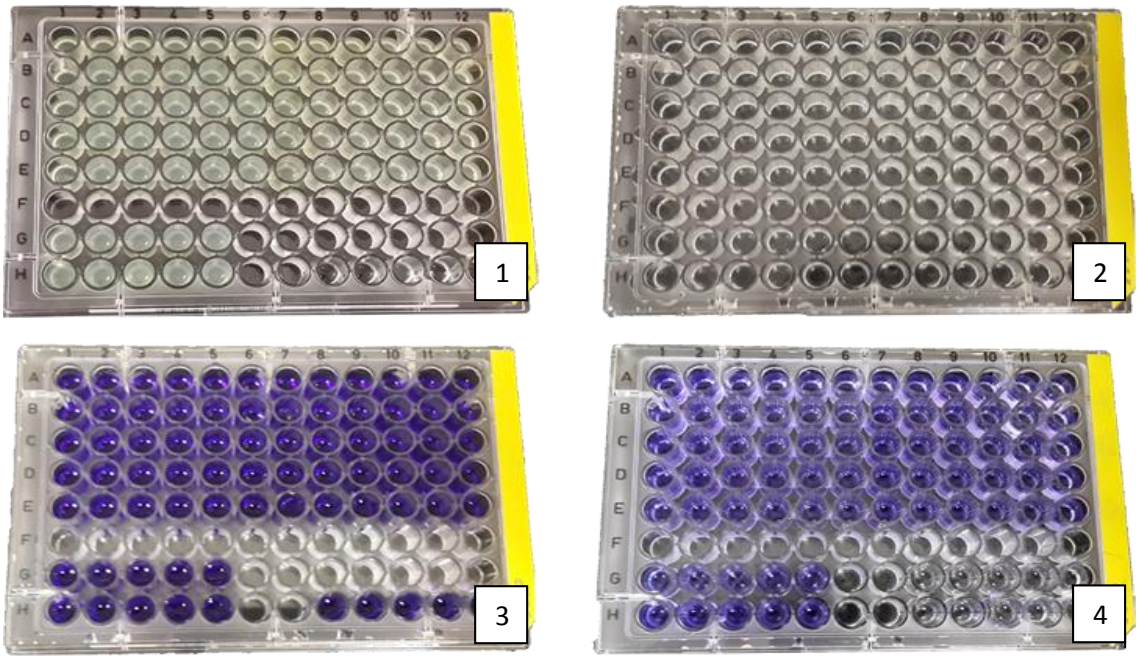
QS inhibisyon testleri floresan ölçümler için üretilen 96 kuyucuklu optik siyah mikroplakalar kullanılarak seri mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Mikroplaka kuyucuklarına 100 µl M9 minimal besiyeri konulmuştur. Yatay sıralarda bulunan ilk kuyucuklara *E.divaricata, H. tubulosa* ve *P. glauca* aseton özütlerinin her

birinden ayrı ayrı olacak şekilde 100 µl eklenmiş, pipetaj yapılarak kuyucuklardan 100 µl çekilmiş ve bir sonraki kuyucuğa eklenmiştir. Bu işlem 5 kuyucuk boyunca tekrarlanmış ve her bir liken grubunda ½ oranında azalan bir seri dilüsyon elde edilmiştir. Sensör suşlar 1 McFarland (yaklaşık $3x10^8$ kob/ml) standardında ayarlanmış ve kör olarak belirlenen kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 100 µl bakteri süspansiyonları eklenmiştir. Kör olarak M9 minimal besiyeri, kontrol grupları olarak M9 besiyeri ile bakteri süspansiyonu ve *P. aeruginosa* üzerinde QSI etkisi olduğu bilinen penisilik asit kullanılmıştır. Mikroplakalar floresan ölçümlerin alınması için Cytation 3 (BioTek) cihazına konulmuş floresan ışımalar 485 ve 535 nm'de, absorbans OD 600 nm'de 16 saat boyunca ölçülmüştür.

2.2.4. Liken aseton özütleri ile biyofilm testlerinin yapılması

Liken aseton özütlerinin *P. aeruginosa* biyofilm formu üzerindeki etkinlik testleri 96 kuyucuklu şeffaf mikroplakalar kullanılarak seri mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) standardında hazırlanan bakteri süspansiyonu LB broth besiyeri ile 1:100 oranında seyreltilmiş ve kör olarak kullanılan kuyucuklar hariç tüm kuyucuklara 100 µl seyreltilmiş bakteri süspansiyonundan konulmuştur. Test edilecek liken özütlerinin konsantrasyonları makrodilüsyon ile seyreltildikten sonra kuyucuklara eklenmiştir. Biyofilm testi okumalarında kör olarak kullanılmak üzere 5 kuyucuk boş bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak penisillik asit içeren grup ile sadece seyreltilmiş bakteri süspansiyonu içeren gruplar kullanılmıştır. Mikroplakalar 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

24 saatlik inkübasyonun ardından mikroplakalardaki tüm kuyucuklar planktonik bakteri hücrelerinin ortamdan uzaklaştırılması için boşaltılmış ve 3 defa distile su ile yıkanmıştır. Distile su ile yıkanan mikroplakalar kuruduktan sonra kör olarak kullanılacak kuyucuklar hariç tüm kuyucuklara 150 µl %0,1'lik kristal viyole solüsyonu eklenmiş ve biyofilm formunu boyaması için 10 dakika boyunca beklenmiştir. Bekleme süresi tamamlandığında fazla boyanın ortamdan uzaklaştırılması için kuyucuklar 3 defa distile su ile yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Mikroplakaların kurumasının ardından tüm kuyucuklara 150 µl %96'lık etanol eklenmiş ve Cytation 3 (BioTek) cihazında 590 nm'de etanol grubu kör olarak kullanılarak ölçümler alınmıştır. Tüm testler 5 kez tekrarlanmıştır. Deneylere ait resimler Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Biyofilm testlerine ait resimler. 1- 24 saatlik inkübasyon sonrasında bakteri kültürleri. 2- Planktonik bakteri hücrelerinin ortamdan uzaklaştırılması. 3- Biyofilm yapısının kristal viyole ile boyanması. 4- Kristal viyole ile boyanan biyofilm yapısının etanol ile çözdürülmesi

2.2.5. Swarming – Motility (Yayılma – Motilite Testleri)

Swarming-Motility testleri Zhang ve ark.'larının çalışmalarında kullandığı metot modifiye edilerek steril plastik petriler kullanılarak gerçekleştirilmiştir [64]. Swarming-motility testlerinde kullanılmak üzere steril plastik petrilere önceden LB Agar hazırlanarak dökülmüştür. 3 ml %0,5'lik soft agar içerisine final konsantrasyonları anti-QS ve biyofilm deneylerde test edecek konsantrasyonlarla aynı olacak şekilde liken aseton özütlerinden eklenmiş, vortekslenerek homojen hale getirilmiş ve petrilerin üzerine yavaşça dökülerek yayılmıştır. Soft agarın tamamen kurumasının ardından 0,5 McFarland standardına (yaklaşık $1,5x10^8$ kob/ml) göre ayarlamış *P. aeruginosa* platin öze ile petrilerin merkezine inoküle edilmiştir. Kontrol grubu olarak QSI etkisi bilinen Vulpinik asit ve sadece soft agar ve DMSO içeren gruplar kullanılmıştır. Petriler ters çevrilerek 37°C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. 16 saatlik inkübasyonun ardından petrilerdeki deney gruplarının fotoğrafları saat başı çekilmiş ve bakteri yayılımları gözlenmiştir. Tüm testler 3 kez tekrar edilmiştir.

BÖLÜM 3

3. BULGULAR VE TARTIŞMA / RESULTS AND DISCUSSION

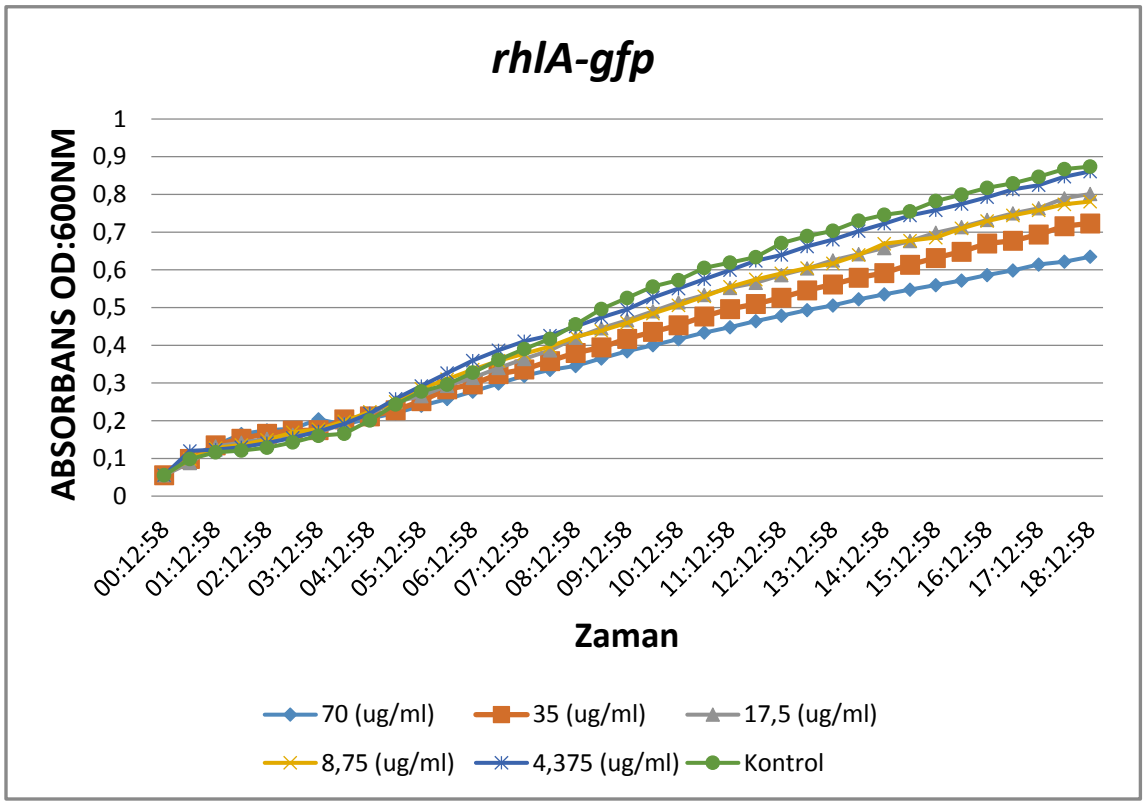
3.1. Bulgular

3.1.1. Liken aseton özütlerinin *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerindeki etkileri

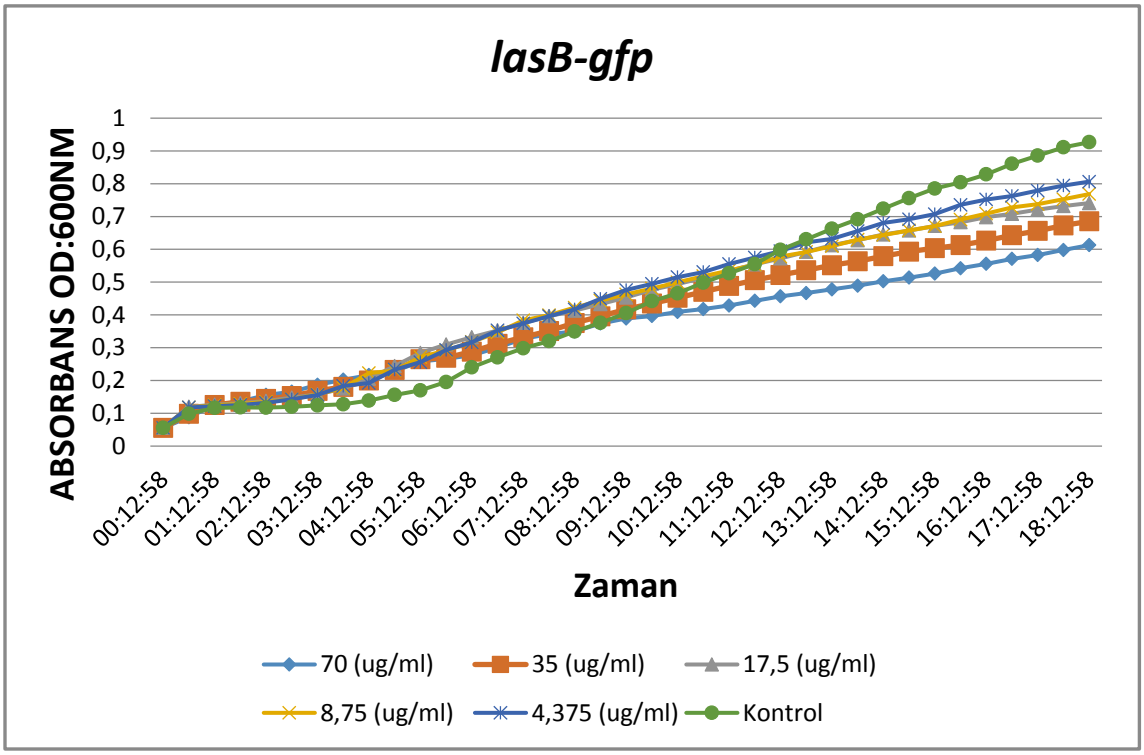
E. divaricata, H. tubulosa ve *P. glauca* liken aseton özütlerinin anti-QS etkinlik testleri gerçekleştirilmeden önce özütlerin *P. aeruginosa* suşlarının (PAO1, *lasB-gfp, rhlA-gfp*) büyüme eğrileri üzerindeki etkileri test edilmiştir. *E. divaricata* aseton özütünün 70 µg/ml, 35 µg/ml, 17,5 µg/ml, 8,75 ve 4,375µg/ml; *H. tubulosa* ve *P. glauca* aseton özütlerinin 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 ve 3, 125 µg/ml dozları bakteri suşlarına uygulanmıştır. 18 saat boyunca 15 dakikada bir alınan absorbans ölçümleri (OD: 600 nm) sonucunda elde edilen verilerle büyüme eğrisi grafikleri hazırlanmış, büyümeyi inhibe eden ve etmeyen konsatrasyonlar belirlenmiştir.

3.1.1.1. *E. divaricata* aseton özütünün *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerindeki etkileri

E. divaricata aseton özütünün 4,375µg/ml - 70 µg/ml arasında değişen dozları ile muamele edilen *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrisi grafikleri aşağıda verilmiştir.

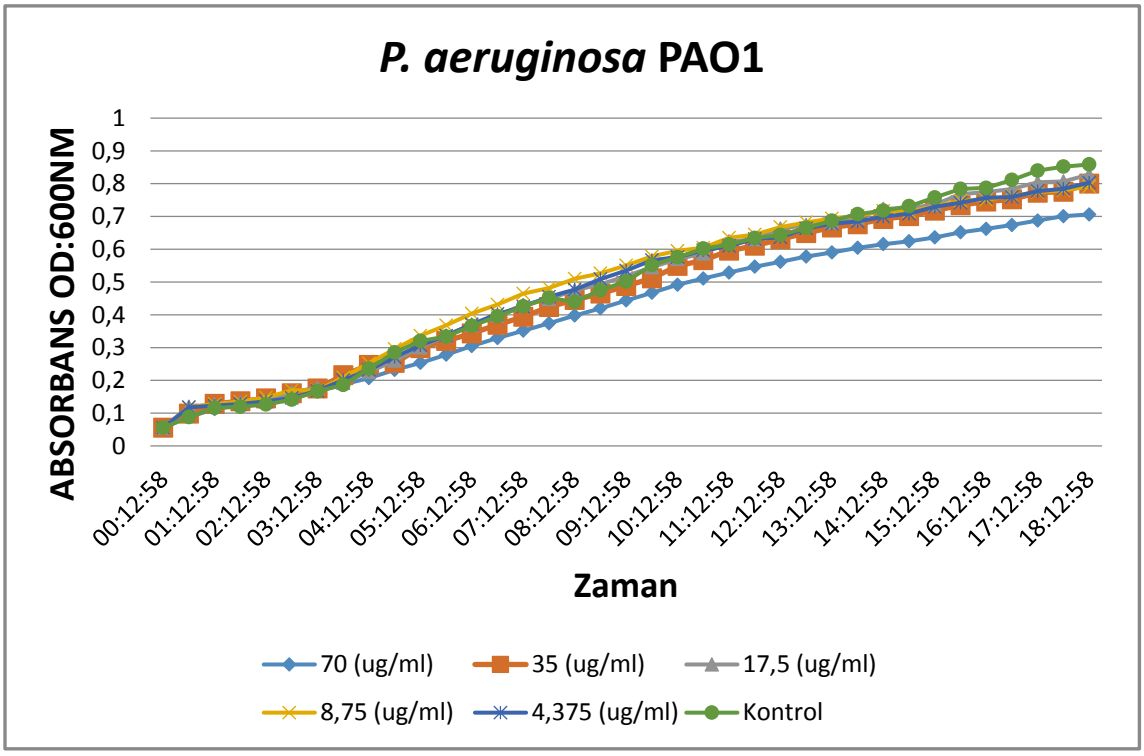


Şekil 3.1. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 4,375 – 70 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği. Kontrol grubuna *E. divaricata* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.



Şekil 3.2. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 4,375 – 70 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği. Kontrol grubuna *E. divaricata* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.

Zamana bağlı büyüme eğrileri değerlendirildiğinde, *E. divaricata* aseton özütünün uygulanan en yüksek dozu olan 70 µg/ml'lik konsantrasyonunun *rhlA-gfp* ve *lasB-gfp* suşlarının büyümelerini %35 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Azalan dozlarla birlikte bakteri büyümesi üzerindeki inhibisyon oranlarında da azalmalar meydana gelmiş ve biyosensör suşların büyümesini düşük oranlarda inhibe eden dozlar anti-QS testlerinde kullanılmak üzere belirlenmiştir.

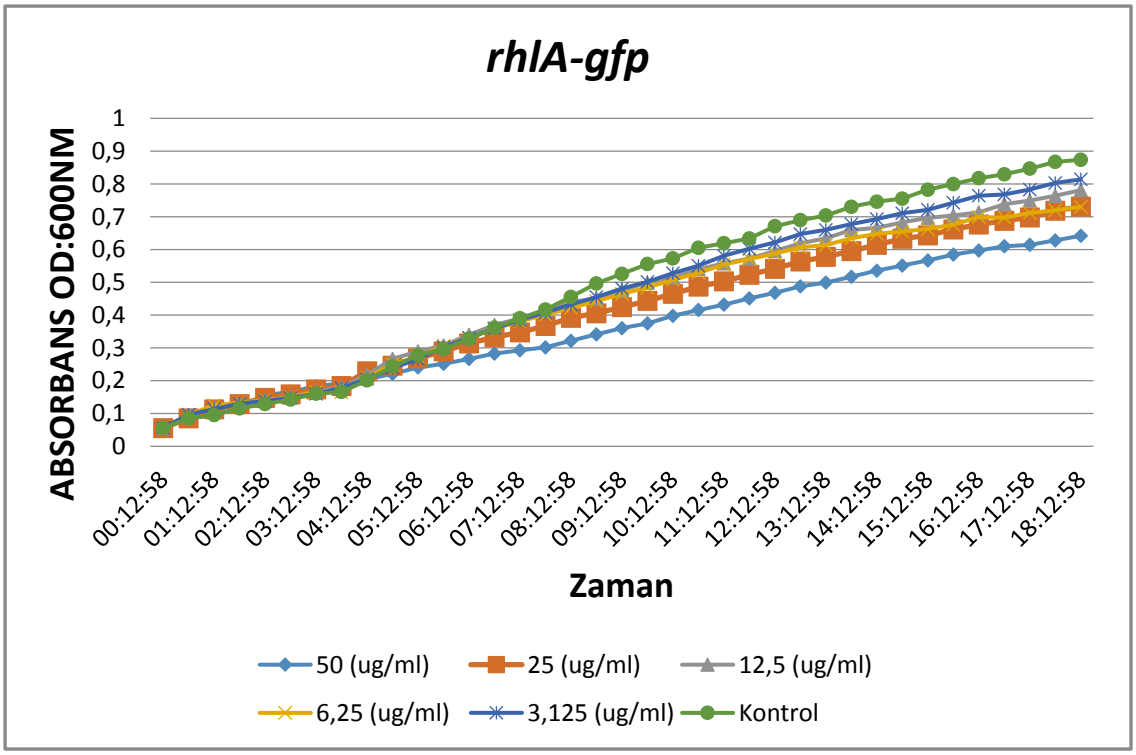


Şekil 3.3. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun 4,375 – 70 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği. Kontrol grubuna *E. divaricata* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.

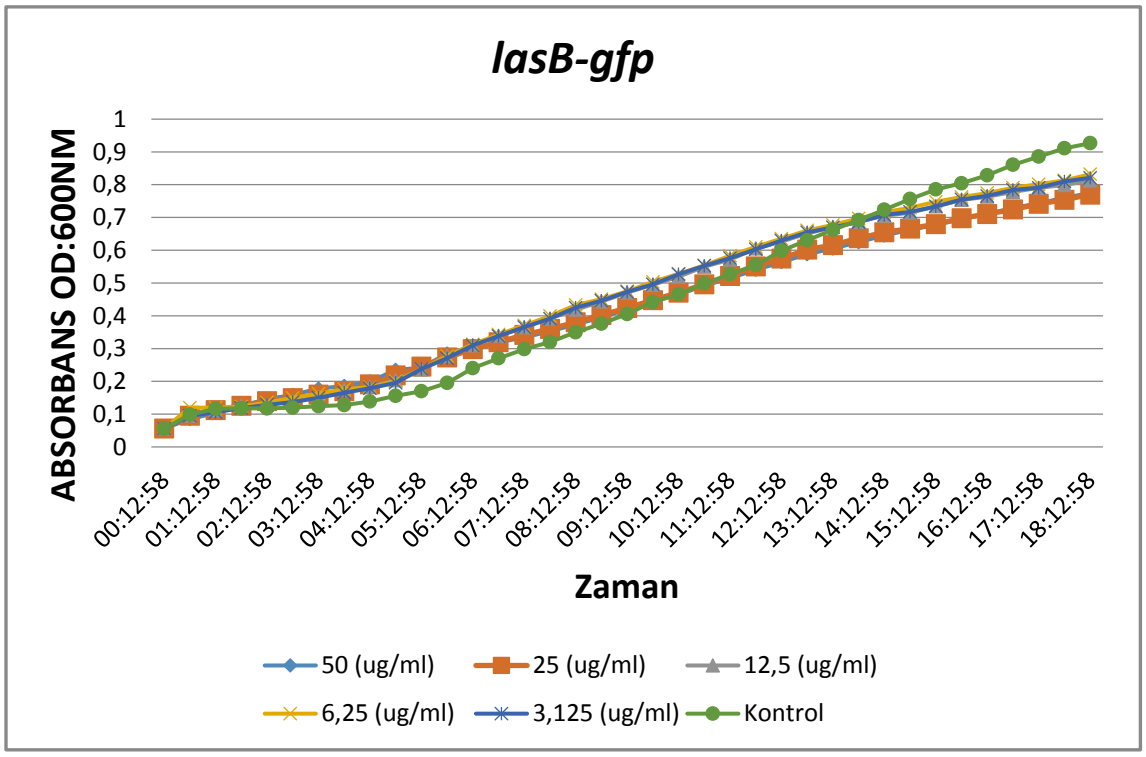
Zamana bağlı büyüme eğrileri değerlendirildiğinde, *E. divaricata* aseton özütünün 70 µg/ml'lik konsantrasyonda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyümesini %20 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Test edilen diğer dozlar ise bakteri büyümesi üzerinde önemli oranda inhibisyon meydana getirmemiştir. Bakterinin büyümesini inhibe etmeyen dozlar biyofilm ve swarming-motility testlerinde kullanılmak üzere belirlenmiştir.

3.1.1.2. *H. tubulosa* aseton özütünün *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerindeki etkileri

H. tubulosa aseton özütünün 3,125 µg /ml - 50 µg/ml arasında değişen dozları ile muamele edilen *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrisi grafikleri aşağıda verilmiştir.

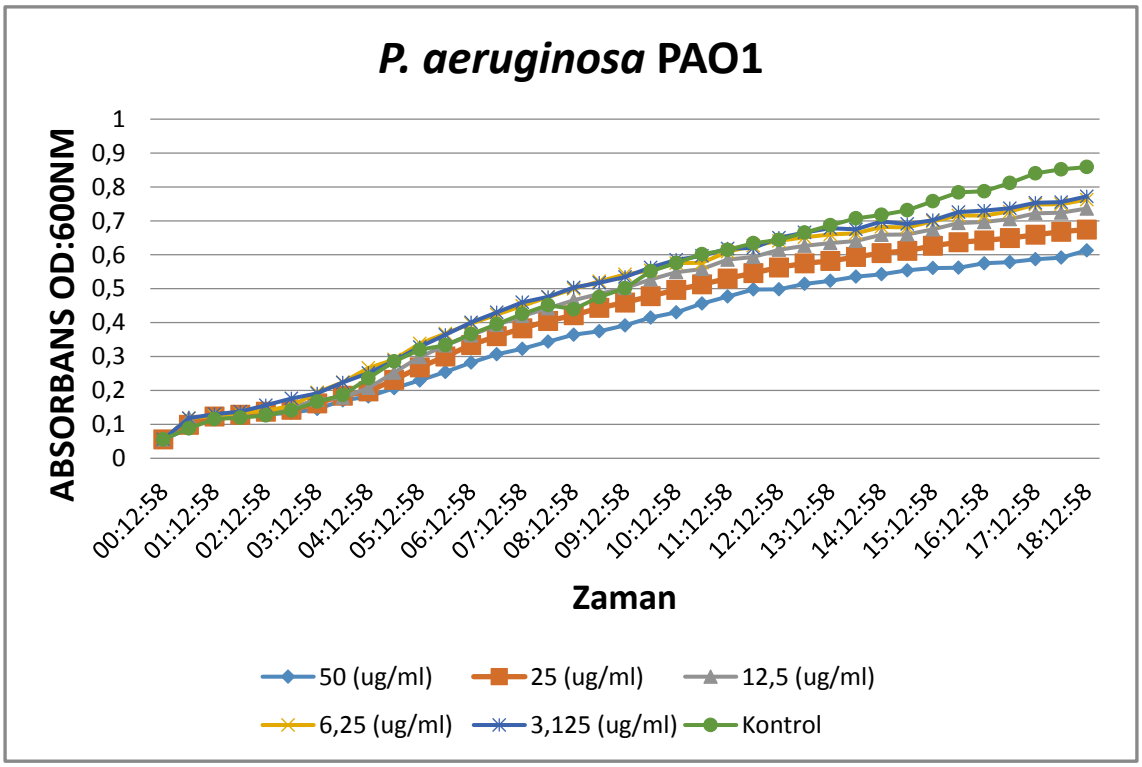


Şekil 3.4. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği. Kontrol grubuna *H. tubulosa* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.



Şekil 3.5. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği. Kontrol grubuna *H. tubulosa* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.

Zamana bağlı büyüme eğrileri değerlendirildiğinde, *H. tubulosa* aseton özütünün uygulanan en yüksek dozu olan 50 µg/ml'lik konsantrasyonunun *rhlA-gfp* ve *lasB-gfp* suşlarının büyümelerini %35 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Test edilen diğer dozların biyosensör suşların büyümesini önemli oranlarda inhibe etmediği tespit edilmiş ve bu dozlar anti-QS testlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

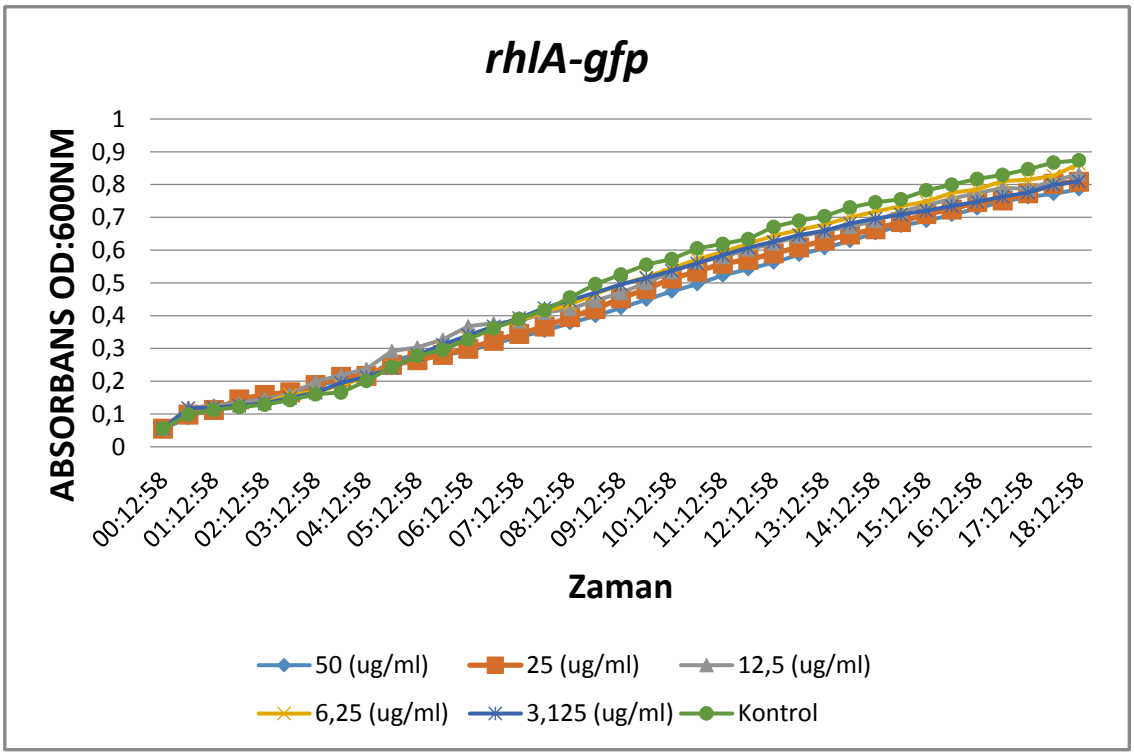


Şekil 3.6. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği. Kontrol grubuna *H. tubulosa* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.

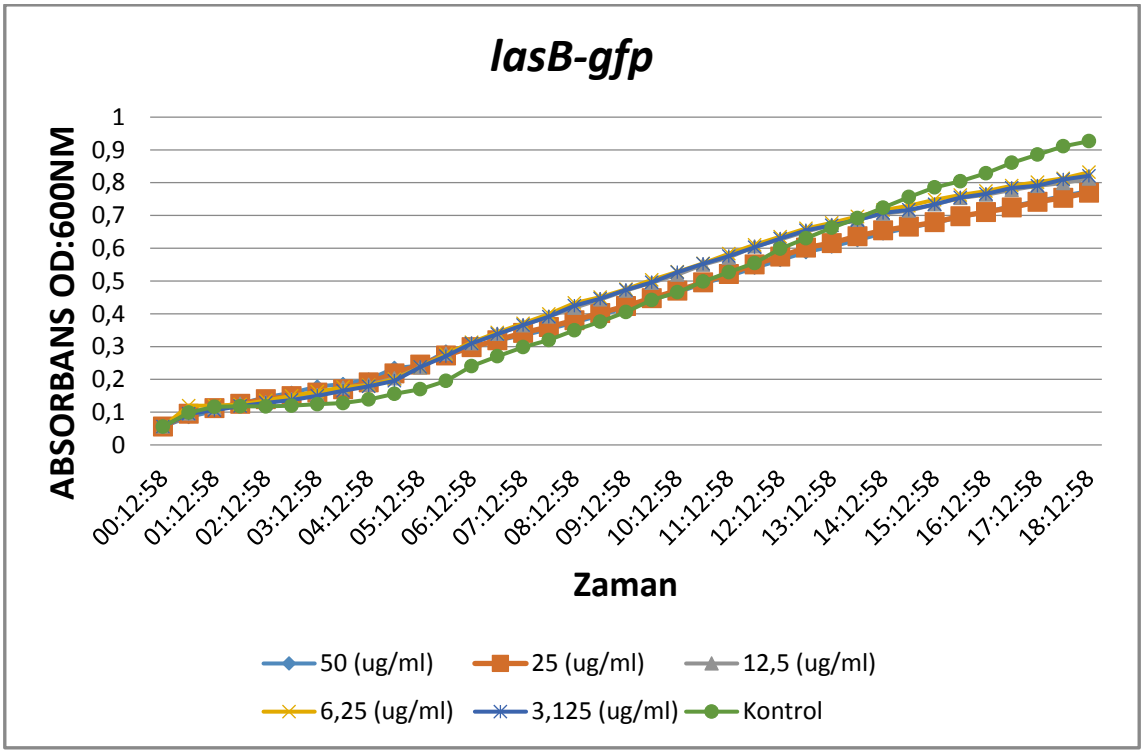
Zamana bağlı büyüme eğrileri değerlendirildiğinde, *H. tubulosa* aseton özütünün 50 µg/ml'lik dozunun *P. aeruginosa* PAO1'in büyümesini %30 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Test edilen diğer dozların bakteri büyümesini önemli oranlarda inhibe etmediği görülmüş ve bu dozlar biyofilm ve swarming-motility testlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.1.1.3. *P.glauca* aseton özütünün *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerindeki etkileri

P. glauca aseton özütünün 3,125 µg /ml - 50 µg/ml arasında değişen dozları ile muamele edilen *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrisi grafikleri aşağıda verilmiştir.

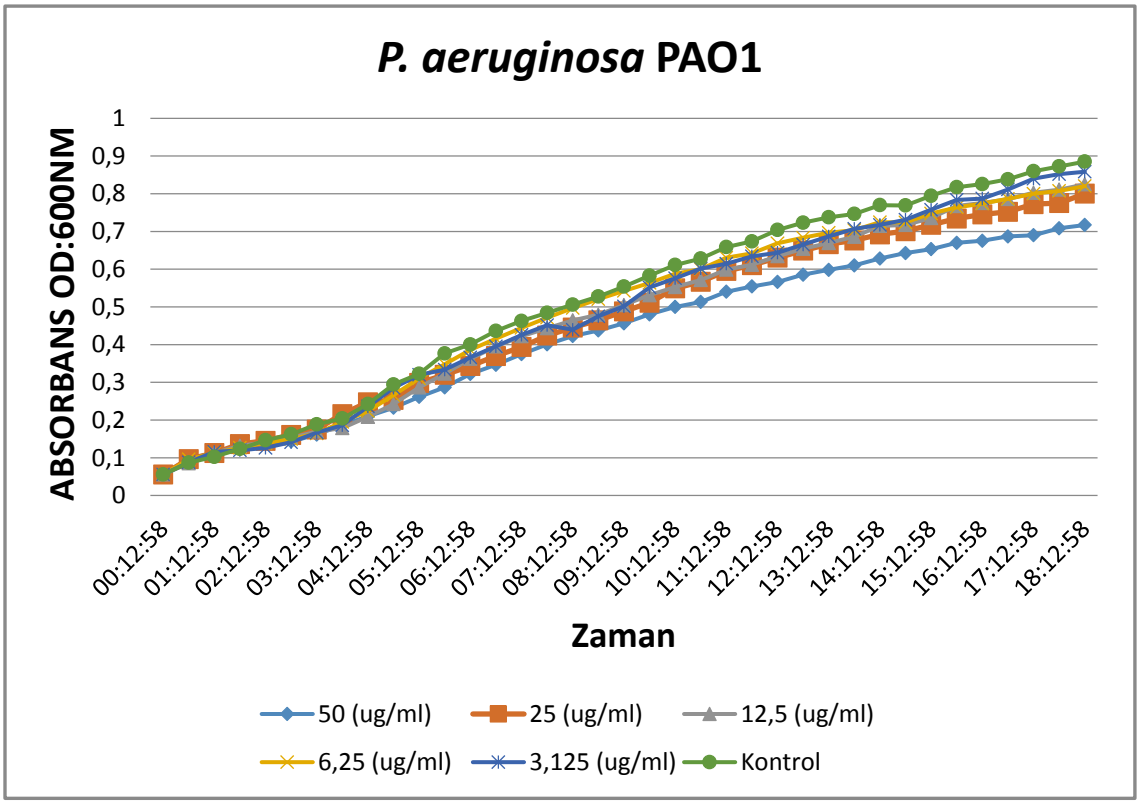


Şekil 3.7. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği. Kontrol grubuna *P. glauca* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.



Şekil 3.8. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği. Kontrol grubuna *P. glauca* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.

Zamana bağlı büyüme eğrileri değerlendirildiğinde, *P. glauca* aseton özütünün 50 µg/ml'lik dozu dışında test edilen diğer dozların *rhlA-gfp* ve *lasB-gfp* suşlarının büyümesini önemli ölçüde inhibe etmediği gözlenmiştir. Büyümeyi inhibe etmeyen dozlar belirlenmiş ve anti-QS testlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.



Şekil 3.9. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun 3,125 - 50 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans grafiği. Kontrol grubuna *P. glauca* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.

Zamana bağlı büyüme eğrileri değerlendirildiğinde, *P. glauca* aseton özütünün 50 µg/ml'lik dozunun yaklaşık %20 oranında bakteri büyümesini inhibe ettiği, bununla birlikte test edilen diğer dozların bakteri büyümesini önemli oranlarda inhibe etmediği görülmüştür. Büyüme üzerine etkisi olmayan dozlar biyofilm ve swarming-motility testlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

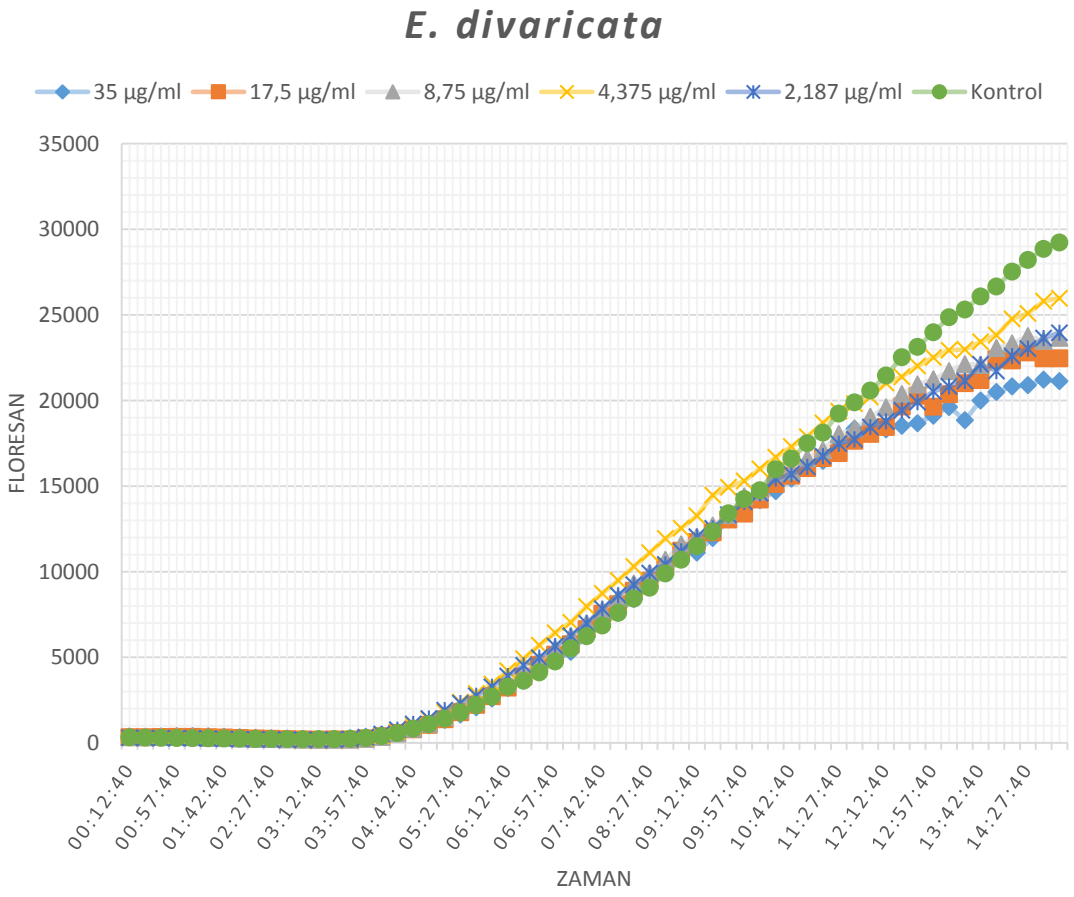
3.1.2. Liken aseton özütleri ile gerçekleştirilen QS inhibisyonu bulguları

Biyosensör suşlar, QS sistemine bağlı olarak GFP sentezlemekte, bu proteinin sentezlenmesi sonucunda da floresan ışıma meydana gelmektedir. Floresan ışıma seviyesi, bakterinin QS mekanizması ile bağlantılı olduğundan floresan ışımanın inhibe edilmesi, *P. aeruginosa rhlA-gfp* ve *lasB-gfp* suşlarının QS mekanizmasının da inhibe edilmesi anlamına gelmektedir. Anti-QS testlerinin gerçekleştirilmesi için *rhlA-gfp* ve *lasB-gfp* biyosensör suşları *E. divaricata* aseton özütünün 2,187 µg/ml - 35 µg/ml, *H.*

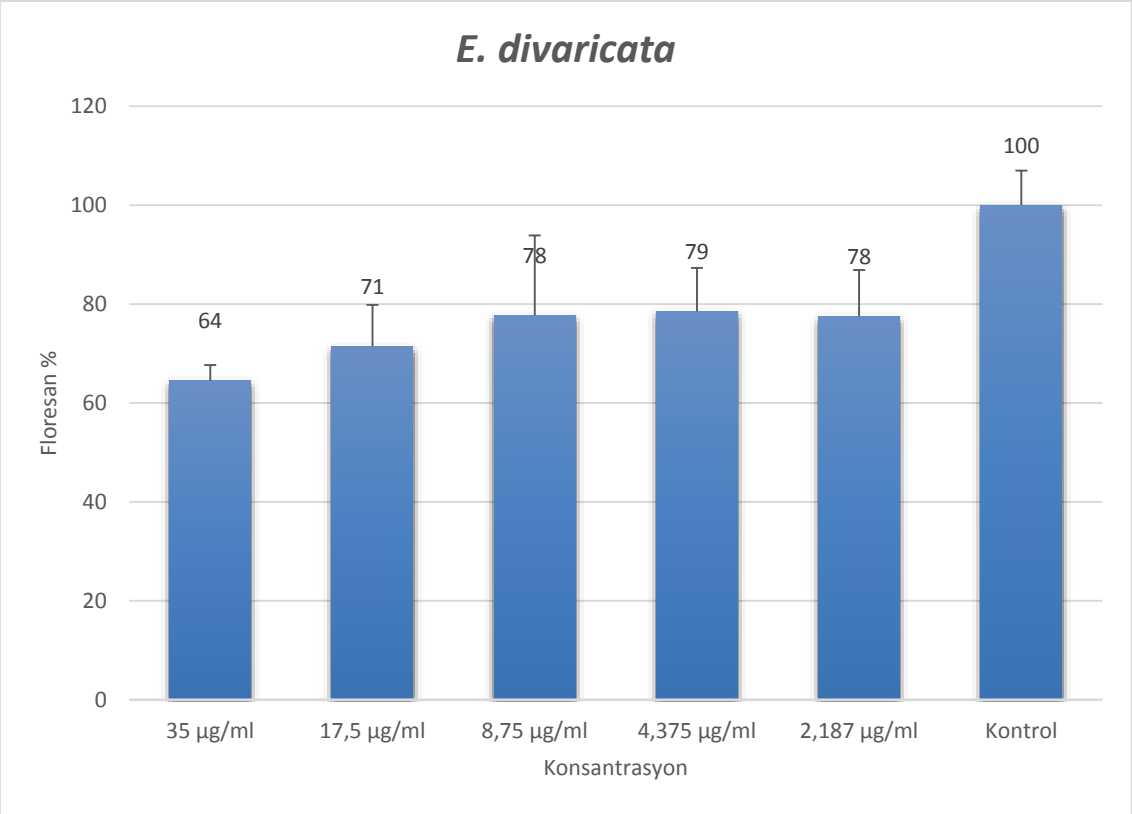
tubulosa ve *P. glauca* aseton özütlerinin 1,562 µg/ml – 25 µg/ml arasındaki dozları ile muamele edilmiştir. Kontrol grubu olarak *P. aeruginosa* üzerinde anti-QS etkinlik gösterdiği bilinen penisillik asitin 1 µg/ml – 16 µg/ml arasındaki dozları kullanılmıştır. Cytation 3 (BioTek) cihazından 485 nm ve 535 nm'de 16 saat boyunca 15 dakikada bir ölçümler alınmıştır. Ölçümler sonucu elde edilen veriler QS inhibisyon grafikleri hazırlanmıştır. Floresan verileri RFU (Relative Fluorescence Unit) cinsinden verilmiştir.

3.1.2.1. *rhlA-gfp* suşunun QS inhibisyon bulguları

Anti-QS testlerinin ölçümleri sonucunda elde edilen veriler ile *E. divaricata, H. tubulosa* ve *P. glauca* aseton özütleri uygulanmış *rhlA-gfp* suşunun floresan miktarlarına ait grafikler hazırlanmış ve inhibisyon oranları belirlenmiştir.

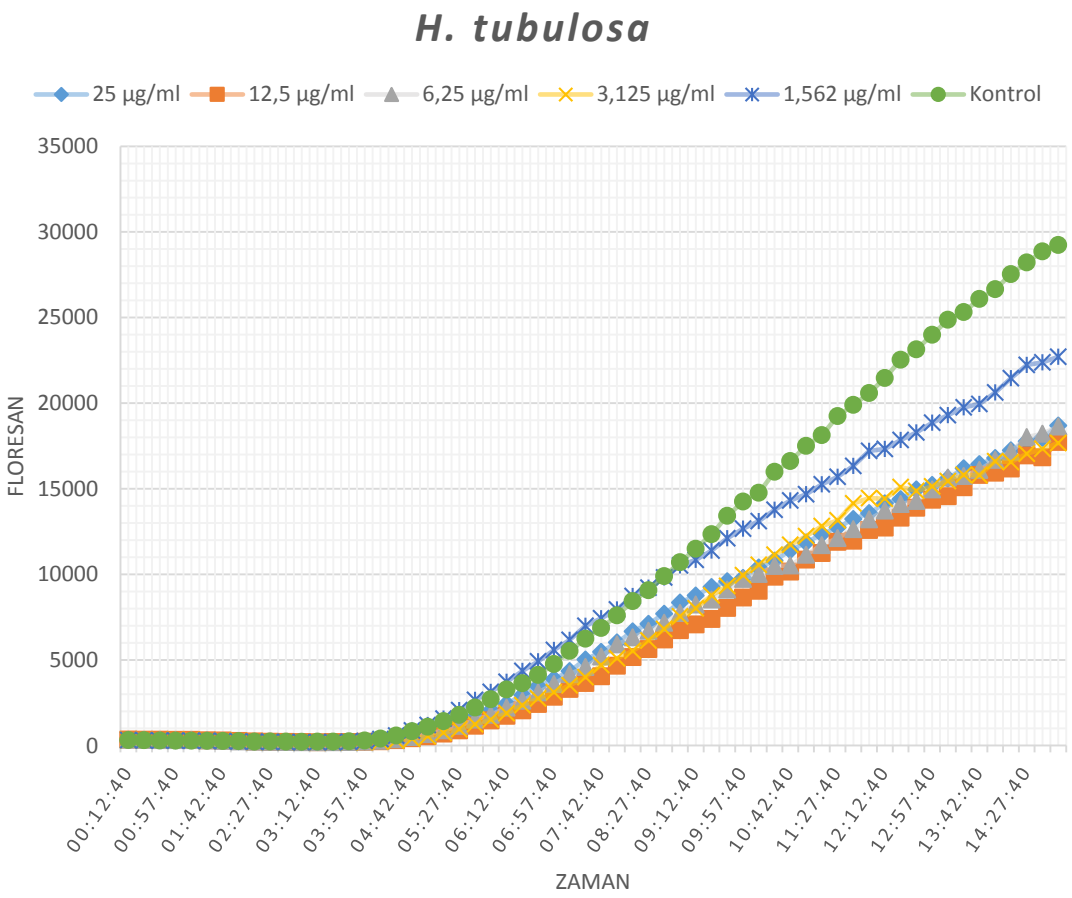


Şekil 3.10. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 2,187 – 35 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği. Kontrol grubuna *E. divaricata* aseton özütü uygulanmamıştır.

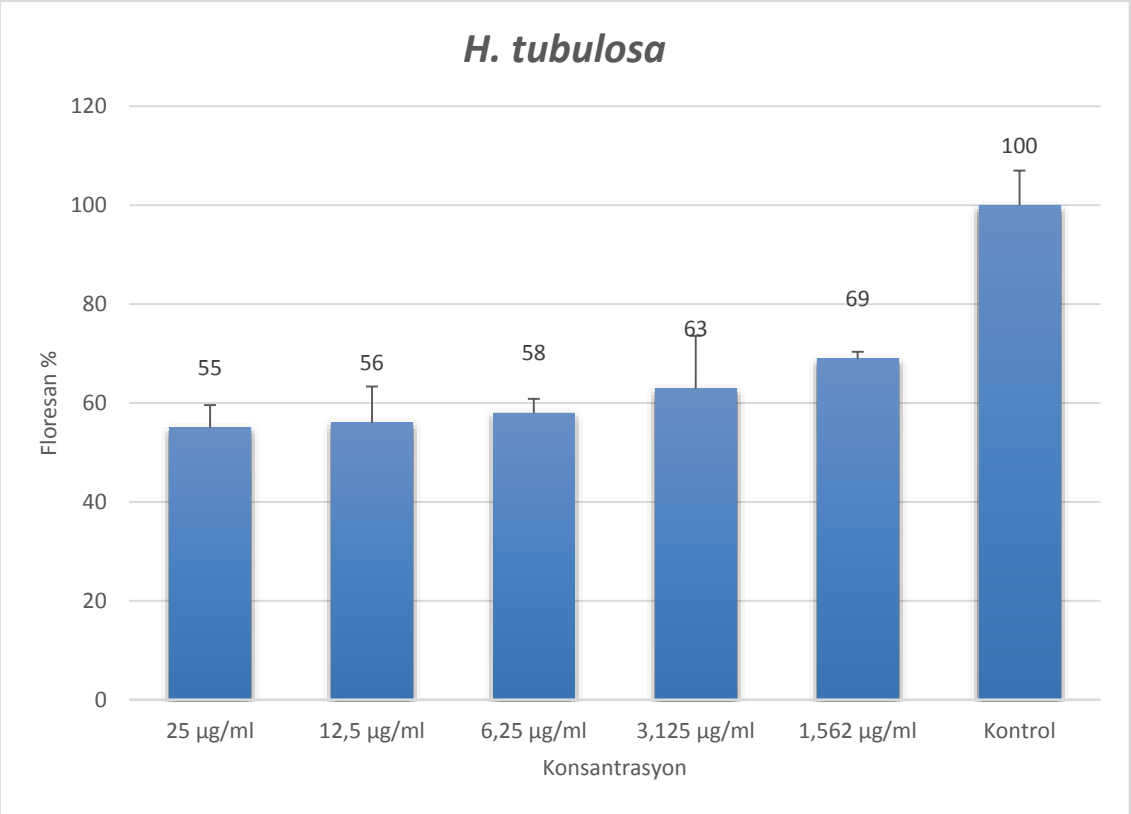


Şekil 3.11. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 2,187 – 35 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % grafiği. Kontrol grubuna *E. divaricata* aseton özütü uygulanmamıştır.

Floresan miktarlarının ölçümleri sonucunda *E. divaricata* aseton özütünün *rhlA-gfp* suşunun floresan miktarlarında azalmalar meydana getirdiği, buna bağlı olarak da QS sistemini belirli oranlarda inhibe ettiği görülmüştür. 35 µg/ml, 17,5 µg/ml, 8,75 µg/ml, 4,375 µg/ml ve 2,187 µg/ml'lik konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü kontrol grubuna göre floresan miktarını sırası ile %36, %29, %22, %21 ve %22 oranında inhibe etmiştir.

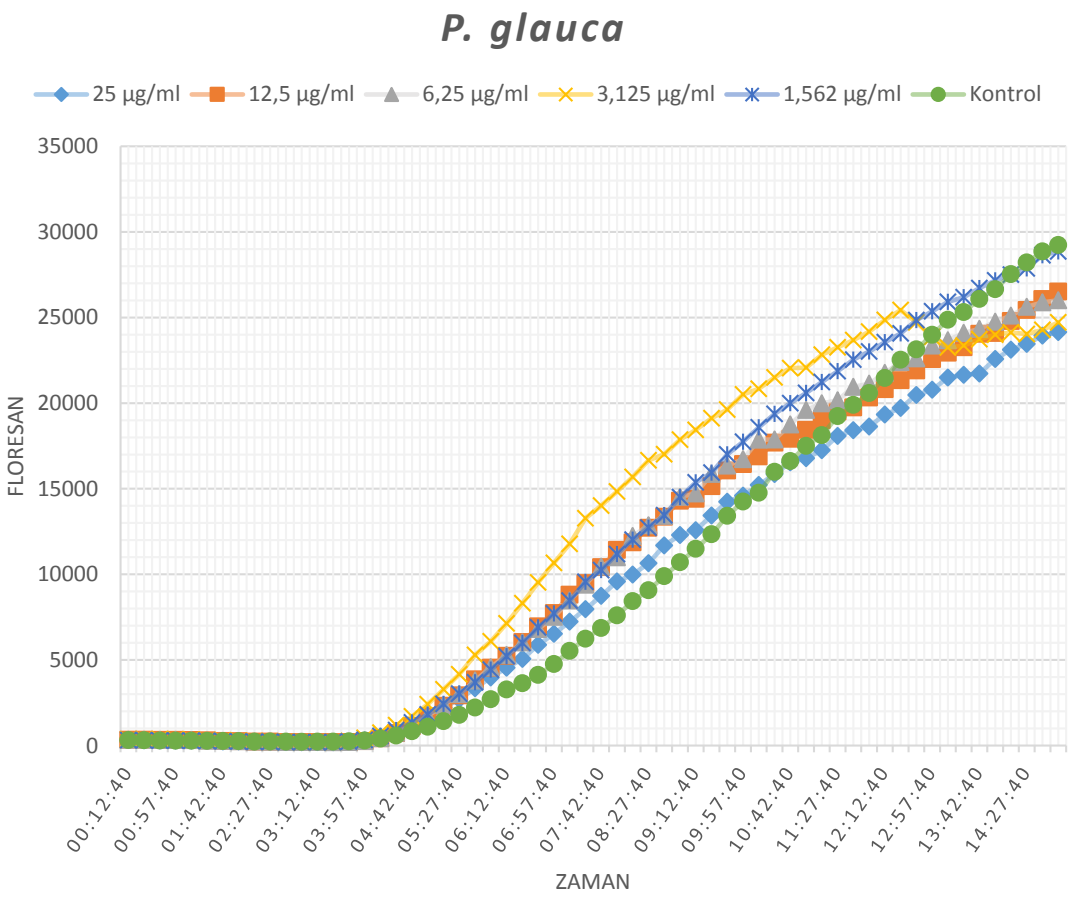


Şekil 3.12. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 1,562 – 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği. Kontrol grubuna *H. tubulosa* aseton özütü uygulanmamıştır.

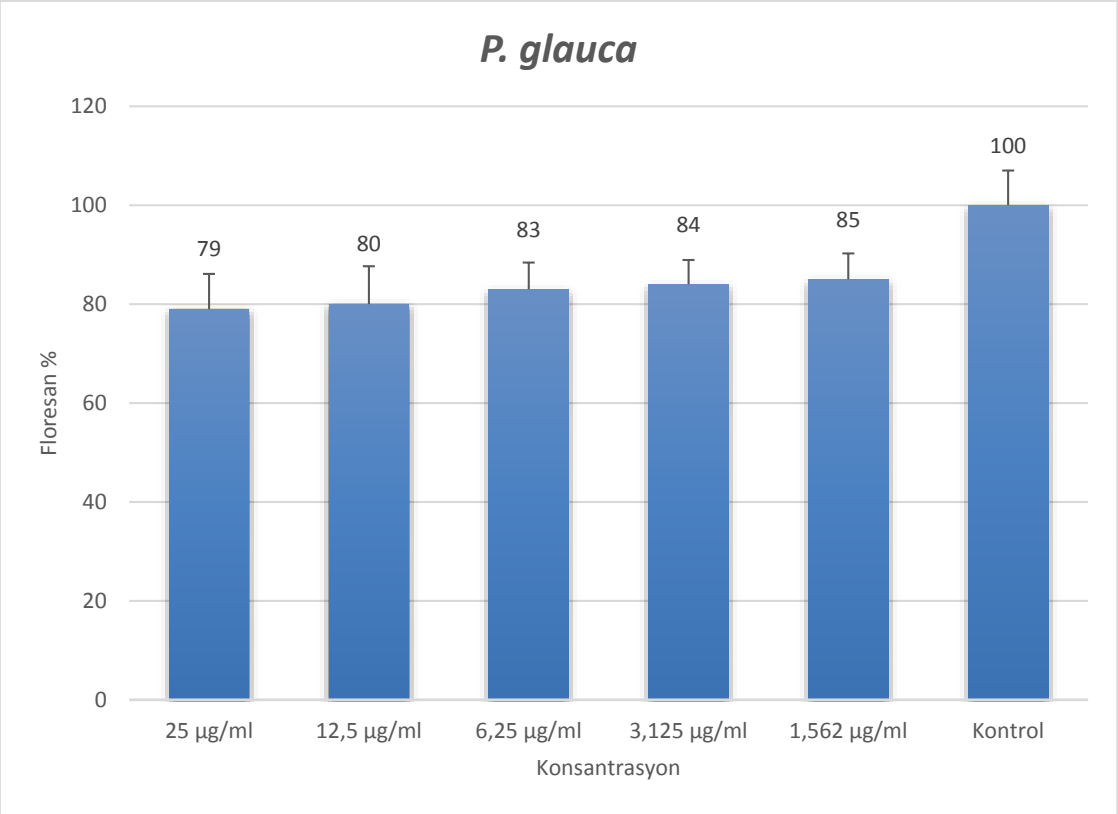


Şekil 3.13. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 1,562 – 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % grafiği. Kontrol grubuna *H. tubulosa* aseton özütü uygulanmamıştır.

Ölçümler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, *H. tubulosa* aseton özütlerinin 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml ve 1,562 µg/ml'lık dozlarının kontrol grubuna göre *rhlA-gfp* suşunun floresan miktarını sırasıyla %45, %44, %42, %32 ve %31 oranlarında inhibe ettiği görülmüştür. Floresan miktarlarında meydana gelen azalmalar, bakteri suşunun GFP miktarlarındaki azalmalara bağlı olarak gerçeklemiş, bunun sonucunda QS sisteminin inhibe edildiği tespit edilmiştir.

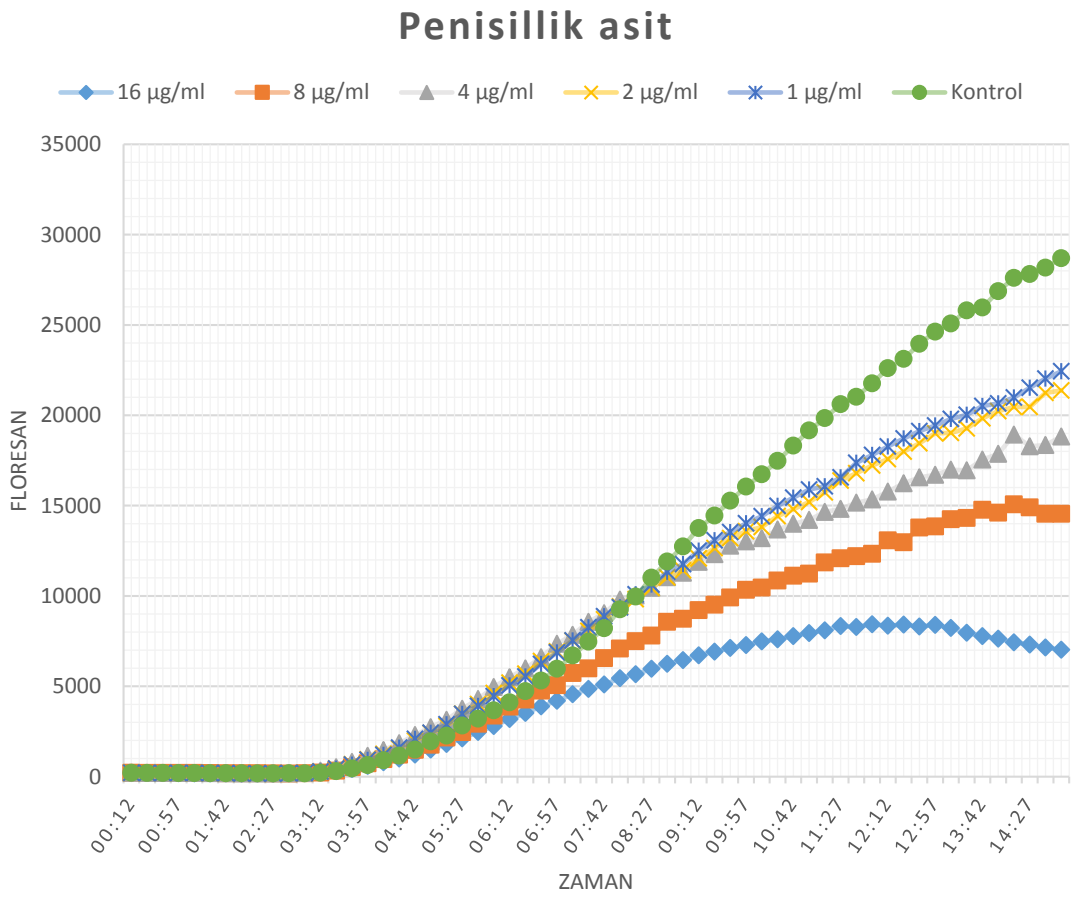


Şekil 3.14. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 1,562 – 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği. Kontrol grubuna *P. glauca* aseton özütü uygulanmamıştır.



Şekil 3.15. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 1,562 – 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % grafiği. Kontrol grubuna *P. glauca* aseton özütü uygulanmamıştır.

Floresan miktarı ölçümleri değerlendirildiğinde, *P. glauca* aseton özütlerinin 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml ve 1,562 µg/ml'lık dozlarının kontrol grubuna göre *rhlA-gfp* suşunun floresan miktarını sırasıyla %21, %20, %17, %16 ve %15 oranlarında inhibe ettiği saptanmıştır. Floresan miktarlarındaki inhibisyonlardan yola çıkarak *P. glauca* aseton özütünün *rhlA-gfp* suşu üzerinde belirli oranlarda anti-QS etkinliği gösterdiği gözlenmiştir.

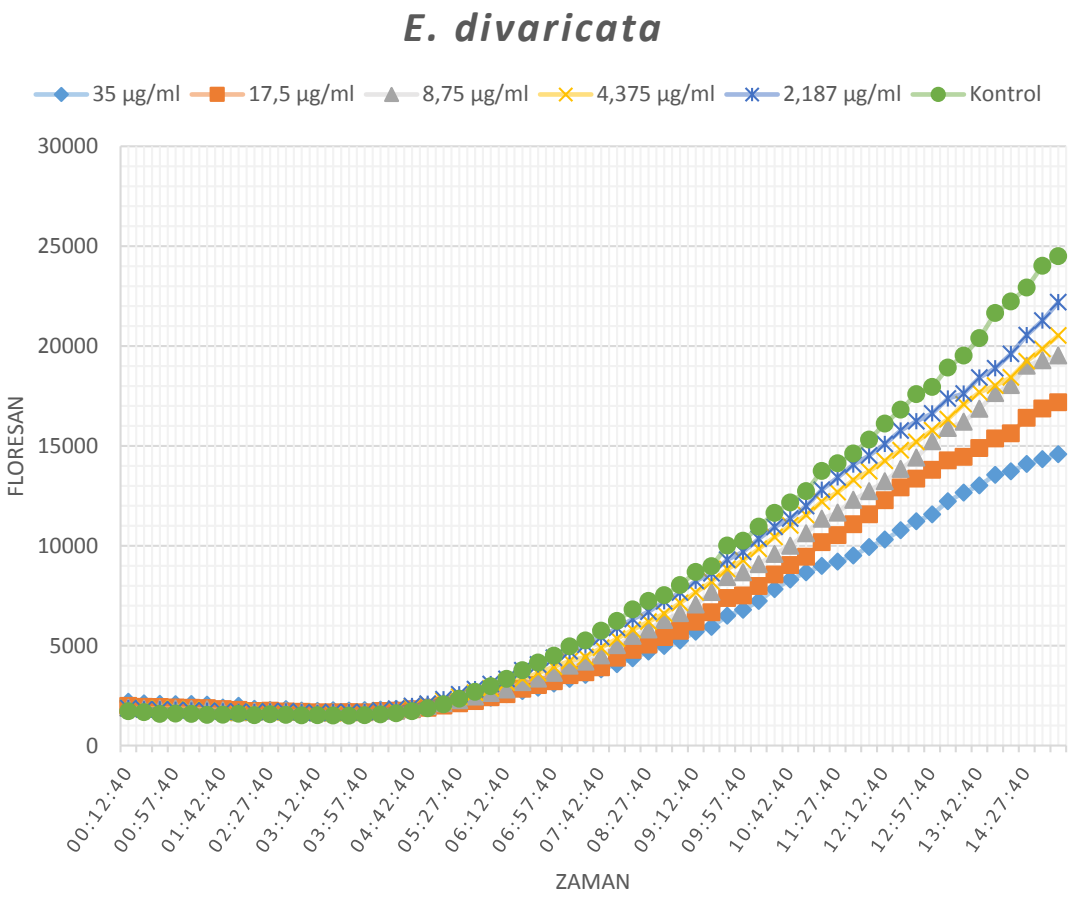


Şekil 3.16. *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun 1 – 16 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda penisillik asit muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği. Kontrol grubuna penisillik asit uygulanmamıştır.

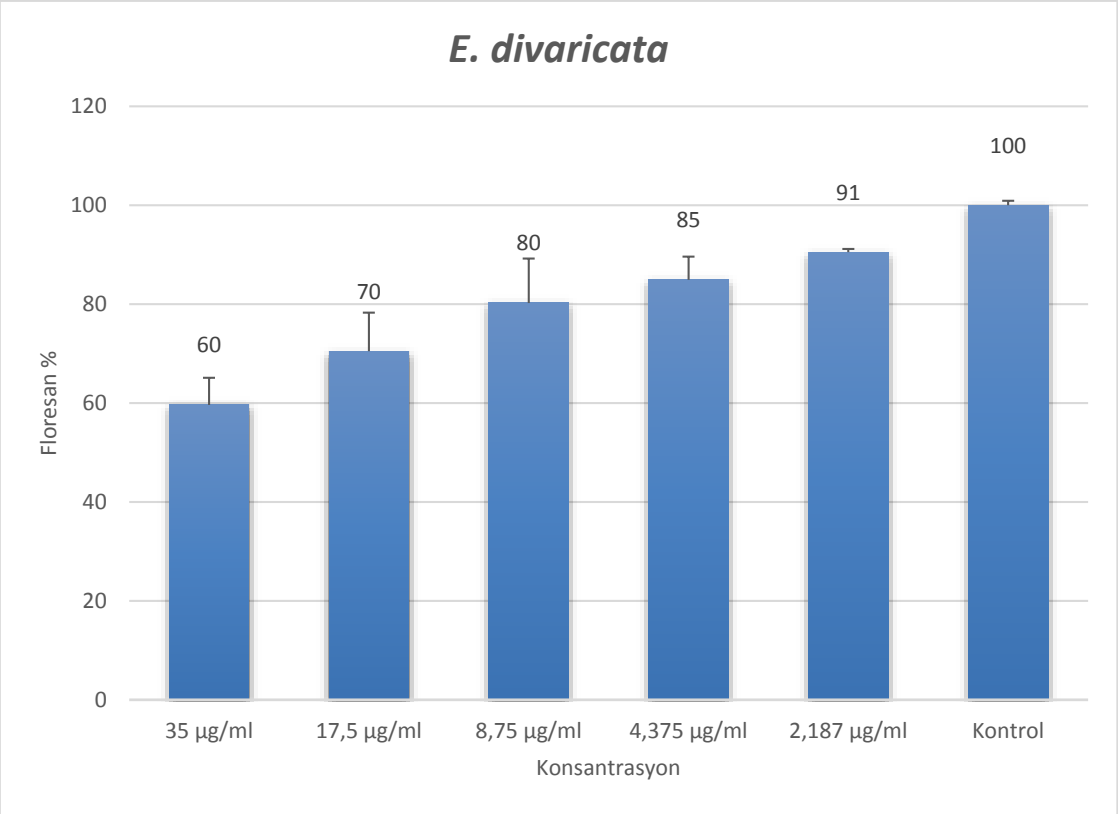
Kontrol grubu olarak kullanılan penisillik asidin en yüksek dozu olan 16 µg/ml'lik konsantrasyonunda *rhlA-gfp* suşunun floresan miktarını yaklaşık olarak %90 oranında inhibe ettiği görülmüştür.

3.1.2.2. *lasB-gfp* suşunun QS inhibisyon bulguları

Anti-QS testlerinin ölçümleri sonucunda elde edilen veriler ile *E. divaricata*, *H. tubulosa* ve *P. glauca* aseton özütleri uygulanmış *rhlA-gfp* suşunun floresan miktarlarına ait grafikler hazırlanmış ve inhibisyon oranları belirlenmiştir.

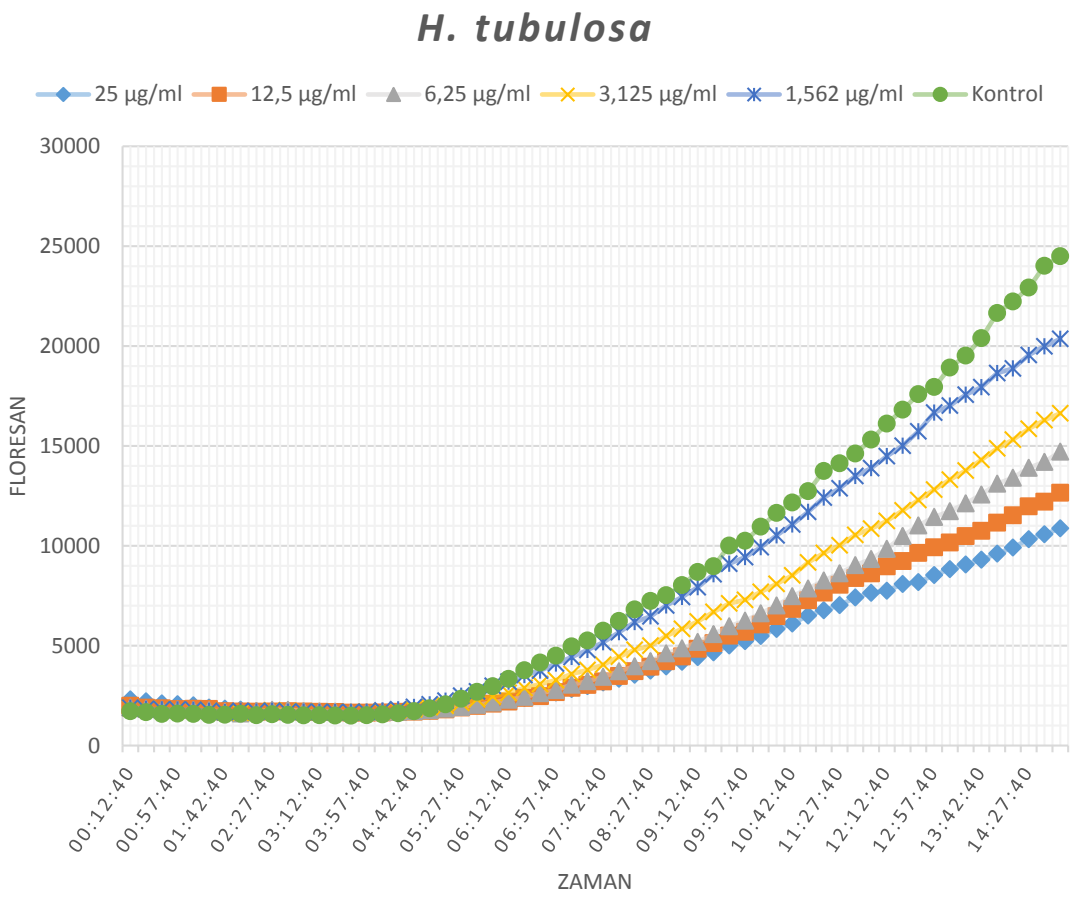


Şekil 3.17. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 2,187 – 35 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği. Kontrol grubuna *E. divaricata* aseton özütü uygulanmamıştır.

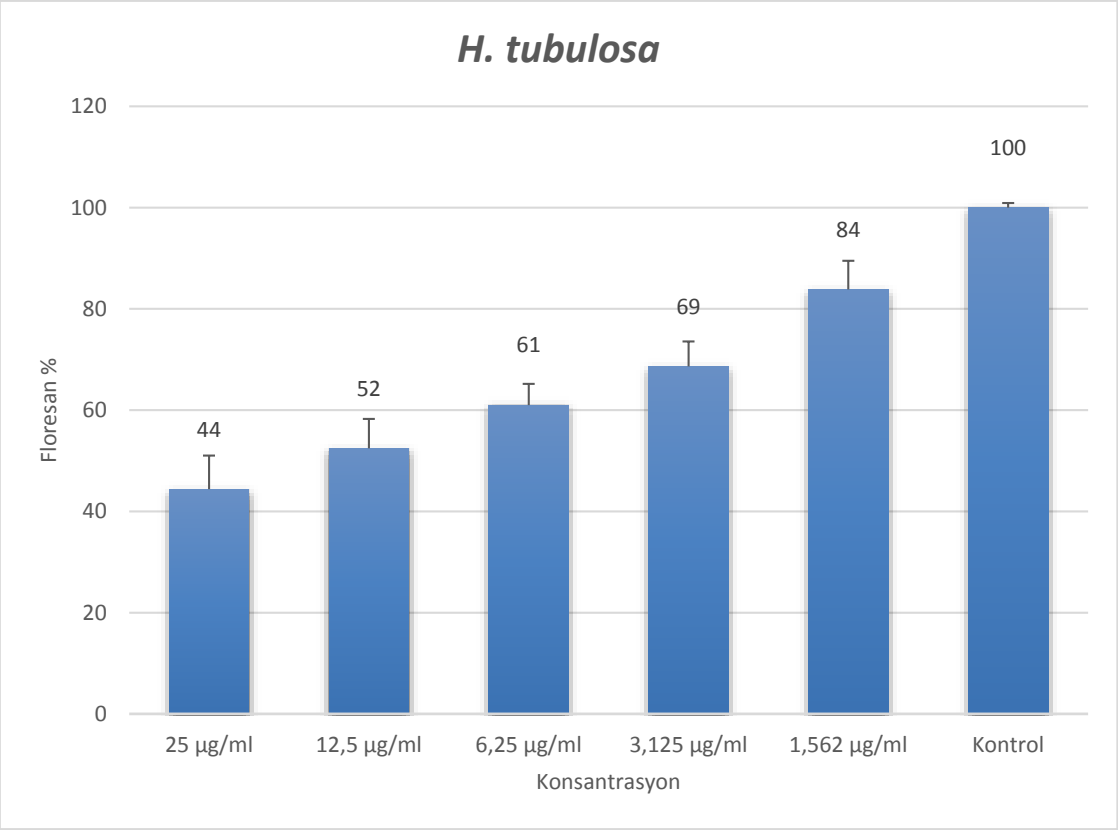


Şekil 3.18. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 2,187 - 35 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % grafiği. Kontrol grubuna *E. divaricata* aseton özütü uygulanmamıştır.

E. divaricata aseton özütünün 35 µg/ml, 17,5 µg/ml , 8,75 µg/ml , 4,375 µg/ml ve 2,187 µg/ml'lik dozlarının *lasB-gfp* suşunun floresan miktarlarını kontrol grubuna göre sırasıyla %40, %30, %20, %15 ve %9 oranlarında inhibe ettiği görülmüştür. *E. divaricata* aseton özütünün ilk dozu *lasB-gfp* suşunun QS mekanizması üzerinde etkinlik gösterirken, seyrelen dozlarla beraber anti-QS etkinliğinde de azalmalar olduğu belirlenmiştir.

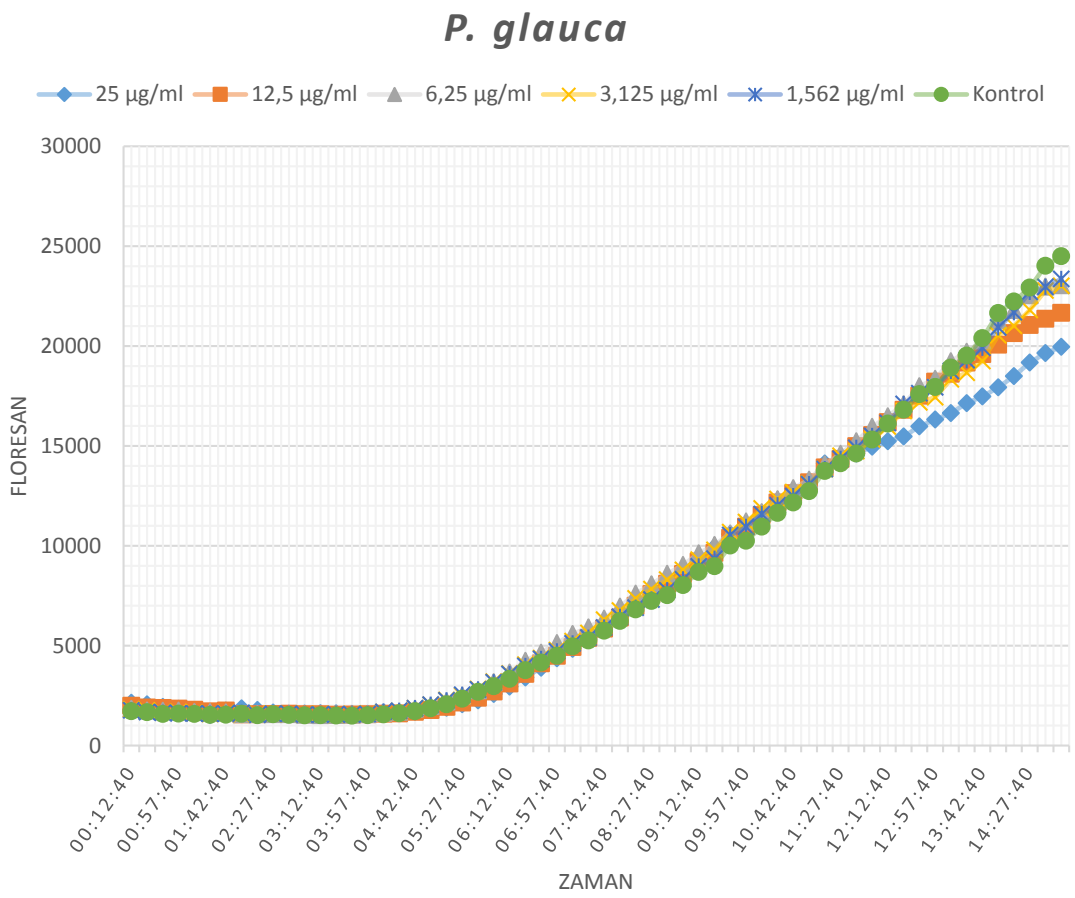


Şekil 3.19. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 1,562 – 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği. Kontrol grubuna *H. tubulosa* aseton özütü uygulanmamıştır.

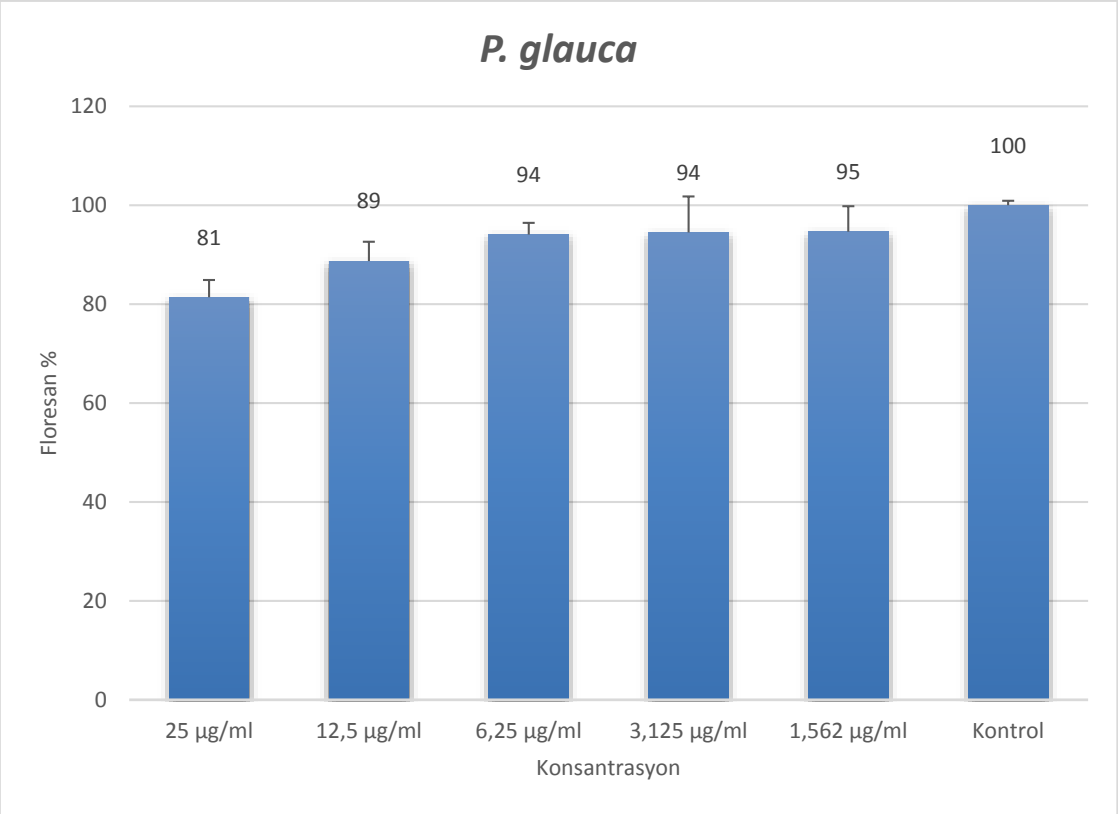


Şekil 3.20. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 1,562 - 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % inhibisyon grafiği. Kontrol grubuna *H. tubulosa* aseton özütü uygulanmamıştır.

H. tubulosa aseton özütünün 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml ve 1,562 µg/ml'lik dozlarının *lasB-gfp* suşunun floresan miktarlarını kontrol grubuna göre sırasıyla %56, %48, %39, %31 ve %16 oranlarında inhibe ettiği görülmüştür. *H. tubulosa* aseton özütünün ilk dozu *lasB-gfp* suşunun QS mekanizmasını yüksek oranda inhibe ettiği, azalan dozlarının da belirli oranlarda anti-QS etkinliğine sahip olduğu belirlenmiştir.

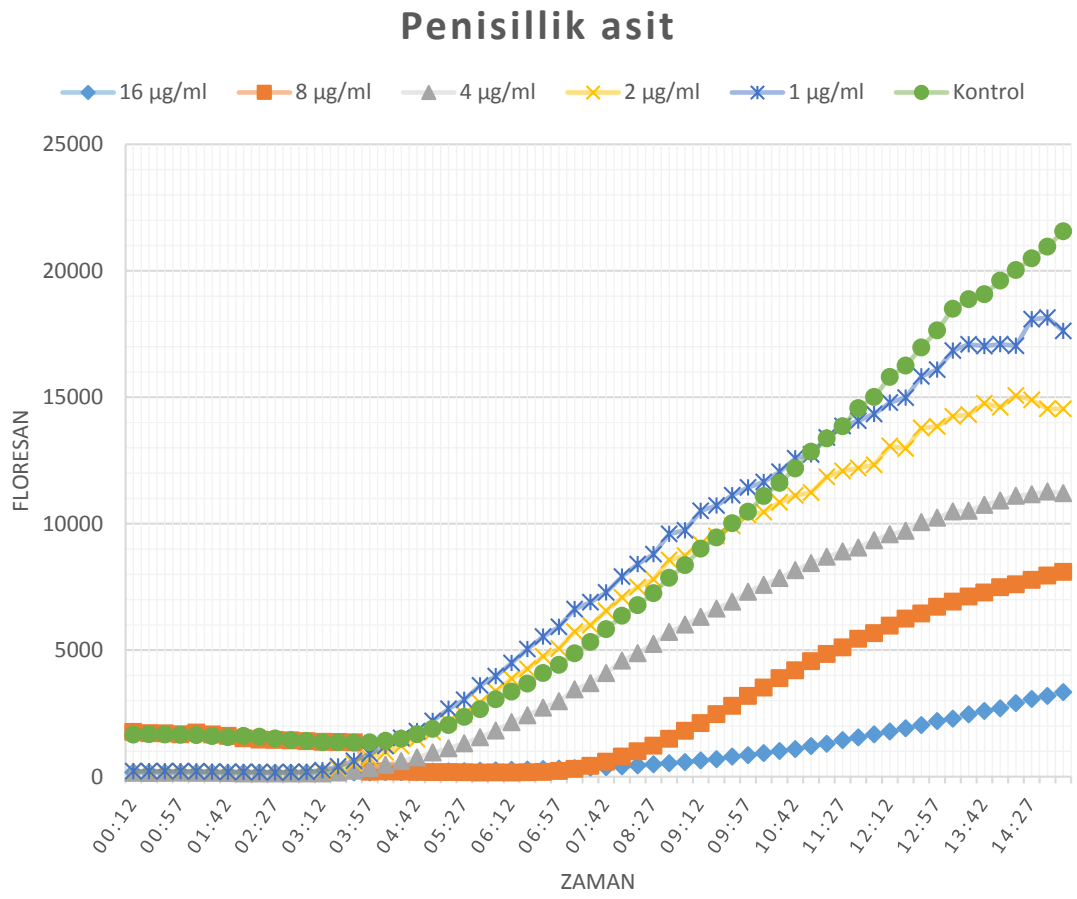


Şekil 3.21. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 1,562 – 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği. Kontrol grubuna *P. glauca* aseton özütü uygulanmamıştır.



Şekil 3.22. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 1,562 - 25 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen floresan % inhibisyon grafiği. Kontrol grubuna *P. glauca* aseton özütü uygulanmamıştır.

P. glauca aseton özütünün 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml ve 3,125 µg/ml'lik dozlarının *lasB-gfp* suşunun floresan miktarlarını kontrol grubuna göre sırasıyla %24, %15, %7 ve %3 oranlarında inhibe ettiği, 1,562 µg/ml'lik dozunun floresan miktarını ise kontrol grubuna göre %2 oranında artırdığı görülmüştür. 1,562 µg/ml konsantrasyonundaki son doz hariç tüm dozlarda belirli oranlarda anti-QS etkinliği saptanmıştır.



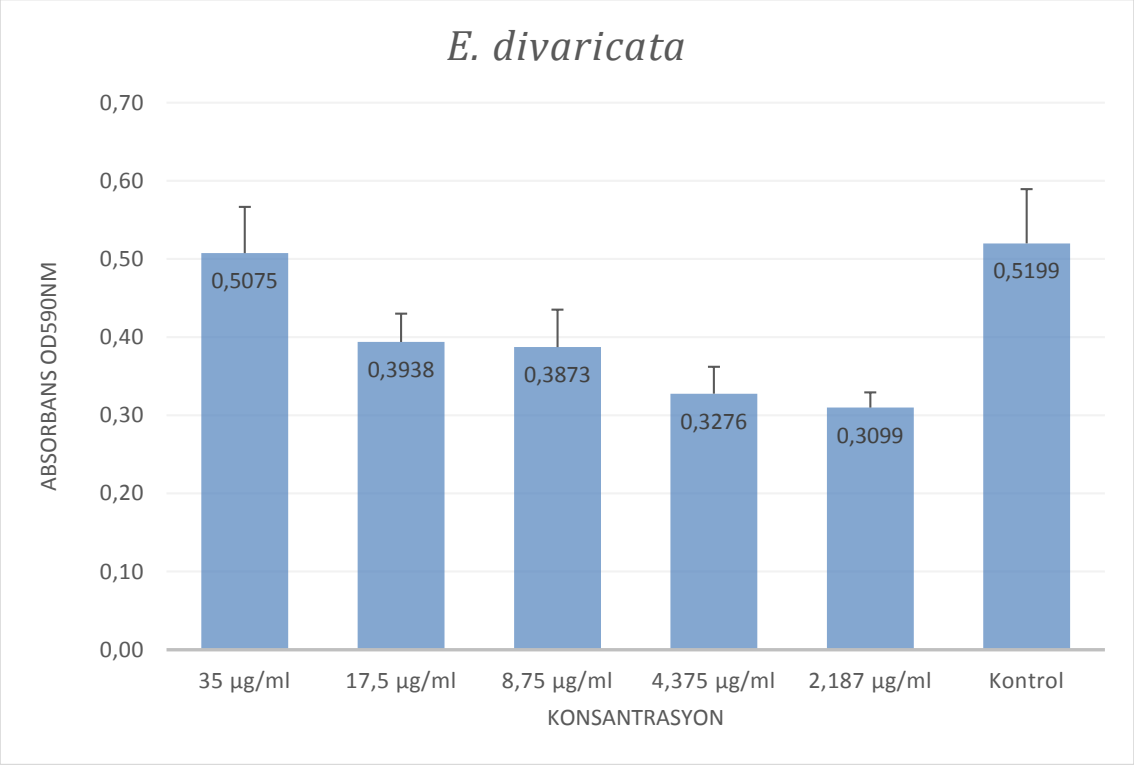
Şekil 3.23. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 1 – 16 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda penisillik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresan inhibisyon grafiği. Kontrol grubuna penisillik asit uygulanmamıştır.

Kontrol grubu olarak kullanılan penisillik asidin en yüksek dozu olan 16 µg/ml'lik konsantrasyonunda *rhlA-gfp* suşunun floresan miktarını yaklaşık olarak %90 oranında inhibe ettiği görülmüştür.

3.1.3. Liken aseton özütleri ile yapılan biyofilm testlerinin bulguları

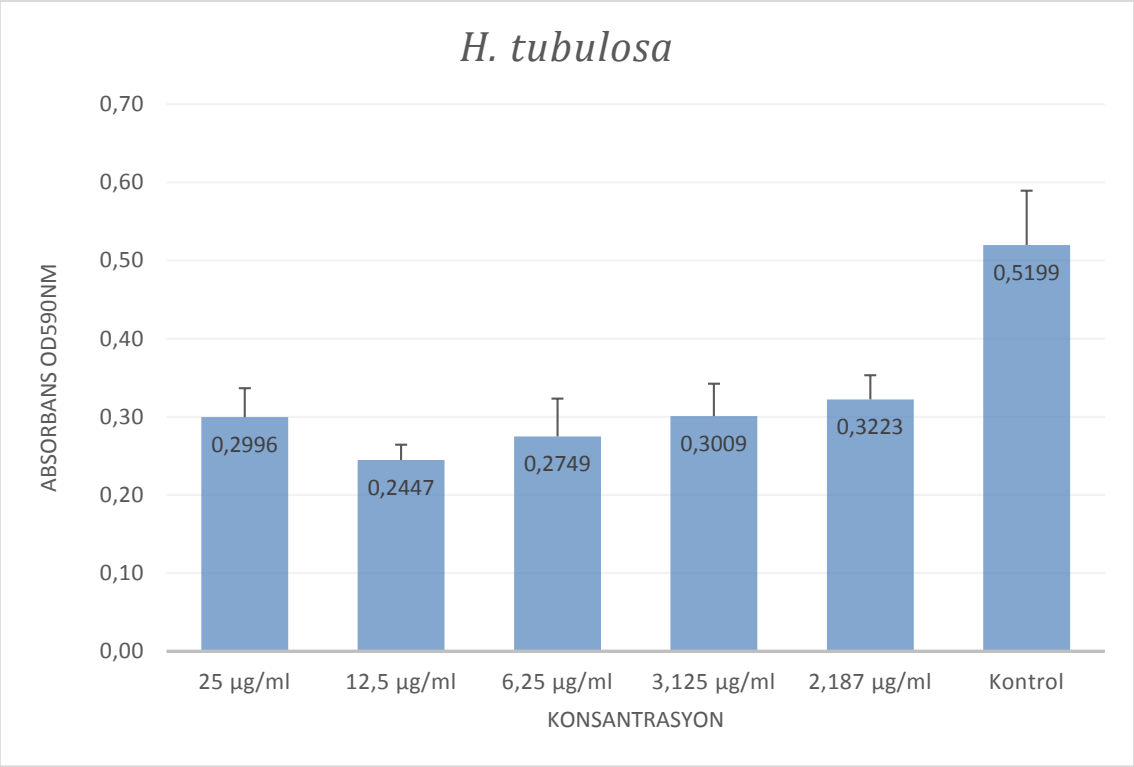
Liken aseton özütlerinin anti-QS testlerinde kullanılan dozları ile *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerinde anti-biyofilm testleri gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından kontrol grupları ile liken aseton özütleriyle muamele edilmiş grupların oluşturduğu biyofilm yapıları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda elde edilen veriler ile biyofilm inhibisyon grafikleri hazırlanmış ve liken aseton

özütlerinin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm formu üzerindeki etkinlikleri incelenmiştir. Testler 5 kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.



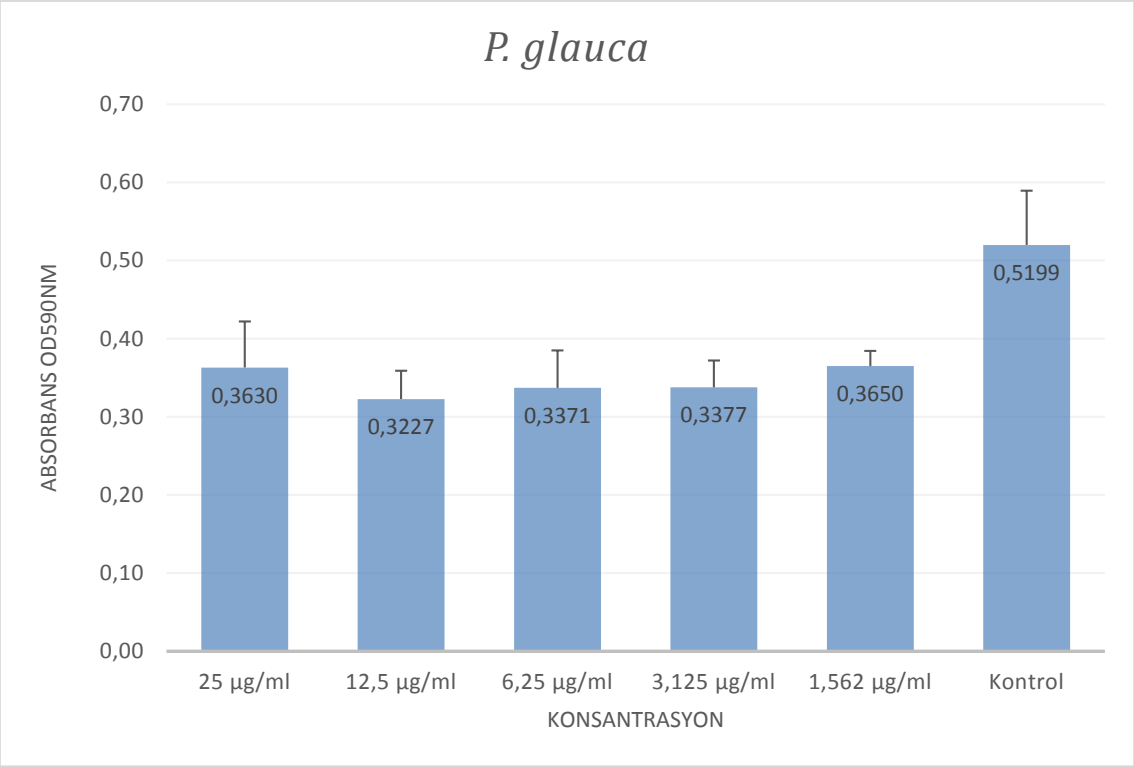
Şekil 3.24. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun *E. divaricata* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590nm) grafiği. Kontrol grubuna *E. divaricata* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, *E. divaricata* aseton özütünün 35 µg/ml konsantrasyonundaki dozunun bakteri biyofilm formu üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Bununla beraber daha düşük konsantrasyonlarla muamele edilen bakterinin biyofilm formunda kontrol grubuna göre belirli oranlarda azalma meydana gelmiştir. *E. divaricata* aseton özütünün kullanılan 17,5 µg/ml, 8,75 µg/ml, 4,375 µg/ml ve 2,187 µg/ml'lik dozları biyofilm formunu sırası ile %24, %25, %36 ve %40 oranlarında inhibe etmiştir. Düşük dozların biyofilm formunu yüksek dozlara göre daha fazla inhibe ettikleri saptanmıştır. Yüksek dozların bakteriyi strese sokarak biyofilm formu oluşturmasını teşvik ettiği düşünülmektedir.



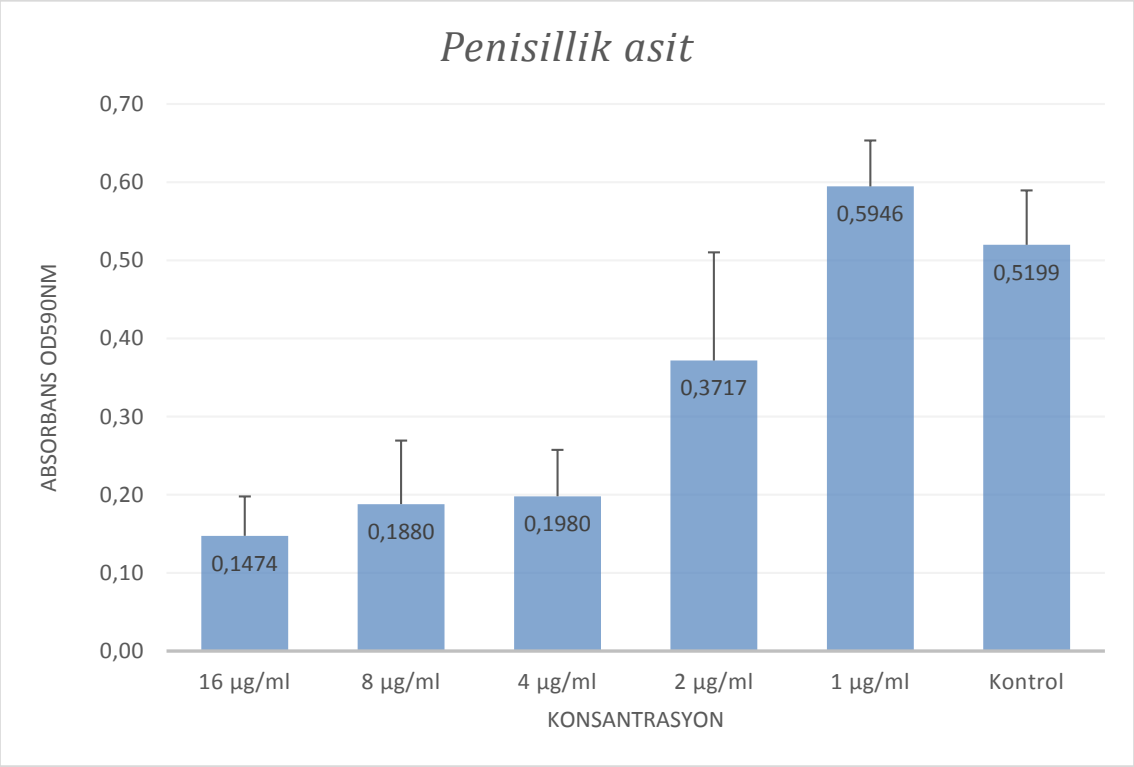
Şekil 3.25. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun *H. tubulosa* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590nm) grafiği. Kontrol grubuna *H. tubulosa* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, *H. tubulosa* aseton özütünün test edilen tüm dozlarının biyofilm formunu inhibe ettikleri görülmüştür. Ancak en yüksek doz olan 35 µg/ml'lik dozun, test edilen diğer düşük dozlara göre daha az anti-biyofilm etkinliği gösterdiği saptanmıştır. 25 µg/ml'lik doz kontrol grubuna göre biyofilm formunu %42 oranında inhibe ederken, test edilen 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml ve 1,562 µg/ml'lik dozlar biyofilm formunu sırasıyla %55, %52, %47 ve %38 oranlarında inhibe etmiştir.



Şekil 3.26. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun *P. glauca* aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590nm) grafiği. Kontrol grubuna *P. glauca* aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, *P. glauca* aseton özütünün test edilen tüm dozlarında biyofilm inhibisyonunun gerçekleştiği gözlenmiştir. En yüksek doz olan 25 µg/ml'lik doz, kontrol grubuna göre biyofilm formunu %30 oranında inhibe etmiştir. Bununla birlikte, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml ve 3,125 µg/ml'lik dozlar biyofilm formunu kontrol grubuna göre sırasıyla %37, %35 ve %34 oranlarında inhibe ederek, uygulanan en yüksek dozdan daha fazla anti-biyofilm etkinliği göstermiştir. En düşük doz olan 1,562 µg/ml'lik doz ise, kontrol grubuna göre biyofilm formunu %29 oranında inhibe ederek en yüksek doz ile eş değer bir anti-biyofilm etkinliği göstermiştir.



Şekil 3.27. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun penisillik asit ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD:590 nm) grafiği. Kontrol grubuna penisillik asit aseton özütü uygulaması yapılmamıştır.

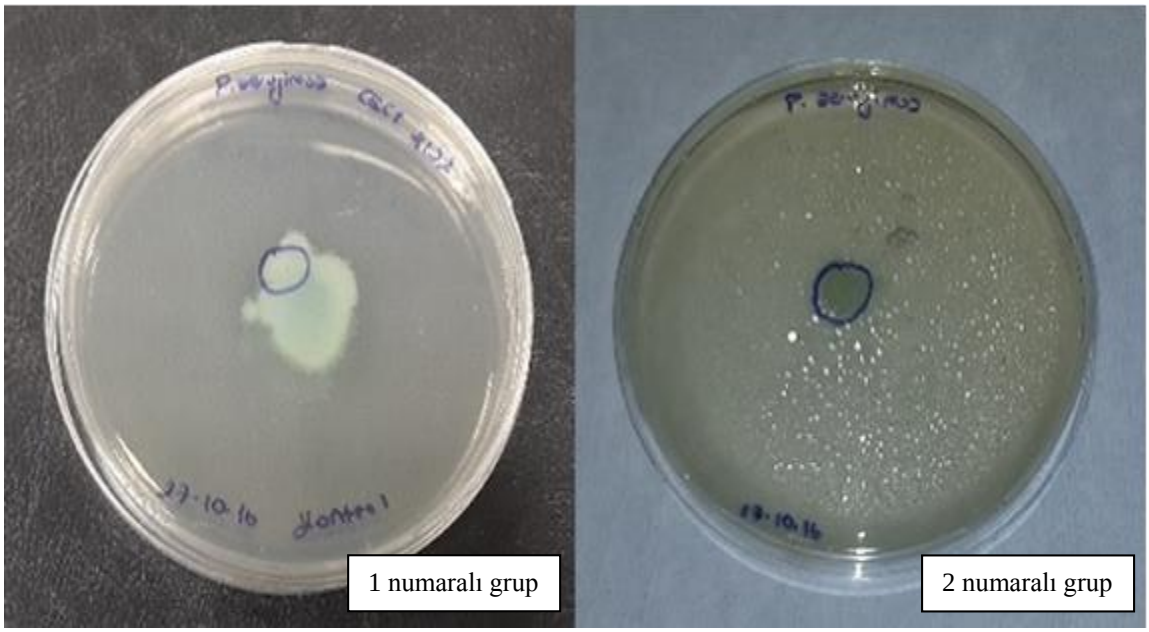
Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, penisillik asidin uygulanan son dozu hariç tüm dozlarında biyofilm formunu inhibe ettiği gözlenmiştir. 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml ve 2 µg/ml'lik dozlar kontrol grubuna göre biyofilm formunu sırasıyla %75, %68, %%66 ve %37 oranlarında inhibe etmiştir. Uygulanan en düşük doz olan 1 µg/ml'lik doz ise bakterinin biyofilm oluşumunu kontrol grubuna göre artırmıştır.

3.1.4. Liken aseton özütleri ile gerçekleştirilen swarming-motility (yayılım-motilite) testlerinin bulguları

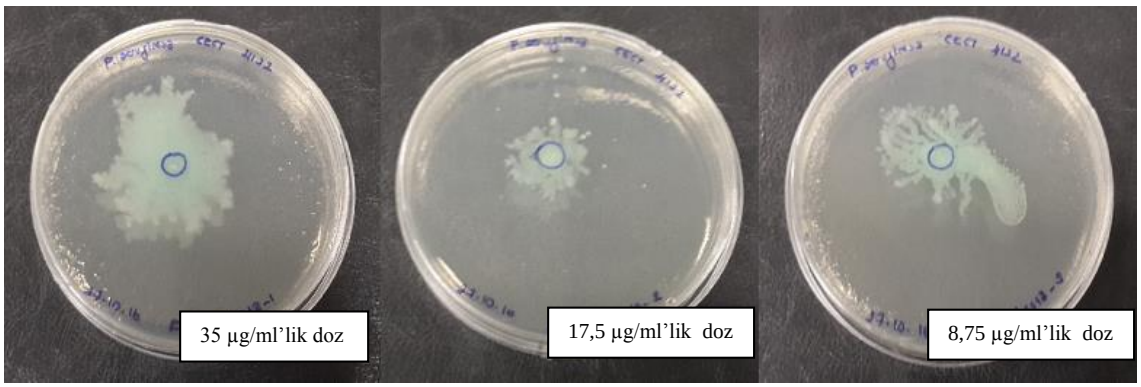
Liken aseton özütlerinin anti-QS ve anti-biyofilm testlerinde kullanılan ilk 3 dozu ile swarming-motility testleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak penisillik asit ve herhangi bir inhibitor madde eklenmemiş soft agar kullanılmıştır. 16 saatlik inkübasyonun ardından petrilerin fotoğrafları çekilmiş ve bakterinin soft agar üzerindeki

yayılımları gözlenerek swarming-motility üzerinde etkinlik gösteren liken türleri belirlenmiştir. Deney sonuçlarına ait resimler aşağıda verilmiştir.

3.1.4.1. *E. divaricata* aseton özütü ile gerçekleştirilen swarming-motility testlerinin bulguları



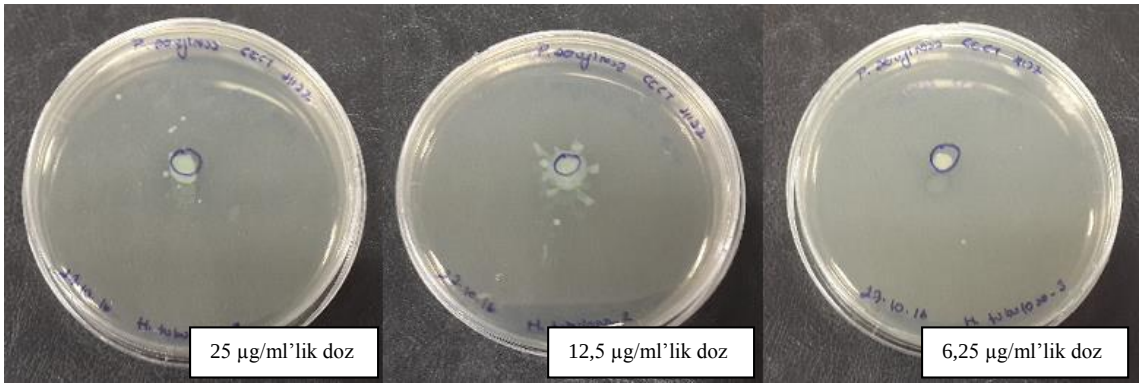
Şekil 3.28. Swarming-motility testlerinde kullanılan kontrol grupları. 1 numaralı grupta sadece soft agar kullanılmıştır. 2 numaralı grupta soft agar penisillik asit ile muamele edilmiştir.



Şekil 3.29. *E. divaricata* aseton özütünün 3 farklı konsantrasyonu ile muamele edilmiş *P. aeruginosa* bakterisinin petri üzerindeki yayılımları.

E. divaricata aseton özütü ile muamele edilmiş *P. aeruginosa*'nın yayılımları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında *E. divaricata* aseton özütünün uygulanan tüm dozlarının bakteri yayılımını artırdığı gözlenmiştir. Özellikle uygulanan 35 µg/ml'lik dozun 17,5 ve 8,75 µg/ml'lik dozlara göre bakteri yayılımını büyük oranda artırdığı tespit edilmiştir.

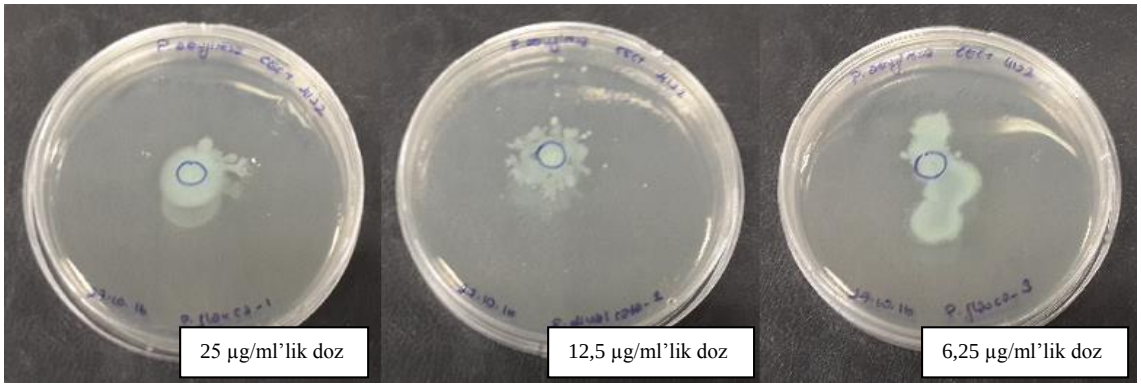
3.1.4.2. *H. tubulosa* aseton özütü ile gerçekleştirilen swarming-motility testlerinin bulguları



Şekil 3.30. *H. tubulosa* aseton özütünün 3 farklı konsantrasyonu ile muamele edilmiş *P. aeruginosa* bakterisinin petri üzerindeki yayılımları.

H. tubulosa aseton özütü ile muamele edilmiş bakteri yayılımları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında *H. tubulosa* aseton özütünün uygulanan tüm dozlarının *P. aeruginosa* yayılımını inhibe ettiği tespit edilmiştir. 12,5 µg/ml'lik dozun kullanılan 25 ve 6,25 µg/ml'lik dozlara göre bakteri yayılımın daha düşük oranlarda inhibe ettiği belirlenmiştir. 25 ve 6,25 µg/ml'lik dozların bakteri yayılımını neredeyse tamamen inhibe ettiği ve bakterinin inoküle edilen noktada sabit bir şekilde çoğaldığı görülmüştür.

3.1.4.3. *P. glauca* aseton özütü ile gerçekleştirilen swarming-motility testlerinin bulguları



Şekil 3.31. *P. glauca* aseton özütünün 3 farklı konsantrasyonu ile muamele edilmiş *P. aeruginosa* bakterisinin petri üzerindeki yayılımları.

P. glauca aseton özütü ile muamele edilmiş bakteri yayılımları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında *P. glauca* aseton özütünün uygulanan dozlarından herhangi birinin *P. aeruginosa* yayılımı üzerinde inhibe edici etkisi olmadığı görülmüştür. Uygulanan 25 µg/ml ve 12,5 µg/ml'lik dozlar ile muamele edilmiş bakterinin, kontrol grubundaki bakteri ile benzer bir yayılım gösterdiği, 6,25 µg/ml'lik doz ile muamele edilmiş bakterinin ise kontrol grubuna göre yayılımının arttığı tespit edilmiştir.

3.2. Tartışma

Bakterilerin geliştirdiği antibiyotik direnci sebebiyle özellikle son yıllarda bakteri kaynaklı enfeksiyonlarla mücadelede sorunlar yaşanmaktadır. CDC, Amerika'da her yıl 2 milyondan fazla insanın bakteri kaynaklı enfeksiyonlara yakalandığını ve antibiyotik direncine bağlı olarak ölümle sonuçlanan 23000 vakanın meydana geldiğini bildirmektedir [3]. Antibiyotik direncinin yanı sıra bakterilerin biyofilm formu meydana getirmeleri sonucunda da antibiyotikler yetersiz kalmakta ve kronik enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır. Bakterilerde meydana gelen antibiyotik direnci ve biyofilm formunun meydana gelmesinde QS mekanizmasının rol oynadığı literatürde yer alan çalışmalarda belirtilmektedir [58, 59]. Bakterilerin kimyasal sinyal molekülleri aracılığıyla gerçekleştirdikleri QS mekanizmasının bloke edilmesi ile biyofilm oluşumu ve antibiyotik direncinin de önüne geçilebileceği düşünülmektedir [60, 61]. Literatürde yer alan çalışmalarda bitkiler ve mantarlardan elde edilen özütlerin ve bazı metabolitlerin

bakterilerin QS mekanizmasını inhibe ettikleri belirtilmektedir [62]. Doğada bulunan moleküller ve bileşenler arasında QS inhibitörleri olarak kullanım potansiyelerinin araştırılması gereken pek çok fitokimyasal bulunmaktadır. QS inhibitörleri olmaya aday bu fitokimyasallar arasında sahip oldukları sekonder metabolitler ile belirli bakteri türleri üzerinde antimikrobiyal etkinlik gösteren likenler de yer almaktadır. Likenlerin QSI potansiyelleri üzerine yapılan çalışmalar literatürde yeni yeni yer almaya başlamaktadır. Bu sebeple likenlerin QSI potansiyellerinin daha yaygın olarak araştırılması ihtiyacı doğmaktadır.

Bu çalışmada, *Evernia divaricata, Hypogymnia tubulosa* ve *Platismatia glauca* türleri, QS inhibitörleri olarak kullanım potansiyelleri bakımından araştırılmıştır. Aslan ve ark.'larının yaptıkları çalışmada, *E. divaricata* metanol özütünün Gram negatif ve Gram pozitif olmak üzere 35 bakteri suşu üzerinde antibakteriyel etkinliği test edilmiş ve Gram negatif bakterilerin çoğu üzerinde herhangi bir antibakteriyel etkinliğe rastlanmamıştır [79]. Mitrovic ve ark.'larının çalışmasında *P. glauca* liken türüne ait metanol, aseton ve etil asetat özütlerinin *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* ve *B. cereus* türlerini de içeren 12 farklı bakteri suşu üzerinde antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu ancak *P. aeruginosa* üzerindeki etkinliğinin diğer bakteri türlerine göre daha düşük olduğu bulunmuştur [88]. Yılmaz ve ark.'ları yaptıkları çalışma sonucunda çeşitli çözücüler ile elde edilen *H. tubulosa* özütlerinin Gram pozitif ve Gram negatif 10 bakteri suşu üzerinde antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu ancak *P. aeruginosa, Yersinia enterocolitica* ve *Pseudomonas syringae* üzerinde antibakteriyel etkinlik göstermediğini belirlemişlerdir [81]. *P. aeruginosa* üzerinde antibakteriyel etkinliği nadir olarak tespit edilen *E. divaricata, H. tubulosa* ve *P. glauca* liken türlerden elde edilen aseton özütlerinin QS inhibisyonu testleri gerçekleştirilmeden önce bakteri suşlarının büyüme eğrileri üzerindeki etkinlikleri test edilmiş ve *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerinde önemli oranlarda inhibisyon meydana getirmedikleri bulunmuştur. Liken aseton özütlerinin *P. aeruginosa* suşları üzerinde antibakteriyel etkinlik göstermemesi literatürde yer alan çalışmaları da desteklemektedir [79, 81, 88].

Çalışmamızda, *P. aeruginosa* üzerinde antibakteriyel etkinlik göstermeyen bu üç liken türü, bakteriyi öldürmeden QS mekanizmasını bloke edebilecek potansiyel QSI molekülleri olarak test edilmiştir. *P. aeruginosa* sıklıkla QS çalışmalarında model mikroorganizma olarak kullanılan bakteri türlerinden biridir [9]. Liken aseton özütlerinin

QS inhibisyon testlerinde *P. aeruginosa*'nın *rhlA-gfp* ve *lasB-gfp* suşları kullanılmıştır. *rhlA-gfp* ve *lasB-gfp* suşları QS mekanizmasının gerçekleşmesi sonucunda GFP üretmektedir. GFP üretilmesine bağlı olarak bakteri suşları floresan ışıma gerçekleştirmektedir. Floresan ışımalarda elde edilen azalmalar bakteri suşlarının QS mekanizmasının inhibe edildiği anlamına gelmektedir [86, 87]. Bu sebeple çalışmamızda bu suşlar üzerinde QS inhibisyon testleri gerçekleştirilmiştir.

QS inhibisyon testlerinin floresan ölçümleri sonucunda *P. aeruginosa* QS mekanizması üzerinde en fazla etkinliğe *H. tubulosa* aseton özütünün sahip olduğu bulunmuştur. *H. tubulosa* aseton özütü 25 µg/ml'lik dozu *P. aeruginosa* LasIR ve RhlIR QS sistemlerini yaklaşık olarak %45 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Test edilen diğer bir liken türü olan *P. glauca*'ya ait aseton özütünün 25 µg/ml'lik dozu ise LasIR ve RhlIR QS sistemlerini yaklaşık olarak %26 oranında inhibe ederek *H. tubulosa* aseton özütüne kıyasla belirgin bir inhibisyona sebep olmamıştır. *E. divaricata* aseton özütünün 35 µg/ml'lik dozu LasIR ve RhlIR QS sistemleri üzerinde yaklaşık olarak %35 oranında inhibisyon meydana getirmiştir. Liken aseton özütleri içerisindeki sekonder metabolitlerin QS mekanizmasını farklı yollarla inhibe ettiği düşünülmektedir. Bu yollar, sinyal moleküllerinin sentezlenmesinin bloke edilmesi ya da sinyal moleküllerinin algılanmasının engellenmesi olabilir. Bununla birlikte, GFP sentezlenmesi süreci üzerinde de etki göstermiş olabilir. Literatürde, test edilen bu üç liken türüne ait özütlerin QSI potansiyelleri ile ilgili çok az sayıda çalışma yer almaktadır. Sesal ve Gökalsın'ın *E. divaricata* sekonder metabolitlerinden biri olan evernik asitin *P. aeruginosa* QS mekanizması üzerine olan etkisinin incelendiği çalışmasında, evernik asitin 116 µM'lık dozunun *P. aeruginosa*'nın LasIR ve RhlIR QS sistemlerini yaklaşık %50 oranında inhibe ettiği bulunmuştur [89]. Riedel ve ark.'ları liken sekonder metabolitleri ile yaptıkları çalışmada, laktonik liken bileşiklerinin *P. aeruginosa* ve *Burkholderia cenocepacia* bakterileri üzerinde QSI etkisi gösterdiklerini bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada, liken sekonder metabolitlerinden biri olan vulpinik asidin *C. violaceum* bakterisinin QS mekanizması tarafından kontrol edilen mor pigment üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir [90]. Bu sonuçlar liken özütlerinin veya sekonder metabolitlerinin QSI potansiyeline sahip olabileceklerini göstermektedir. Bu konuda net bilgilere ulaşmak için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Jakobsen ve ark.'ları bitkisel kaynaklardan elde edilen moleküllerin *P. aeruginosa rhlA* ve *lasB* suşları üzerindeki QSI potansiyellerini incelemişlerdir [91]. Özellikle yaban turpundan izole edilen iberin molekülünün yüksek QSI potansiyeline sahip olduğunu ve *lasB- gfp* füzyonunu tamamen, *rhlA-fgp* füzyonunu ise %50 oranında inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan liken türlerine ait aseton özütleri *rhlA* ve *lasB* QS sistemlerini tamamen inhibe etmemiştir. Ancak, test edilen tüm liken türleri her iki suşun QS mekanizması üzerinde de belirli oranlarda inhibisyon gerçekleştirmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, likenlerin QSI potansiyeline sahip doğal moleküller arasında yer alabileceği düşünülmektedir.

Liken aseton özütleri ile *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerinde gerçekleştirilen biyofilm testlerinde, 3 türden biyofilm formunu en fazla oranda *H. tubulosa* aseton özütü inhibe etmiştir. *H. tubulosa* aseton özütünün 25 µg/ml'lik dozu biyofilm formunu kontrole göre yaklaşık olarak %42 oranında inhibe etmiştir. Daha düşük olan 12,5 µg/ml (%55) ve 6,125 µg/ml'lik (%52) dozlar biyofilm formunu ilk doza göre daha yüksek oranda inhibe etmişlerdir. *P. glauca* aseton özütünün 25 µg/ml'lik dozu *P. aeruginosa* biyofilm formunu kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %30 oranında inhibe etmiştir. *H.* tubulosa'da olduğu gibi daha düşük dozlar kullanıldığında biyofilm oluşumunda da daha fazla azalma görülmüştür. *E. divaricata* aseton özütünde ise test edilen 35 µg/ml'lik ilk dozun bakterinin biyofilm formu üzerinde herhangi bir etkinliği gözlenmemiştir. Ancak aseton özütünün konsantrasyonu seyreldikçe biyofilm formu üzerindeki etkinliği yine belirli oranlarda artmıştır. Test edilen tüm liken aseton özütlerinin düşük dozlarının yüksek dozlara göre daha fazla anti-biyofilm etkinliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun sebebinin, yüksek dozların bakteriyi strese sokması ve strese giren bakterinin daha fazla oranda biyofilm formu meydana getirmesi olduğu düşünülmektedir. Nithyanand ve ark.'ları yaptıkları bir çalışmada usnik asidin *Streptococcus pyogenes* bakteri suşlarının biyofilm formu üzerindeki etkinliğini incelemişlerdir [78]. Usnik asidin test edilen *S. pyogenes* suşlarının tümü üzerinde anti-biyofilm etkinliği gösterdiğini, ancak usnik asit konsantrasyonu arttıkça biyofilm formunun inhibe oranlarının da düştüğünü rapor etmişlerdir. Elde edilen bu sonuç ile liken aseton özütlerinin ya da sekonder metabolitlerinin yüksek dozlarının bakteriler üzerinde strese sebep olarak biyofilm formu üretmelerini teşvik ettikleri düşünülmektedir.

Literatürde *P. aeruginosa* biyofilm formu üzerine yapılan çeşitli çalışmalar yer almaktadır. Tapia-Rodriguez ve ark.'ları kekiğin etken maddelerinden biri olan karvakrol molekülünün *P. aeruginosa* biyofilm formu üzerindeki etkinliğini inceledikleri çalışmada karvakrolun test edilen 0,9, 1,9, 3,9 ve 7,9 µM'lık dozlarının kontrol grubuna göre biyofilm formunu sırasıyla %34, %47, %57 ve %70 oranında inhibe ettiklerini bildirmişlerdir [92]. Packiavathy ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, zerdeçaldan elde ettikleri kurkuminin *P. aeruginosa* üzerindeki anti-biyofilm etkinliğini incelemişlerdir [93]. Kurkuminin 100 µg/ml'lik dozlarının *P. aeruginosa* biyofilm formunu %89 oranında inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda denediğimiz liken aseton özütlerinden özellikle *H. tubulosa* aseton özütü oldukça düşük 12,5 µg/ml'lik dozda *P. aeruginosa*'nın biyofilm formu üzerinde yüksek oranda (%55) inhibisyon göstermiştir. Literatürde yer alan diğer çalışmalarla da karşılaştırıldığında *H. tubulosa* aseton özütünün potansiyel bir biyofilm inhibitörü olabileceği görülmüştür.

Swarming-motility testlerinin sonuçları değerlendirildiğinde *E. divaricata* aseton özütü ve *P. glauca* aseton özütünün *P. aeruginosa*'nın swarming-motility hareketlerinde herhangi bir etkinliğe sahip olmadıkları görülmüştür. Özellikle *E. divaricata* aseton özütünün *P. aeruginosa* swarming-motility hareketlerini kontrol grubuna göre artırdığı görülmüştür. Bunun nedeninin *E. divaricata* aseton özütünün bakteriyi strese sokması ve daha fazla yayılım gerçekleştirmesini teşvik etmesi olduğu düşünülmektedir. Test edilen diğer bir liken türü olan *H. tubulosa* aseton özütünün 25 ve 6,25 µg/ml'lik dozları bakteri yayılımını neredeyse tamamen durdurarak swarming-motility üzerinde yüksek oranda etkinlik göstermiştir. Liken aseton özütleri ile gerçekleştirilen QS inhibisyon ve anti-biyofilm testleriyle benzer olarak *H. tubulosa* aseton özütü en yüksek etkinliğe sahip özüt olarak bulunmuştur. Uğurlu ve ark.'ları yaptıkları bir çalışmada vanilik asit, kafeik asit, sinnamik asit ve ferulik asitin *P. aeruginosa* swarming-motility yayılımını sırasıyla %67, %64, %54 ve %50 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir [94]. Zhang ve ark.'ları *Rosa rugosa* çayından elde ettikleri polifenol ekstresinin *P. aeruginosa* swarming-motility üzerindeki etkinliğini incelemişler ve swarming-motility yayılımını yaklaşık olarak %78 oranında inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir [64]. Çalışmamızda test edilen liken türlerinden *H. tubulosa* aseton özütü *P. aeruginosa* swarming motility yayılımını yaklaşık olarak %90 oranında inhibe ederek literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırıldığında güçlü bir swarming-motility inhibitörü olabileceği görülmüştür.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar ile literatürde yer alan çalışmalar değerlendirildiğinde *H. tubulosa* aseton özütünün *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde güçlü bir QSI, biyofilm ve swarming-motility inhibitörü olabileceği görülmüştür. *E. divaricata* ve *P. glauca* türlerinden de belirli dozlarından da *P. aeruginosa* QS mekanizması ve biyofilm formu inhibitörleri olarak yararlanılabileceği öngörülmektedir.

Liken türleri kullanılarak QS inhibisyonu ve biyofilm oluşumunu engellemeye yönelik çalışmalar literatürde sınırlı sayıda yer almaktadır. Dünya çapında liken sekonder metabolitleri ile yapılan QS çalışmaları son yıllarda hız kazanmıştır. Ancak, Türkiye'de likenlerin antimikrobiyal etkinliklerine dair birçok çalışma bulunmasına rağmen anti-QS özelliklerini araştıran çalışmalar henüz yapılmamıştır. Bu nedenle çalışmadan elde edilen sonuçları karşılaştırmak için yeterli kaynak bulunmamaktadır. Bu tez çalışması, bu konuda elde edilen ilk verileri literatüre kazandırmış bulunmaktadır. İleride daha detaylı yapılacak benzer çalışmalar ile daha net bilgilere ulaşılabileceği düşünülmektedir.

BÖLÜM 4

4. SONUÇLAR / CONCLUSIONS

Antibiyotiklerin yaygın olarak kullanımları sonucunda bakterilerde antibiyotik direnci meydana gelmekte ve bunun bir sonucu olarak da bakteri kaynaklı enfeksiyonlarla mücadele sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bakteriler biyofilm formu meydana getirerek antimikrobiyal ajanlara ve olumsuz çevre koşullarına karşı daha dayanıklı hale gelmekte ve kronik enfeksiyonlara sebep olmaktadır [5, 6]. Oluşturduğu biyofilm formu nedeniyle özellikle bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde kronik enfeksiyonlara yol açan *P. aeruginosa,* mücadelesinde en çok zorluk yaşanan bakteri türlerinden biridir. *P. aeruginosa* da diğer bakteri türleri gibi antibiyotik direnci ve biyofilm formu oluşturmada QS sistemini kullanmaktadır [27, 28]. Bu sebeple *P. aeruginosa* QS sisteminin bloke edilmesiyle antibiyotik direnci ve biyofilm oluşumun da önüne geçilebilecektir. Literatürde, QSI potansiyeli olan çeşitli fitokimyasallar ve doğal moleküller bulunmaktadır. Bu çalışmada da, sahip oldukları sekonder metabolitler ile antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser gibi biyolojik aktivitelere sahip ve uzun yıllardır tıp ve eczacılık alanında kullanılan likenlerin QSI potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bolu-Aladağlar bölgesinden toplanan *E. divaricata, H. tubulosa* ve *P. glauca* liken türlerinin aseton özütleri elde edilmiş ve bu özütlerin *P. aeruginosa* QS mekanizması ve biyofilm oluşumu üzerindeki etkinlikleri test edilmiştir. QS inhibisyon testleri için floresan ışıma yöntemi kullanılmıştır. QS inhibisyon testlerinden elde edilen bulgular ışığında biyofilm ve swarming-motility testleri gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen testler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde *H. tubulosa* aseton özütünün *P. aeruginosa* QS mekanizması, biyofilm formu ve swarming-motility hareketi üzerinde yüksek oranlarda inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. *E. divaricata* ve *P. glauca* liken türlerine ait aseton özütlerinin de belirli konsantrasyonlarda *P. aeruginosa* üzerinde QSI ve anti-biyofilm etkinliği gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürde liken özütlerinin antimikrobiyal ve antioksidan gibi biyolojik etkinliklerine dair çeşitli çalışmalar yer alsa da QSI potansiyeli üzerine herhangi bir çalışma yer almamaktadır. Bu yönüyle çalışmamız, liken aseton özütlerinin QSI potansiyellerinin araştırılması bakımından literatüre katkı sağlamıştır. Liken türlerinden elde edilen sekonder metabolitlerin *P. aeruginosa* QS mekanizması üzerindeki etkinliklerine dair

çalışmalar çok az sayıdadır. Bu çalışmada sekonder metabolitleri içeren liken özütlerinin QSI potansiyelleri floresan ışıma ölçümleriyle araştırılmış, biyofilm ve swarming-motility testleri ile desteklenmiştir. Liken aseton özütlerinin QS inhibitörleri olarak kullanımları birden fazla parametre ile test edilmiş ve bu yönde literatüre katkı sağlayarak bundan sonraki çalışmalar için de temel çalışma niteliği taşıyacağı öngörülmüştür.

5. KAYNAKLAR / REFERENCES

[1] Mohr, K. I. (2016). History of Antibiotics Research. Springer International Publishing, 2016, 1-36.

[2] ECDC (2014) Antimicrobial resistance surveillance in Europe. http://www.ecdc.europe.eu/en/healthtopics/antimicrobial-resistance-and-consumption/antimicrobial_resistance/pages/index.aspx

[3] CDC (2013) Antibiotic Resistance Threats in the United States. https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/

[4] Harmanci, A., Harmanci, Ö., & Akova, M. (2002). Hospital-acquired pneumonia: challenges and options for diagnosis and treatment. Journal of hospital infection, 51(3), 160-167.

[5] Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 21, 319-346.

[6] Agarwal, A., Gupta, N. D., & Agarwal, V. (2014). Quorum sensing: Communication sense of bacteria. Indian Journal of Oral Sciences, 5(2), 63.

[7] Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. Annual Reviews in Microbiology, 55(1), 165-199.

[8] Chopra, N., & Abrol, S. (2016). Quorum sensing: Bacterial chit chat. Universal Research Journal of Dentistry, 6(2), 93.

[9] Jayaraman, A., & Wood, T. K. (2008). Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. Annu. Rev. Biomed. Eng., 10, 145-167.

[10] Garg, N., Manchanda, G., & Kumar, A. (2014). Bacterial quorum sensing: circuits and applications. Antonie Van Leeuwenhoek, 105(2), 289-305.

[11] Stevens, A. M., & Greenberg, E. P. (1997). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. Journal of Bacteriology, 179(2), 557-562.

[12] Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annual review of genetics, 35(1), 439-468.

[13] Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. Nature Reviews Microbiology, 14(9), 576-588.

[14] LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 77(1), 73-111.

[15] Goo, E., An, J. H., Kang, Y., & Hwang, I. (2015). Control of bacterial metabolism by quorum sensing. Trends in microbiology, 23(9), 567-576.

[16] Lazar, V. (2011). Quorum sensing in biofilms–how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?. Anaerobe, 17(6), 280-285.

[17] Solano, C., Echeverz, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. Current opinion in microbiology, 18, 96-104.

[18] O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology, 54(1), 49-79.

[19] Uludağ Altun, H., & Şener, B. (2008). Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. Hacettepe Tıp Dergisi, 39, 82-88.

[20] Römling, U., Kjelleberg, S., Normark, S., Nyman, L., Uhlin, B. E., & Åkerlund, B. (2014). Microbial biofilm formation: a need to act. Journal of internal medicine, 276(2), 98-110.

[21] Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology, 14(9), 563-575.

[22] Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. Research in microbiology, 156(5-6), 626-633.

[23] Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy, 45(4), 999-1007.

[24] Fonseca, A. P., & Sousa, J. C. (2007). Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. International journal of antimicrobial agents, 30(3), 236-241.

[25] Ribeiro, S. M., Felício, M. R., Boas, E. V., Gonçalves, S., Costa, F. F., Samy R. P., Santos N. C., Franco O. L. (2016). New frontiers for anti-biofilm drug development.

Pharmacology & therapeutics, 160, 133-144.

[26] Moshynets, O. V., & Spiers, A. J. (2016). Viewing biofilms within the larger context of bacterial aggregations. In Microbial biofilms: importance and applications. InTech.

[27] Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. Biologicals, 42(1), 1-7.

[28] Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. Microbial ecology, 68(1), 1-12.

[29] Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and disease, 67(3), 159-173.

[30] Arancibia, F., Bauer, T. T., Ewig, S., Mensa, J., Gonzalez, J., Niederman, M. S., & Torres, A. (2002). Community-acquired pneumonia due to Gram-negative bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*: incidence, risk, and prognosis. Archives of Internal Medicine, 162(16), 1849-1858.

[31] Bjarnsholt T, Jensen PO, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Pressler T, Givskov M & Hoiby N (2009). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. Pediatr Pulmonol 44: 547–558.

[32] Weinstein, R. A., Gaynes, R., Edwards, J. R., & National Nosocomial Infections Surveillance System. (2005). Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. Clinical infectious diseases, 41(6), 848-854.

[33] Pier GB, Ramphal R. (2009). *Pseudomonas aeruginosa.* In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th Edition. New York: Elsevier Churchill Livingstone.

[34] Jawetz, Melnick and Adelberg. Tıbbi mikrobiyoloji, Prof. Dr. Osman Şadi Yenen (edt), Nobel Tıp kitapevi, İstanbul, 2010:161

[35] Bjarnsholt, T., Tolker-Nielsen, T., Høiby, N., & Givskov, M. (2010). Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. Expert reviews in molecular medicine, 12, e11.

[36] Obritsch, M. D., Fish, D. N., MacLaren, R., & Jung, R. (2005). Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and

treatment options. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 25(10), 1353-1364.

[37] Walker, J., & Moore, G. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water systems: biofilms, guidelines, and practicalities. Journal of Hospital Infection, 89(4), 324-327.

[38] Jiricny, N., Molin, S., Foster, K., Diggle, S. P., Scanlan, P. D., Ghoul, M., Johansen H. K.,Santorelli L. A., Popat R., West S. A., Griffin, A. S. (2014). Loss of social behaviours in populations of *Pseudomonas aeruginosa* infecting lungs of patients with cystic fibrosis. PloS one, 9(1), e83124.

[39] Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerging infectious diseases, *4*(4), 551.

[40] Shih, P. C., & Huang, C. T. (2002). Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 49(2), 309-314.

[41] Chatterjee, M., Anju, C. P., Biswas, L., Kumar, V. A., Mohan, C. G., & Biswas, R. (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. International Journal of Medical Microbiology, 306(1), 48-58.

[42] Smith, R. S., & Iglewski, B. H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. Current opinion in microbiology, *6*(1), 56-60.

[43] Wang, M., Schaefer, A. L., Dandekar, A. A., & Greenberg, E. P. (2015). Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(7), 2187-2191.

[44] Liu, Y. C., Chan, K. G., & Chang, C. Y. (2015). Modulation of host biology by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecules: messengers or traitors. *Frontiers in microbiology, 6, 1226.*

[45] Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein & cell, 6(1), 26-41.

[46] Bala, A., Gupta, R. K., Chhibber, S., & Harjai, K. (2013). Detection and quantification of quinolone signalling molecule: a third quorum sensing molecule of *Pseudomonas aeruginosa* by high performance-thin layer chromatography. Journal of Chromatography B, 930, 30-35.

[47] Laverty, G., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2014). Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. Pathogens, 3(3), 596-632.

[48] Holban, A. M., Chifiriuc, M. C., & Lazăr, V. (2013). Host cells response in *Pseudomonas aeruginosa* infections-role of quorum sensing molecules. African Journal of Microbiology Research, 7(20), 2140-2149.

[49] Rasamiravaka, T., & El Jaziri, M. (2016). Quorum-sensing mechanisms and bacterial response to antibiotics in *P. aeruginosa*. Current microbiology, 73(5), 747-753.

[50] Barr H. L., Halliday N., Cámara M., Barrett D. A., Williams P., Forrester D. L.,. Simms R, et al. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis. European Respiratory Journal, ERJ-02252.

[51] McGrath, S., Wade, D. S., & Pesci, E. C. (2004). Dueling quorum sensing systems in Pseudomonas aeruginosa control the production of the Pseudomonas quinolone signal (PQS). FEMS microbiology letters, 230(1), 27-34.

[52] Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. Biologicals, 42(1), 1-7.

[53] Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. BioMed research international, 2015.

[54] Rybtke, M., Hultqvist, L. D., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. Journal of molecular biology, 427(23), 3628-3645.

[55] Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M., & Chikindas, M. L. (2016). Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. Applied and Environmental Microbiology, AEM-02508.

[56] Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 34(5), 877-886.

[57] Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M., & Chikindas, M. L. (2016). Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. Applied and Environmental Microbiology, AEM-02508.

[58] Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., & Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International journal of oral science*, *7*(1), 1-7.

[59] Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. Archives of microbiology, 198(1), 1-15.

[60] Brackman, G., & Coenye, T. (2015). Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. Current pharmaceutical design, 21(1), 5-11.

[61] Pérez-Pérez, M., Jorge, P., Pérez Rodríguez, G., Pereira, M. O., & Lourenço, A. (2017). Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: new insights through network mining. Biofouling, 1-15.

[62] Koh, C. L., Sam, C. K., Yin, W. F., Tan, L. Y., Krishnan, T., Chong, Y. M., & Chan, K. G. (2013). Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. Sensors, 13(5), 6217-6228.

[63] Truchado, P., Larrosa, M., Castro-Ibáñez, I., & Allende, A. (2015). Plant food extracts and phytochemicals: their role as quorum sensing inhibitors. Trends in Food Science & Technology, 43(2), 189-204.

[64] Zhang, J., Rui, X., Wang, L., Guan, Y., Sun, X., & Dong, M. (2014). Polyphenolic extract from Rosa rugosa tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation. Food Control, 42, 125-131.

[65] Vasavi, H. S., Arun, A. B., & Rekha, P. D. (2016). Anti-quorum sensing activity of flavonoid-rich fraction from *Centella asiatica* L. against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 49(1), 8-15.

[66] Weber, B., & Büdel, B. (2011). Fungi and Lichens. In Encyclopedia of Geobiology (pp. 401-409). Springer Netherlands.

[67] Aptroot, A., Aslan, A., Etayo, J., Spier, L., & Karagöz, Y. (2010). Lichenized and lichenicolous fungi from nine different areas in Turkey. Mycotaxon, *111*(1), 113-116.

[68] Bargagli, R. (2016). Moss and lichen biomonitoring of atmospheric mercury: a review. Science of the Total Environment, 572, 216-231.

[69] Ranković, B., & Kosanić, M. (2015). Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. In Lichen Secondary Metabolites (pp. 1-26). Springer International Publishing.

[70] Molnár, K., & Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. Zeitschrift für Naturforschung *C*, *65*(3-4), 157-173.

[71] Çobanoğlu, G., Sesal, C., Açıkgöz, B., & Karaltı, İ. (2016). Evaluation of

antimicrobial activity of the lichens *Physcia aipolia, Xanthoria parietina, Usnea florida, Usnea subfloridana* and *Melanohalea exasperata*. Modern Phytomorphology, 10, 19-24.

[72] Shukla, V., Joshi, G. P., & Rawat, M. S. M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. Phytochemistry Reviews, 9(2), 303-314.

[73] Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., et al. (2011). Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. International journal of molecular sciences, 12(8), 5428-5448.

[74] Gupta, V. K., Darokar, M. P., Saikia, D., Pal, A., Fatima, A., & Khanuja, S. P. (2007). Antimycobacterial activity of lichens. Pharmaceutical biology, 45(3), 200-204.

[75] Sesal C., Çobanoğlu G., Karaltı İ., Açıkgöz B. (2016). In Vitro antimicrobial potentials of four Ramalina lichen species from Turkey. Current Research in Environmental & Applied Mycology 6 (3): 202–209(2016) ISSN 2229-222.

[76] Kosanić, M., Manojlović, N., Janković, S., Stanojković, T., & Ranković, B. (2013). *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. Food and chemical toxicology, 53, 112-118.

[77] Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T., Rančić, A., & Manojlović, N. (2014). Cladonia lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. LWT-Food Science and Technology, 59(1), 518-525.

[78] Nithyanand, P., Shafreen, R. M. B., Muthamil, S., & Pandian, S. K. (2015). Usnic acid, a lichen secondary metabolite inhibits Group A Streptococcus biofilms. Antonie van Leeuwenhoek, 107(1), 263-272.

[79] Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adıgüzel, A., Sahin, F., & Özkan, H. (2006). Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliacea, Dermatocarpon miniatum., Everinia divaricata., Evernia prunastri.,* and *Neofuscella pulla*. Pharmaceutical biology, 44(4), 247-252.

[80] Shrestha, G., Raphael, J., Leavitt, S. D., & St. Clair, L. L. (2014). In vitro evaluation of the antibacterial activity of extracts from 34 species of North American lichens. Pharmaceutical biology, 52(10), 1262-1266.

[81] Yılmaz, M., Tay, T., Kıvanç, M., TüRK, H., & Türk, A. Ö. (2005). The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulosa* and its 3-hydroxyphysodic acid constituent. Zeitschrift für Naturforschung C, 60(1-2), 35-38.

[82] Smith, C. W. (2009). Lichens of Great Britain and Ireland. British Lichen Society.

[83] Hale, M. E. (1979). How to know the lichens. WC Brown Co.

[84] Ranković, B. (Ed.). (2014). Lichen Secondary Metabolites: Bioactive properties and pharmaceutical potential. Springer.

[85] Shukla, V., Joshi, G. P., & Rawat, M. S. M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews, 9(2), 303-314.*

[86] Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S. (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. Microbiology, 148(1), 87-102.

[87] Yang, L., Rybtke, M.T., Jakobsen, T.H., Hentzer, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. (2009) Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(6), 2432-2443.

[88] Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Radulovic, N., Mladenovic, M., Stankovic, M., et al. (2014). *Platismatia glaucia* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. EXCLI journal, 13, 938.

[89] Gökalsın, B., & Sesal, N. C. (2016). Lichen secondary metabolite evernic acid as potential quorum sensing inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(9), 150.

[90] Riedel, K., Boustie, J., Eberl, L., Berg, G., & Grube, M. (2008). Effects of lichen secondary metabolites on bacterial functions and biofilm formation. Planta Medica, *74*(09), PA85.

[91] Jakobsen, T.H., Bragason, S.K., Phipps, R.K., Christensen, L.D., van Gennip, M., Alhede, M., Skindersoe, M., Larsen, T.O., Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M. (2012) Food as a source for QS inhibitors: iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and environmental microbiology, AEM-05992.

[92] Tapia-Rodriguez, M. R., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Martinez-Tellez, M. A., Martins, C. M., & Ayala-Zavala, J. F. (2016). Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. Food Control.

[93] Packiavathy, I. A. S. V., Priya, S., Pandian, S. K., & Ravi, A. V. (2014). Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin–an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. Food chemistry, 148, 453-460.

[94] Ugurlu, A., Yagci, A. K., Ulusoy, S., Aksu, B., & Bosgelmez-Tinaz, G. (2016). Phenolic compounds affect production of pyocyanin, swarming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa.* Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6(8), 698-701.

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI : **Ezgi UÇARKUŞ**

YAZIŞMA ADRESİ : **Cumhuriyet Mah. Çağdaş Kent 2. Etap 7/O Blok KIRKLARELİ**

DOĞUM TARİHİ ve YERİ : **01.06.1991 İSTANBUL**

E-POSTA : **ezgi.ucarkus@yahoo.com**

ÖĞRENIM DURUMU : **Yüksek Lisans**

Derece	**Alan**	**Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Ortaöğretim	Sayısal	Kırklareli Anadolu Lisesi	2009
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2014

Yayınlar

Yeditepe Üniversitesi- II. Mikoloji Günleri Sempozyumu 2015 – *Evernia divaricata* Likenine Ait Sekonder Metabolitlerin ve Fragmentlerin *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* Bakteri Türleri Üzerindeki Antibakteriyel Etkinliği - Poster Sunumu

International Congress on Applied Biological Sciences, ICABS 2015 - Antibacterial Activity of Extracts of Some Lichens Species on *Escherichia coli* pSB 401- Poster Sunumu

2. İVEK İlaç ve Eczacılık Kongresi 2015 - Balıkesir Bölgesinden Toplanan Liken ÖrneklerineAit Özütlerin *Escherichia coli* Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri - Poster Sunumu

2. İVEK İlaç ve Eczacılık Kongresi 2015 – Balıkesir Bölgesinden Toplanan *Platismatia glauca* Likenine Ait Aseton Özütünün *Escherichia coli* Quorum Sensing Mekanizmasına Etkisi – Poster Sunumu

8th International conference on Image Processing, Wavelet and Applications (IWW2016), Inhibiting Quorum Sensing Systems of *Pseudomonas aeruginosa* by Extracts of Lichens Collected from Bolu-Aladağlar Region – Sözlü Sunum

8th International conference on Image Processing, Wavelet and Applications (IWW2016), Antibacterial Effects of Resveratrol Against *Propionibacterium acnes* - Sözlü Sunum