



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BAZI LİKEN SEKONDER
METABOLİTLERİN SENTEZİNDE
POLİKETİD SENTEZ (PKS) GENLERİNİN
VE EKSPRESYONLARININ POTANSİYEL
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

BİRKAN AÇIKGÖZ

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU

EŞ DANIŞMAN

Doç. Dr. Nüzhet Cenk SESAL

İSTANBUL, 2017



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BAZI LİKEN SEKONDER
METABOLİTLERİN SENTEZİNDE
POLİKETİD SENTEZ (PKS) GENLERİNİN
VE EKSPRESYONLARININ POTANSİYEL
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

BİRKAN AÇIKGÖZ

(720111004)

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU

EŞ DANIŞMAN

Doç. Dr. Nüzhet Cenk SESAL

İSTANBUL, 2017

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Öğrencisi Birkan AÇIKGÖZ'ün "Bazı Liken Sekonder Metabolitlerin Sentezinde Poliketid Sentez (PKS) Genlerinin ve Ekspresyonlarının Potansiyel Etkilerinin Belirlenmesi" başlıklı tez çalışması, 20 Haziran 2017 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU (Danışman)

Marmara Üniversitesi (İMZA) 

Doç.Dr. Yıldız AYDIN (Üye)

Marmara Üniversitesi (İMZA) 

Prof.Dr. Tamer ÖZCAN (Üye)

İstanbul Üniversitesi (İMZA) 

Prof.Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT (Üye)

Marmara Üniversitesi (İMZA) 

Yrd.Doç.Dr. İskender KARALTI (Üye)

Yeditepe Üniversitesi (İMZA) 

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ^{24.07.2017} tarih ve ^{2017/17-02} sayılı kararı ile Birkan AÇIKGÖZ 'ün Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Doktora derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Uğur YAHŞİ



ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim sürecinde tecrübesini, bilgi birikimini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, anne ilgisini ve sevgisini her zaman hissettiren çok kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Yaklaşık dokuz yıllık lisansüstü serüvenimde hep yanımda olan, tüm soru ve sorunlarıma çözümler üreten, öğrencisi olmaktan gurur ve övünç duyduğum saygıdeğer hocam Doç. Dr. N. Cenk SESAL'a her şey için çok teşekkür ederim

Bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Jae-Seoun HUR, Doç. Dr. Kojiro HARA, Doç. Dr. Bülent AKKOYUNLU, Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN, Doç. Dr. Şener AKINCI, Doç. Dr. Filiz VARDAR, Doç. Dr. Yıldız AYDIN, Yrd. Doç. Dr. İskender KARALTI, Dr. Ezgi ÇABUK ŞAHİN, Dr. Salim SÜNER, Uzm. Dr. Barlas DİLGİLYAN ve üzerimde emeği olan tüm hocalarıma teşekkür ederim. Çok kıymetli ekip arkadaşlarım Özge KEKEÇ ŞAHİN, Vahap ELDEM, Buse BERBER, Ümmügülüm TAHİROĞLU, Nazlıhan YILDIRIM, Ezgi UÇARKUŞ ve Şevval Maral ÖZCAN'a teşekkür ederim. Bu süreçte her an yanımda olan Barış GÖKALSIN ve Didem BERBER'e özel teşekkürlerimi sunarım. Herzaman hayatımda olmalarını istediğim dostlarım Şeyma TARTAR, Harika ESMER, Güllü KAYMAK ve çok kıymetli ve vefakâr dostum Dr. Meliha GÜNDÜZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kıymetlim babam Hikmet AÇIKGÖZ ve hayatımdaki yegâne desteğim, her şeyin en güzelini hak eden fedakâr annem Saadet AÇIKGÖZ'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Desteklerini hep hissettiğim canlarım Özkan AÇIKGÖZ, Işık AÇIKGÖZ, Özge Su ALPAĞU, Hasan ALPAĞU, Hasret AÇIKGÖZ ve Şiir AÇIKGÖZ'e özel olarak teşekkür ederim.

Doktora tez çalışması sürecinde maddi destek sağladığı için TÜBİTAK-BİDEB 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programına teşekkür ederim. FEN-C-DRP-100914-0337 no'lu proje ile tez çalışmamı destekleyen Marmara Üniversitesi BAPKO Birimi'ne teşekkür ederim.

Haziran/ 2017

Birkan AÇIKGÖZ

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
YENİLİK BEYANI	xii
SEMBOLLER	xiv
KISALTMALAR	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvi
TABLO LİSTESİ	xxvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Likenlerle İlgili Genel Bilgiler	2
1.1.1. Likenlerin yapısı	2
1.1.2. Likenlerin yayılışı	4
1.1.3. Likenlerin üremesi	5
1.1.4. Likenlerin fizyolojisi ve simbiyoz yaşam	6
1.1.5. Likenlerin sistematik tarihçesi ve sınıflandırılması	6
1.1.6. Likenlerin kullanım alanları	7
1.1.6.1. Likenlerin ilaç olarak kullanımı	8
1.1.6.2. Likenlerin antimikrobiyal, anti-quorum sensing, antibiyofilm etkisi	9
1.2. Liken Kültür Uygulamaları ve Son Gelişmeler	11
1.2.1. Spordan türetilmiş kültür (Spore-derived culture)	13
1.2.2. Liken tallus parçasından türetilmiş kültür (Thallus fragment-derived culture)	14
1.3. Liken Sekonder Metabolitleri	15
1.3.1. Liken sekonder metabolitlerinin sentez mekanizması	16
1.3.1.1. Asetil-polimalonil yolağı	16
1.3.1.2. Şikimik asit yolağı	18
1.3.1.3. Mevalonik asit yolağı	18
1.3.3. PKS bölgesi ile ilgili yapılan çalışmalar	23

1.3.4. Stres koşullarının likenler üzerine etkisi	26
1.4. <i>Hypogymnia tubulosa</i> (Schaer.) Hav. Liken Türünün Karakteristik Özellikleri	28
2. MATERYAL ve YÖNTEM	29
2.1. Materyal	29
2.1.1. Deneylerde kullanılan sarf malzemeler	29
2.1.2. Deneylerde kullanılan cihazlar	30
2.1.3. Kullanılan besiyerleri ve kimyasalların hazırlanması	32
2.1.4. Liken materyalinin temini, tayini ve saklanması	33
2.1.4.1. Materyal toplama çalışmaları	33
2.1.4.2. Liken türlerinin tayin çalışmaları	34
2.1.5. Bakteri suşlarının temini, saklanması ve çoğaltılması	34
2.2. Yöntem	35
2.2.1. Doğadan toplanan <i>Hypogymnia tubulosa</i> örneklerinin bakterilerin büyüme eğrisi ve biyofilm formu üzerindeki aktivitelerinin incelenmesi	35
2.2.1.1. <i>H. tubulosa</i> liken örneklerinden özüt elde edilmesi	35
2.2.1.2. Bakterilerin belirli bir konsantrasyona göre ayarlanması	35
2.2.1.3. Özütlerin bakterilerin büyüme eğrisi üzerindeki etkilerinin incelenmesi	36
2.2.1.4. Özütlerin bakterilerin anti-biyofilm özelliklerinin incelenmesi	37
2.2.2. Doğadan toplanan <i>Hypogymnia tubulosa</i> örneklerinin kültüre alınması	38
2.2.3. Kültürde çoğalan örneklerin pasaj geçilmesi	39
2.2.4. Kültür örneklerinin moleküler tür tayini	40
2.2.4.1. DNA izolasyonu	40
2.2.4.2. DNA saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi	41
2.2.4.3. Hedef bölgenin PZR ile çoğaltılması	41
2.2.4.4. Jelden geri kazanım	43

2.2.4.5. Dizi analizi	44
2.2.4.6. Filogenetik analiz	44
2.2.5. Kültürde çoğalan örneklerde metabolit üretiminin artırılması için stres uygulanması	45
2.2.5.1. Stres uygulanacak mikobiyont örneklerinin pasaj geçilmesi ve büyümelerinin sağlanması	45
2.2.5.2. Kültürde çoğalan örneklerin büyüme oranlarının ölçülmesi	45
2.2.5.3. Örneklerin nitrat ve asetat içeren besiyerinde strese maruz bırakılması	46
2.2.5.4. Örneklerin sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılması	47
2.2.6. Kültürde çoğalan <i>Hypogymnia tubulosa</i> türünün PKS gen bölgesinin analizi	48
2.2.6.1. PKS gen bölgesinin seçilmesi	48
2.2.6.2. Primer dizaynı	49
2.2.6.3. Primerlerin optimizasyonu	50
2.2.6.4. <i>H. tubulosa</i> mikobiyontuna ait PKS gen bölgesinin dizilenmesi	50
2.2.6.5. <i>H. tubulosa</i> mikobiyontuna ait PKS gen bölgesi dizisinin incelenmesi ve filogenetik analiz	51
2.2.7. Kültürde çoğalan örneklerin stres koşullarında PKS gen ekspresyon seviyesinin ölçülmesi	53
2.2.7.1. <i>H. tubulosa</i> mikobiyontun örneklerinden total RNA izolasyonu	53
2.2.7.2. İzole edilen total RNA saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi	54
2.2.7.3. İzole edilen total RNA'lerden cDNA sentezi	54
2.2.7.4. kRT-PZR ile cDNA'ların çoğaltılması	55
2.2.7.5. kRT-PZR bulgularının analizi	56
2.2.8. Stres koşullarında kültürde çoğalan <i>Hypogymnia tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin bakterilerin büyüme eğrisi ve biyofilm formu üzerindeki aktivitelerinin incelenmesi	57

2.2.8.1. Kültürde çoğalan <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinden özüt elde edilmesi	57
2.2.8.2. Bakterilerin belirli bir konsantrasyona göre ayarlanması	58
2.2.8.3. Özütlerin bakterilerin büyüme eğrisi üzerindeki etkilerinin incelenmesi	58
2.2.8.4. Özütlerin bakterilerin anti-biyofilm özelliklerinin incelenmesi	58
2.2.9. Stres koşullarında kültürde çoğalan <i>Hypogymnia tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin aseton özütü içeriğinin belirlenmesi	59
2.2.9.1. İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography TLC)	59
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	61
3.1. Bulgular	61
3.1.1. Do�adan toplanan <i>Hypogymnia tubulosa</i> �rneklerinin bakterilerin büyüme eğrisi ve biyofilm formu üzerindeki aktiviteleri ile ilgili bulguları	61
3.1.1.1. <i>H. tubulosa</i> aseton özütlerinin <i>S. aureus</i> su�unun büyüme eğrisi üzerindeki etkileri	61
3.1.1.2. <i>H. tubulosa</i> aseton özütlerinin <i>S. aureus</i> su�unun üzerindeki anti-biyofilm etkileri	62
3.1.1.3. <i>H. tubulosa</i> aseton özütlerinin <i>P. aeruginosa</i> PAO1 su�unun büyüme eğrisi üzerindeki etkileri	64
3.1.1.4. <i>H. tubulosa</i> aseton özütlerinin <i>P. aeruginosa</i> PAO1 su�u üzerindeki anti-biyofilm etkileri	65
3.1.2. Do�adan toplanan <i>Hypogymnia tubulosa</i> mikobiyontlarının kültüre alınması	67
3.1.2.1. Kültürde çoğalan örneklerin pasaj geçilmesi	69
3.1.3. Kültür �rneklerinin moleküler tür tayini bulguları	70
3.1.3.1. DNA izolasyonu ve saflığı	70
3.1.3.2. Hedef bölgenin PZR ile çoğaltılması	70
3.1.3.3. <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerine ait ITS dizi analizi	71

3.1.3.4. <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerine ait ITS dizilerinin filogenetik analizi	72
3.1.4. Kültürde çoğalan örneklerde metabolit üretiminin artırılması için stres uygulanması bulguları	76
3.1.4.1. Stres uygulanacak mikobiyont örneklerinin pasaj geçilmesi ve büyümelerinin sağlanması	76
3.1.4.2. Kültürde çoğalan örneklerin büyüme oranları	78
3.1.5. Kültürde çoğalan <i>Hypogymnia tubulosa</i> türünün PKS gen bölgesi	79
3.1.5.1. Primer dizaynı ve optimizasyonu	79
3.1.5.2. <i>H. tubulosa</i> mikobiyontuna ait PKS gen bölgesinin dizisi ve dizilerin analiz bulguları	80
3.1.6. Kültürde çoğalan örneklerin stres koşullarında H1 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları	82
3.1.6.1. Nitrat-asetat stres koşullarında H1 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları	84
3.1.6.2. Sıcaklık ve ışık stres koşullarında H1 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları	85
3.1.7. Kültürde çoğalan örneklerin stres koşullarında H2 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları	90
3.1.7.1. Nitrat-asetat stres koşullarında H2 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları	90
3.1.7.2. Sıcaklık ve ışık stres koşullarında H2 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları	91
3.1.8. Stres koşullarında kültürde çoğalan <i>Hypogymnia tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin bakterilerin büyüme eğrisi ve biyofilm formu üzerindeki aktivite bulguları	92
3.1.8.1. Stres altındaki <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkileri	93

3.1.8.2. Stres altındaki <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkileri	104
3.1.8.3. Stres altındaki <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin <i>S. aureus</i> suşlarının üzerindeki anti - biyofilm etkileri	116
3.1.8.4. Stres altındaki <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerindeki anti -biyofilm etkisi	128
3.1.9. Stres koşullarında kültürde çoğalan <i>Hypogymnia tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin aseton özütünün içeriğinin belirlenmesi	141
3.1.9.1. İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography - TLC)	141
3.2. Tartışma	143
4. SONUÇLAR	153
KAYNAKLAR	156
ÖZGEÇMİŞ	172

ÖZET

BAZI LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİN SENTEZİNDE POLİKETİD SENTEZ (PKS) GENLERİNİN VE EKSPRESYONLARININ POTANSİYEL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Sentetik ilaçlar yerine doğal ürünlerden elde edilen ilaçlar günümüzde hastalıkların tedavisinde tercih edilmektedir. Eski zamanlardan beri hastalıkların iyileştirilmesinde çeşitli likenlerden de yararlanıldığı bilinmektedir. Ancak likenler, oldukça yavaş büyüyen organizmalar olmalarından dolayı, etken madde elde edilmesi bakımından sınırlı bir kaynak olarak düşünülmektedir. Likenlerden endüstriyel anlamda yararlanmak için bazı türlerden uygun miktar materyal bulmak oldukça zor olmaktadır. Ayrıca doğada az görülen bazı liken türlerini korumak ve yayılışı fazla olan türleri de bilinçli toplamak gerekmektedir. Değişen doğal habitat koşullarına bağlı olarak sekonder metabolit üretimindeki olası değişimler de söz konusudur. Bu yaklaşımla, liken maddelerinin labotatuvar şartlarında çoğaltılması amacıyla yola çıkılarak, likenlerde sekonder metabolitlerin sentezlenmesinde etkili olan poliketid sentez (PKS) genlerinin stres altında ekspresyon seviyesindeki, etken madde üretimindeki ve buna bağlı olarak biyolojik aktivitedeki değişimin incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaç doğrultusunda, Bursa Alaçam/Uludağ lokalitesinden toplanan *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. örneklerinden elde edilen aseton özütü *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 CECT 4122 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine etkileri Cytation 3 cihazında spektrofotometrik olarak test edilmiştir. Bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine aktiviteye sahip olduğu tespit edilen *H. tubulosa* mikobiyont örnekleri Türkiye’de ilk defa kültüre alınmıştır. Türkiye’de yayılış gösteren *H. tubulosa* mikobiyont örneğinin moleküler tür tayini ilk defa yapılmış olup biyoinformatik yöntemlerle filogenetik ağaçları oluşturulmuştur. Kültürde büyüyen örnekler sıcaklık, ışık, nitrat ve asetat stresi uygulanmıştır. 15 ve 30 gün süreyle büyüyen örneklerin büyüme oranları hesaplanmıştır. *H. tubulosa* için ilk kez dizayn edilen primerlerle strese maruz bırakılan örneklerin kRT-PZR’la PKS gen ekspresyon oranındaki değişim incelenmiştir. Stres koşullarının etken madde üretimini ve buna bağlı olarak bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine etkilerini etkilemiş olabileceği

düşünümlerek tüm örneklerden elde edilen aseton özütleri aktivite testine tabi tutulmuştur. Özütlerin içeriği ince tabaka kromatografisi ile incelenmiştir.

Çalışma sonunda, Bursa lokalitesinden toplanan taze liken örneklerinin aseton özütünün *S. aureus* bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine oldukça etkili olduğu gözlenmiştir. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine sınırlı etkisi olsa da, özellikle biyofilm oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir. Kültüre alınan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin büyüme oranları incelendiğinde 15 günlük örneklerin 30 günlük örneklerle göre daha fazla büyüme oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Büyümenin daha fazla olduğu 15 günlük örneklerde 30 günlük örneklerle oranla gen ekspresyonunun daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde kültür ortamında asetat stresine maruz bırakılan mikobiyontların büyüme oranının daha az olduğu tespit edilirken, asetat stresine maruz bırakılan mikobiyontlarda gen ekspresyon oranı nitrat ve nitrat-asetat örneklerine göre oldukça yüksek bulunmuştur. PKS ekspresyon oranının büyüme oranı ile ters orantılı olduğu gözlenmiştir. Sıcaklık stresine maruz bırakılan mikobiyontlarda genellikle 15 °C'de ekspresyon oranının arttığı görülmüştür. Işık stresine maruz bırakılan mikobiyontlarda ise karanlık ortamın PKS gen ekspresyonunu artırdığı tespit edilmiştir.

Strese maruz bırakılan mikobiyontların aseton özütleri *P.aeruginosa* PAO1 ve *S. aureus* bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine etkili bulunmuştur. Özellikle *P.aeruginosa* PAO1 suşu üzerine sıcaklık ve ışık stresi altındaki mikobiyontların doğal örneklerden daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Nitrat ve asetat stresine maruz bırakılan örnekler incelendiğinde PKS gen ekspresyon oranının fazla olduğu asetat örneklerinin antibiyofilm aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Örneklerin sahip olduğu sekonder metabolitleri tespit etmek için uygulanan kromatografi testleri sonucunda örneklerde belirgin 4 madde tespit edilmiştir. Kültür örneklerinde tespit edilen bu maddelere doğal örneklerde rastlanmamıştır. Stres koşullarının PKS gen ekspresyonunu, metabolit üretimini ve bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine aktiviteyi etkilediği görülmektedir. Mikobiyontların kültürde çoğaltılarak endüstri alanında uygulanabilmesi için, örneklerin önce boyutunu artırıcı faktörlere maruz bırakılıp yeterli boyuta ulaştıktan sonra strese maruz bırakılarak metabolit üretiminin artırılacağı sonucuna varılmıştır.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE POTENTIAL EFFECTS OF POLYKETIDE SYNTHESIS (PKS) GENES AND EXPRESSIONS IN THE SYNTHESIS OF SOME LICHEN SECONDARY METABOLITES

Medicines obtained from natural products instead of synthetic drugs are now preferred in treatment of diseases. It is known that since ancient times various illnesses have benefited from various lichens. However, lichens are considered to be a limited resource in terms of active compounds as they are very slow growing organisms. It is very difficult to find the appropriate amount of material from some species to benefit industrially from lichens. Moreover, it is necessary to conserve some lichen species that are rarely found in nature and to consciously collect the species with a large distribution. Depending on the changing natural habitat conditions, possible changes in the production of secondary metabolites are also discussed. Therefore, with the intent of producing lichen substances under laboratory conditions, it is aimed to investigate the expression levels of polyketide synthase (PKS) genes, which are effective in the synthesis of secondary metabolites with biological activity, in lichens, and the changes in active compound production, biological activity and expression level of these genes under stress. For this purpose, the acetone extracts obtained from *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. lichen species collected from Bursa Alaçam / Uludağ locality were tested on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 CECT 4122 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bacterial strains growth curve and biofilm formation spectrophotometrically with the Cytation 3 instrument. The specimens of *H. tubulosa* mycobionts that have shown growth and biofilm inhibitory effects were cultured for the first time in Turkey. Molecular identification of the mycobiont samples of *H. tubulosa* spread in Turkey were performed for the first time and the phylogenetic trees were created by employing bioinformatical methods. “Temperature”, “light”, “nitrate” and “acetate” stress factors were applied to growing culture samples. The growth rates of the samples for 15 and 30 days were calculated. The change in the ratio of PKS gene expressions were examined via qPCR for the samples exposed to the stress with the primers designed for the first time for *H. tubulosa*. Acetone extracts from all samples were tested for biological activity given that stress conditions may have affected the active ingredient production

and hence the growth curve and biofilm formation of bacterial strains. The ingredients of the extracts were examined by thin layer chromatography.

At the end of the study, it was observed that the acetone extracts of fresh lichen samples collected from Bursa locality were highly effective on the growth curve and biofilm formation of *S. aureus* bacteria strains. Although there was a limited effect on *P. aeruginosa* PAO1 growth curve, an inhibitory effect on biofilm formation was observed. When the growth rates of cultured *H. tubulosa* mycobiont samples were examined, 15-day samples were found to have a higher growth rate than 30-day samples. It was determined that gene expressions were lower in 15 day samples which have shown higher growth, compared to 30 day samples. Similarly, growth rate was lower in mycobionts exposed to acetate stress and gene expression rates were significantly higher than the samples exposed to nitrate and nitrate-acetate stress. PKS expression ratio was observed to be inversely proportional to the growth rate. In mycobionts exposed to heat stress, it was observed that gene expression levels generally increased at 15 °C. Moreover, in the mycobionts exposed to light stress; gene expression levels were found to increase in dark conditions.

The acetone extracts of the mycobionts exposed to stress were found to be effective on the growth curve and biofilm formation of *P. aeruginosa* PAO1 and *S.aureus* bacterial strains. It was found that mycobionts under temperature and light stress were more effective on *P. aeruginosa* PAO1 strains than natural lichen specimens. When the samples exposed to nitrate and acetate stress were examined, it was observed that the acetate samples with higher PKS gene expression ratio had higher anti-biofilm activity. As a result of the chromatographic tests performed to detect secondary metabolites in the samples, 4 distinct substances were identified. These substances were detected in mycobiont samples unlike natural samples.

Stress conditions have been shown to be effective on PKS gene expressions, metabolite production and growth curve and biofilm production of the bacterial strains. It is concluded that in order for the mycobionts to be applied in industrial field by being propagated in culture, the metabolite production could be increased by first exposing the samples to size enhancing factors, and after reaching adequate size they can be exposed to stress.

YENİLİK BEYANI

Likenlerin doğal metabolizmalarının ürünü olarak ürettikleri sekonder metabolitlerin, yaygın adıyla “liken asitleri”nin tıp, eczacılık ve kimya (boya, parfümeri, besin) endüstrisinde önemli potansiyele sahip oldukları bilinmekle beraber bu metabolitlerin simbiyotik bir organizma olan likende nasıl sentezlendiği konusu henüz açıklık kazanmamıştır. Biyokimyasal işleyişin moleküler temelindeki ilgili genlerin ve gen ekspresyonlarının potansiyel etkilerinin aydınlatılması ile bu metabolitlerin daha etkin kullanılmalarına imkân sağlanabilecektir.

- Öncelikle likenlerdeki sekonder metabolit sentez mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlaması bakımından likenoloji bilimi için büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda dünyada ilk kez *H. tubulosa* türünün PKS gen bölgeleri ile ilgili veriler elde edilmiştir.

-Türkiye’de ilk kez liken örneklerinin mikobiyontları kültür koşullarında çoğaltılmıştır. Kültüre alma yöntemi Türkiye’de likenler için ilk kez uygulanmıştır. Bu yöntem liken örneklerinin ve metabolitlerinin doğal yollarla daha ucuz ve daha fazla elde edilebilmesini mümkün kılmaktadır. Yöntemin Türkiye’de uygulanması ve Türk araştırmacılara tanıtılması amacıyla yine ilk defa "Liken Kültürü Yöntem ve Uygulamaları Çalıştayı" düzenlenmiştir. Bu çalıştay kapsamında Güney Kore ve Japonya’dan alanında uzman araştırmacılar eşliğinde hem likenlerin kültüre alınma yöntemleri hem de likenlerde uygulanabilecek moleküler yöntemler uygulamalı olarak gösterilmiştir.

-Bu çalışma ilk kez Türkiye’den toplanan örneklerle ait PKS gen dizilerinin GenBank’a yeni veri olarak sunulmasıyla likenolojide bilgi birikimine katkı sağlamıştır.

-*Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. türünün PKS gen bölgesi analiz edilmiştir. *H. tubulosa* için ilk kez PKS gen bölgesine uygun primerler tasarlanmış ve *H. tubulosa* PKS gen bölgelerinin ekspresyon oranındaki değişim incelenmiştir.

- Yine bu tez çalışması ilk kez, *H. tubulosa* türünün doğadan toplanan ve kültürde çoğaltılan mikobiyont örneğinin antibiyofilm etkilerinin incelenmesi konusunda literatüre veri kazandırmıştır.

- Çalışmamız, metabolitlerin *in vivo* şartlarda elde edilmesinde ve ürün miktarının artırılmasında gerekli uygun ortamların belirlenmesi açısından değerli veriler sunması

ile farklı bir öneme sahiptir. İlk kez sıcaklık, ışık, asetat, nitrat stresinin etkileri gen ekspresyonu seviyesinde incelenmiştir.

- Doğadan toplanan ve kültürde çoğaltılan mikobiyont örneğinin karşılaştırılmasının yanında farklı stres koşullarında *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 CECT 4122 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakteri suşlarının biyofilm oluşumu üzerine etkileri ve metabolit üretiminin incelenmesi yönünden de yenilik taşımaktadır.

- Türkiye'de yayılış gösteren liken mikobiyontlarının moleküler tür tayini ilk defa yapılmış ve biyoinformatik yöntemlerle filogenetik ağaçları oluşturulmuştur.

- Bu tez konusu hem likenoloji alanında sistematik, moleküler ve biyokimyasal bilgi birikimi sağlaması; hem de moleküler, biyoinformatik, mikrobiyoloji gibi disiplinleri kapsaması ve bu disiplinlerin tekniklerinin uygulanmış olması ile multidisipliner bir çalışma özelliği taşımaktadır.

- Ülkemizde bu konuda güncel ve yenilikçi yöntemlerle yapılan ilk orijinal çalışma olarak değerlidir. Böylece, liken metabolitlerinin doğal yollarla daha ucuz ve daha fazla elde edilebilmesini mümkün kılacak bu tez çalışmasıyla, hem endüstriyel hem de ekonomik avantajların beraberinde gelebileceği düşünülmektedir.

SEMBOLLER

%	: Yüzde
±	: Artı-Eksi İşareti
bp	: Baz çifti
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
cm ²	: Santimetre kare
CO ₂	: Karbondioksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
dk	: Dakika
M	: Molar
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
µL	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
<	: Küçüktür
≥	: Büyük eşit
MgCl	: Magnezyum klorür
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
Sn	: Saniye
dH ₂ O	: Distile su
pH	: Power of Hydrogen

KISALTMALAR

cDNA	: Komplementer DNA
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribo Nükleik Asit)
DNase	: Deoxyribonuclease
dNTP	: Deoxyribonucleotide Triphosphate
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetikasit
ITS	: Internal Transcribed Spacers
kRT-PZR	: Gerçek zamanlı Polimeraz zincir reaksiyonu
LSU	: Large Subunit (Büyük Alt Birim)
MEGA	: The Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MP	: Maximum Parsimony
MYA	: Malt-Yeast-Agar
NJ	: Neighbor Joining
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PBS	: Phosphate-buffered saline
PKS	: Poliketid sentaz
rDNA	: Ribozomal DNA
RNase	: Ribonuclease
rpm	: Revolutions per minute
SSU	: Small Subunit
TBE	: Tris/Borate/EDTA
TE	: Tris /EDTA

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Liken tallusunun anatomik yapısı	3
Şekil 1.2. Likenlerde üreme yapıları	5
Şekil 1.3. Liken apotesyumundan kültüre alma aşamaları	14
Şekil 1.4. Liken sekonder metabolit çeşitleri	17
Şekil 1.5. Poliketid sentezinde görevli enzimlerin sentez mekanizması	20
Şekil 1.6. Tekrarlayan Tip I poliketid sentez enzimlerinin yapısı	21
Şekil 1.7. PKS sentaz çeşitleri	22
Şekil 1.8. Metabolit sentez mekanizması	23
Şekil 1.9. Metabolit sentezinde etkili faktörler	26
Şekil 1.10. Çalışmanın hedefine ulaşması için yapılması planlanan uygulamalar	28
Şekil 2.1. Arazi çalışması aşaması	33
Şekil 2.2. <i>Hypogymnia tubulosa</i> (Schaer.) Hav. liken türü	34
Şekil 2.3. Özüt çıkarma aşamaları	36
Şekil 2.4. Anti-biyofilm test aşamaları	38
Şekil 2.5. Kültüre alma aşamaları	39
Şekil 2.6. Mikobiyont boyutunun ölçümü	46
Şekil 2.7. Karbon ve azot kaynağı nitrat ve asetat stres uygulaması	47
Şekil 2.8. Sıcaklık ve ışık stres uygulaması	47
Şekil 2.9. Gen bölgesinin seçimi	49
Şekil.2.10. PKS gen ekspresyon seviyesi normalizasyon denklemi	56
Şekil 2.11. Kültür örneklerinden özüt çıkarma aşaması	57
Şekil 2.12. TLC uygulama aşaması	60
Şekil 2.13. Rf değerlerinin hesaplama denklemi	60
Şekil 3.1. <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 1 örneği aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	61
Şekil 3.2. <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 3 örneği aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	62
Şekil 3.3. <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 1 örneği aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	63

Şekil 3.4. <i>S. aureus</i> suşunun <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 1 örneği aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm grafiği.	63
Şekil 3.5. <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 3 örneği aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	64
Şekil 3.6. <i>S. aureus</i> suşunun <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 3 örneği aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590 nm) grafiği.	64
Şekil 3.7. <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 1 örneği aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	65
Şekil 3.8. <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 3 örneği aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	65
Şekil 3.9. <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 1 örneği aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	66
Şekil 3.10. <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 1 örneği aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590 nm) grafiği.	66
Şekil 3.11. <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 3 örneği aseton özütünün <i>P.aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	67
Şekil 3.12. <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun <i>H. tubulosa</i> Bursa ist. 3 örneği aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590 nm) grafiği.	67
Şekil 3.13. Örneklerin büyümelerinin ve kontaminasyonlarının takibi	68
Şekil 3.14. 3 aylık <i>Hypogymnia tubulosa</i> kültür örneği	68
Şekil 3.15. 24'lük plakada <i>H. tubulosa</i> mikobiyont (mantar ortağı) ve fotobiyont (alg ortağı) büyümesi	69
Şekil 3.16. 24'lük plakada bir kaç aylık <i>H. tubulosa</i> mikobiyont büyümesi	69
Şekil 3.17. <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin tür tayini için PZR ile çoğaltılan ITS bölgesine ait jel görüntüsü	71
Şekil 3.18. Elde edilen dizilerin GenBank'ta bulunan verilerle BLAST programı kullanılarak karşılaştırılması	71
Şekil 3.19. <i>H. tubulosa</i> ITS dizilerinin fasta formatı	72
Şekil 3.20. <i>H. tubulosa</i> örneklerine ait dizilerin BioEdit programı ile çoklu hizalanması	73

Şekil 3.21. <i>Hypogymnia</i> cinsine ait Neighbour - Joining metodu ile oluşturulmuş dendrogram	74
Şekil 3.22. <i>Hypogymnia</i> cinsine ait Maksimum Parsimoni metodu ile oluşturulmuş dendrogram	75
Şekil 3.23. <i>H. tubulosa</i> türüne ait Neighbour - Joining metodu ile oluşturulmuş dendrogram	75
Şekil 3.24. <i>H. tubulosa</i> türüne ait Maksimum Parsimoni metodu ile oluşturulmuş dendrogram	75
Şekil 3.25. <i>H. tubulosa</i> mikobiyontları strese maruz bırakılmak üzere nitrat (a)-nitrat asetat (b), asetat (c), kontrol (d) besiyerlerinde çoğaltılması	76
Şekil 3.26. <i>H. tubulosa</i> mikobiyontlarını içeren besiyerinde renk değişimi	77
Şekil 3.27. 15 ve 30 günlük <i>H. tubulosa</i> mikobiyontlarının büyüme oranı	78
Şekil 3.28. Nitrat-asetat stresinde <i>H. tubulosa</i> mikobiyontlarının büyüme oranı	79
Şekil 3.29. PKS primerleri için PZR şartlarının optimizasyonu	79
Şekil 3.30. H1 ve H2 primerleri ile çoğaltılan PKS bölgesinin jel görüntüsü	80
Şekil 3.31. H1 primeri ile çoğaltılan gen bölgesi ve dizisi	80
Şekil 3.32. H2 primeri ile çoğaltılan gen bölgesi ve dizisi	81
Şekil 3.33. H1 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesinin benzerlik dendrogramı	81
Şekil 3.34. H2 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesinin benzerlik dendrogramı	82
Şekil 3.35. H1 ve referans primeri ile <i>H. tubulosa</i> mikobiyont stres örneklerine kRT-PZR uygulaması	83
Şekil 3.36. H1 ve referans primeri ile 15 ve 30 günlük <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerine kRT-PZR uygulaması sonucu elde edilen gen ekspresyon oranları	83
Şekil 3.37. <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin büyüme ve ekspresyon oranlarının karşılaştırılması	84

Şekil 3.38. H1 ve referans primeri ile strese maruz bırakılan <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerine kRT-PZR uygulaması sonucu elde edilen gen ekspresyon oranları	85
Şekil 3.39. Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin büyüme ve ekspresyon oranlarının karşılaştırılması	85
Şekil 3.40. Sıcaklık-ışık stresine maruz bırakılan <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları	87
Şekil 3.41. Sıcaklık-ışık stresine maruz bırakılan 15 günlük <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları	87
Şekil 3.42. Sıcaklık-ışık stresine maruz bırakılan 15 ve 30 günlük <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları	87
Şekil 3.43. Sıcaklık-ışık stresine maruz bırakılan 15 °C ve 37 °C'de <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları	88
Şekil 3.44. Sıcaklık-ışık stresine maruz bırakılan ışık ve karanlık ortamda <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları	89
Şekil 3.45. Besiyerinde renk değişimi gözlenen <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları	90
Şekil 3.46. <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin nitrat-asetat stresinde H2 primeri kullanılarak belirlenen ekspresyon oranları	91
Şekil 3.47. Sıcaklık-ışık stresine maruz bırakılan <i>H. tubulosa</i> mikobiyont örneklerinin H2 primeri ile ekspresyon oranları	92
Şekil 3.48. Kontrol örneklerinin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	93
Şekil 3.49. H1 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	94
Şekil 3.50. H2 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	94
Şekil 3.51. H3 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	95
Şekil 3.52. H4 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	95

Şekil 3.53. Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan 15 günlük örneklerin 480 µg/ml aseton özütünün 8. Saatte <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması	96
Şekil 3.55. H6 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	97
Şekil 3.56. H7 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	97
Şekil 3.57. H8 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	98
Şekil 3.58. H9 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	98
Şekil 3.59. H10 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	99
Şekil 3.60. H11 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	99
Şekil 3.61. H12 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	100
Şekil 3.62. H13 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	100
Şekil 3.63. H14 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	100
Şekil 3.64. H15 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	101
Şekil 3.65. H16 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	101
Şekil 3.66. Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan örneklerin 480 µg/ml aseton özütünün 8. Saatte <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması	102
Şekil 3.67. HS1 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	102
Şekil 3.68. HS2 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	103

Şekil 3.69. HS3 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	103
Şekil 3.70. Nitrat-Asetat stresine maruz bırakılan 15 günlük örneklerin 480 µg/ml Aseton özütünün 8. Saatte <i>S. aureus</i> suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması	104
Şekil 3.71. HK kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	105
Şekil 3.72. H1 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	105
Şekil 3.73. H2 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	106
Şekil 3.74. H3 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	106
Şekil 3.75. H4 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	107
Şekil 3.76. Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan 15 günlük örneklerin 480 µg/ml aseton özütünün 8. Saatte <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması	107
Şekil 3.77. H5 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	108
Şekil 3.78. H6 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	108
Şekil 3.79. H7 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	109
Şekil 3.80. H8 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	109
Şekil 3.81. H9 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	110
Şekil 3.82. H10 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	110

Şekil 3.83. H11 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	111
Şekil 3.84. H12 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	111
Şekil 3.85. H13 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	112
Şekil 3.86. H14 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	112
Şekil 3.87. H15 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	113
Şekil 3.88. H16 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	113
Şekil 3.89. Doğa örneğinin 240 µg/ml, sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan örneklerin 240 ve 480 µg/ml aseton özütünün 8. Saatte <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması	114
Şekil 3.90. HS1 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	114
Şekil 3.91. HS2 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	115
Şekil 3.92. HS3 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi	115
Şekil 3.93. Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan örneklerin 240 ve 480 µg/ml aseton özütünün 8. Saatte <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması	116
Şekil 3.94. HK kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	117
Şekil 3.95. H1 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	117
Şekil 3.96. H2 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	118

Şekil 3.97. H3 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	118
Şekil 3.99. H5 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	119
Şekil 3.100. H6 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	120
Şekil 3.101. H7 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	120
Şekil 3.102. H8 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S.aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	121
Şekil 3.103. H9 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	121
Şekil 3.104. H10 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	122
Şekil 3.105. H11 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	122
Şekil 3.106. H12 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	123
Şekil 3.107. H13 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	123
Şekil 3.108. H14 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	124
Şekil 3.109. H15 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	124
Şekil 3.110. H16 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	125
Şekil 3.111. Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan örneklerin aseton özütlerinin <i>S. aureus</i> suşunun biyofilm formu üzerine anti-biyofilm etkilerinin karşılaştırması	126
Şekil 3.112. HS1 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S. aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	126

Şekil 3.113. HS2 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S.aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	127
Şekil 3.114. HS3 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>S .aureus</i> suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	127
Şekil 3.115. Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan örneklerin aseton özütlerinin <i>S. aureus</i> suşunun biyofilm formu üzerine antibiyofilm etkilerinin karşılaştırması	128
Şekil 3.116. HK kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	129
Şekil 3.117. H1 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	129
Şekil 3.118. H2 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	130
Şekil 3.119. H3 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	130
Şekil 3.120. H4 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	131
Şekil 3.121. H5 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	131
Şekil 3.122. H6 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	132
Şekil 3.123. H7 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	132
Şekil 3.124. H8 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	133
Şekil 3.125. H9 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	133
Şekil 3.126. H10 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	134
Şekil 3.127. H11 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	134

Şekil 3.128. H12 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	135
Şekil 3.129. H13 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	135
Şekil 3.130. H14 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	136
Şekil 3.131. H15 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	136
Şekil 3.132. H16 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	137
Şekil 3.133. Sıcaklık-ışık stresine maruz bırakılan örneklerin aseton özütlerinin <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun biyofilm formu üzerine antibiyofilm etkilerinin karşılaştırması	138
Şekil 3.134. HS1 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	138
Şekil 3.135. HS2 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	139
Şekil 3.136. HS3 kodlu örneklerin aseton özütünün <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği	139
Şekil 3.137. Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan örneklerin aseton özütlerinin <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun biyofilm formu üzerine antibiyofilm etkilerinin karşılaştırması	140
Şekil 3.138. Referans maddelerin TLC görüntüsü	141
Şekil 3.139. H ₂ SO ₄ ile yakma işlemi yapılarak tespit edilen maddelerin TLC görüntüsü	142
Şekil 3.140. UV ile tespit edilen maddelerin TLC görüntüsü	142
Şekil 3.141. UV ile tespit edilen maddelerin TLC görüntüsü	142

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Laboratuarda kullanılan cihazların adı, modeli ve kullanım amaçları	30
Tablo 2.2. Liken örneklerinin toplandığı istasyonlara ait bilgiler	34
Tablo 2.3. Tür tayininde kullanılan ITS bölgesine uygun primerler	42
Tablo 2.4. GenBank'tan indirilen ITS bölgesi dizilerine ait GenBank erişim numaraları	44
Tablo 2.5. Nitrat ve asetat stres koşulları	46
Tablo 2.6. Sıcaklık ve ışık stres koşulları	48
Tablo 2.7. Kullanılan örneklere ait bilgiler ve GenBank erişim numaraları	49
Tablo 2.8. <i>H. tubulosa</i> PKS bölgesini çoğaltmak için dizayn edilen primerler	50
Tablo 2.9. GenBank'tan indirilen PKS bölgesi dizilerine ait GenBank erişim numaraları	52
Tablo 3.1. <i>H. tubulosa</i> mikobiyont kültür örneklerinde kontaminasyon oranı	70
Tablo 3.2. Pasaj geçilen örneklerde besiyerinde gözlenen renk değişimi	76
Tablo 3.3. Nitrat-asetat stresi örneklerinin kRT-PZR sonunda gözlenen Ct değerleri	84
Tablo 3.4. Sıcaklık-ışık stresi örneklerinin H1 primeri ile kRT-PZR sonunda gözlenen Ct değerleri	86
Tablo 3.5. Nitrat-asetat stresi örneklerinin H2 primeri ile kRT-PZR sonunda gözlenen Ct değerleri	91
Tablo 3.6. Sıcaklık-ışık stresi örneklerinin H2 primeri ile kRT-PZR sonunda gözlenen Ct değerleri	92

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Günümüzde insanlar çeşitli hastalıkların tedavisinde özellikle bitkileri ya da onlardan elde ettikleri doğal ürünleri tüketmek istemektedir. Bu nedenle sentetik ilaçlar yerine doğal ürünlerden elde edilen ilaçlar tercih edilmektedir. Modern ilaç endüstrisi hastalıklara karşı birçok bitkiyi ilaç yapımında kullanmaktadır. İlaç üretiminde yan etkilerinin daha iyi bilinmesi ve birkaç etkiye birden sahip olmaları gibi özelliklerinden dolayı bitkisel droglar tercih edilmektedir. Özellikle yurt dışından ilaçların veya ilaç hammaddelerinin alınması oldukça yüksek maliyetli olduğu için ekonomik açıdan tercih edilmemektedir. Buna bağlı olarak, birçok ilaç firması bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin geliştirilmesi için önemli yatırımlar yapmaktadır.

Tıp tarihiyle ilgili kaynaklar, insanların çok eski zamanlardan beri hastalıkların iyileştirilmesinde çeşitli bitkilerden olduğu gibi likenlerden de yararlandıklarını göstermektedir [1-4]. Metabolizmalarının doğal bir ürünü olarak meydana getirdikleri kendilerine özgü sekonder metabolitler; tıptan, eczacılığa; boya endüstrisinden, besin endüstrisine kadar birçok alanda likenlerin kullanımlarına imkân sağlamaktadır [3,5]. Likenlerin iyileştirici güçlerini belirlemek için, etken maddeler hakkında bilgi sahibi olmak en önemli aşama olarak değerlendirilmektedir. Ancak likenlerin doğada olduğu kadar laboratuvar ortamında da oldukça yavaş büyüyen organizmalar olması nedeniyle etken madde elde edilmesi açısından bitkilere oranla daha sınırlı bir materyal kaynağı oldukları düşünülmektedir [6]. Bitkisel etken maddelerin eldesinde belirli miktarlarda kuru örneğe ihtiyaç duyulmaktadır. Likenlerden çok miktarlarda toplamak üstelik endüstriyel anlamda kullanmak için uygun miktarı bulmak oldukça zor olmaktadır. Ayrıca doğada az görülen bazı liken türlerini korumak ve yayılışı fazla olan türleri de bilinçli tüketmek gerekmektedir. Bu nedenlerle son yıllarda alternatif yaklaşım olarak liken maddelerinin daha hızlı büyüyen farklı canlılarda *in vivo* şartlarda çoğaltılması gerekliliği ifade edilmektedir.

Bu yaklaşımla likenlerde sekonder metabolitlerin sentezlenmesinde etkili olan poliketid sentez genlerinin (PKS) belirlenmesi ve bu genlerin başka bir canlıya aktarılmasıyla etken maddenin salgılatılması yoluna gidilmesi planlanmaktadır [6-8].

İlaç keşfi ve biyolojik aktivite için potansiyele sahip önemli liken türlerinin sekonder metabolitlerinin üretilmesine katkıda bulunmak hedefiyle çeşitli liken etken maddelerinin sentezlenmesinde görevli poliketid sentez genlerinin ekspresyonunun kRT-PZR ile ölçülmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çevresel şartlardaki değişimlerin likenlerde stres meydana getirdiği ve strese yanıt olarak liken sekonder metabolitlerinin sentezinde değişiklikler olduğu bildirilmektedir [8]. Bu bilgiden yola çıkarak çalışmamızda stres koşullarının sekonder metabolit sentezinde görevli genlerin ekspresyonuna etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Aynı zamanda, TLC yöntemi ile hem bölgesel lokasyon hem de yetiştirme şartlarındaki (doğal ve kültür koşulları) farklılıkların liken türlerinin içerdiği sekonder metabolit çeşitliliğine ve metabolit konsantrasyonuna etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması liken etken maddelerinin daha hızlı ve daha fazla salgılatılması amacıyla liken örneklerinin kültür ortamında çoğaltılması, büyütülmesi, sekonder metabolitlerin sentezlenmesinde etkili olan poliketid sentez genlerinin ekspresyonu ve etken maddelerin kültür şartlarında ürettirilmesi alanında Türkiye’de yapılmış ilk çalışmadır. Yine *Hypogymnia tubulosa* türünün poliketid sentez genlerinin ve stres koşullarında gen ekspresyonundaki değişimin belirlenmesi açısından dünya literatüründeki ilk çalışmadır.

1.1. Likenlerle İlgili Genel Bilgiler

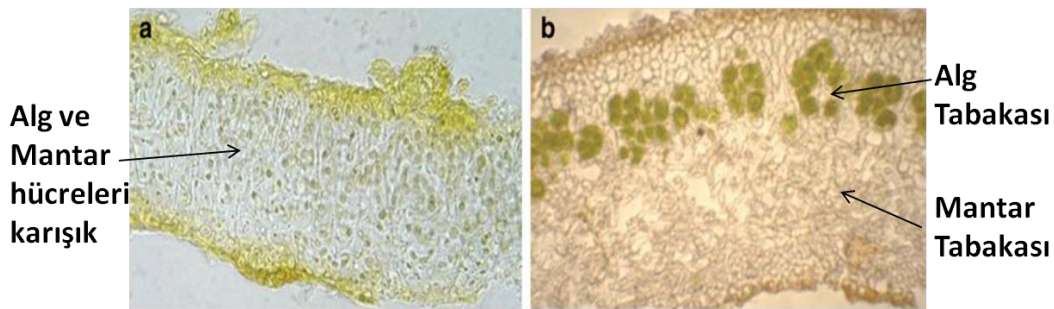
Likenler, alg “fotobiyont” ve mantar “mikobiyont” hücrelerinin simbiyotik (birbirine fayda sağlayan) ortaklıkları sonucu oluşan, kendini oluşturan organizmaların morfolojik ve fizyolojik ilişkileri sonucu farklılaşmış özelliklere sahip organizmalar olarak tanımlanmaktadır [6]. Bir likenin sınıflandırılmasında ve üremesinde mantar bileşeni etkili olduğundan, bazı araştırmacılar tarafından “likenleşmiş mantarlar (lichenized fungi)” olarak da isimlendirilmektedirler [6].

1.1.1. Likenlerin yapısı

Liken tallusunda (gövde), aynı anda en az bir türü bulunan mantar hücreleri mikobiyontu, yeşil alg (*Chlorophyta*) ve mavi-yeşil alg (*Cyanobacteria*) hücreleri ise fotobiyontu oluşturmaktadır. Likenleşen mantar taksonlarının çoğunluğu *Ascomycetes* sınıfından olmakla birlikte, *Basidiomycetes* veya *Deuteromycetes* sınıflarında yer alan

pek çok liken taksonu da bulunmaktadır [6,9-11]. Likenlerde yaklaşık 40 cins fotobiyont ortağı yer almaktadır. Bunlardan 25 tanesi yeşil alg ve 15 tanesi ise mavi-yeşil alg cinsinden oluşmaktadır [12]. Ökaryotik yeşil alglerden en sık *Trebouxia* cinsi fotobiyont oluşturmaktadır. *Arthoniales*, *Gyalectales* ve *Sphaeriales*'deki liken cinslerinde ise daha çok *Trentepohlia* bulunmaktadır. Bununla birlikte siyanobakteriyel fotobiyont içeren likenlerde en fazla *Nostoc* cinsi tespit edilmiştir. Ancak mikobiyontun birkaç farklı alg türü ile aynı liken türünü oluşturabildiği de bilinmektedir [13].

Likenlerin yapısında bulunan alg ve mantar hücrelerinin tallus içinde dağılımı, ortakların karşılıklı tepkilerine ve dış çevreye adaptasyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir [14]. Alg ve mantar hücrelerinin tallus içinde homojen dağıldığı, tabakalaşmanın görülmediği tallus yapısı homeomerik tallus olarak adlandırılmaktadır. Çoğunlukla mavi-yeşil algleri içeren likenler bu tip tallusa sahiptirler ve daha ilkel olarak kabul edilmektedirler. Alglerin üst korteks ve medulla arasında gonid tabakası oluşturduğu ve mantarların medullada dağıldığı belirgin bir tabakalaşmanın görüldüğü tallus tipi ise heteromerik tallus olarak nitelendirilmektedir ve bu tip tallusa sahip likenler daha gelişmiş olarak kabul edilmektedirler (Şekil 1.1) [6,9,15]. Gelişmiş birçok liken, dışta alg hücrelerini çeviren bol jelâtinli, çift çeperli ve birbirine sarılı hiflerden oluşan korteks tabakası içermektedir. Alg tabakasının altında kalın çeperli mantar hiflerinden meydana gelen ve tallusun büyük kısmını oluşturan medulla tabakası görülmektedir. Bazı likenlerde ise alt korteks tabakası ve substrata (yaşam yüzeyi) tutunmayı sağlayan rizinler (kök benzeri hif uzantıları) bulunmaktadır [16].



Şekil 1.1. Liken tallusunun anatomik yapısı [15]

a) homeomerik tallus b) heteromerik tallus

Likenlerde alg ve mantarlar hücrelerinin dağılımı ve anatomik farklılıklar morfolojik açıdan da çok fazla çeşitlilik ortaya çıkarmaktadır. Tallus morfolojik yapılarına göre likenler [6,10]:

Kabuksu (*crustose*) likenler: Zor habitat koşullarına karşı dayanıklı medulla ile substrata sıkıca tutunan likenlerdir.

Pulsu (*squamulose*) likenler: Pullar şeklinde küçük loblar halinde tallusa sahip likenlerdir

Yapraksı (*foliose*) likenler: Substrata alt korteks ve rizinleri ile gevşek olarak tutunan, geniş loblar halinde tallusa sahip likenlerdir.

Dalsı (*fruticose*) likenler: Substrata tek bir noktadan tutunarak sarkan veya çalimsı biçimde dik duran ipliksi veya şerit şeklinde tallusa sahip likenlerdir.

1.1.2. Likenlerin yayılışı

Likenlerin tamamına yakını karasal alanlarda yayılış göstermektedir. Sadece birkaç liken türü tatlı su akıntılarında ve denizlerin gelgit etkisinde kalan yönünde yayılmaktadır. Likenler kutup enlemlerinde veya aşırı yüksekliklerde (7,400 m'ye kadar) [17] oldukça çeşitli ve bazen sıradışı ekolojik ortamlarda büyüebilmektedirler, genellikle yaşam alanlarına renkli bir yön katmaktadırlar. Lindsay (1856), yerkürenin başlangıcında, herhangi bir toprak oluşmadan önce, likenlerin ilk toprak toplulukları olması gerektiğini ancak bu konuyla ilgili farklı görüşlerin olduğunu ifade etmektedir [18]. Yavaş büyüme gösteren likenlerin kayaların üzerinde kolonize olarak salgıladıkları zayıf asitlerle uzun zaman içinde toprak oluşumunu sağladığı bilinmektedir. Bu özellikleri ile ekolojik süksesyonda öncü organizmalardır. Bununla birlikte beyazdan sarı, turuncu, kırmızı, yeşil, gri, kahverengi ve siyaha kadar çok çeşitli renkleriyle ağaçların, diğer bitkilerin, toprak ve kayaların yüzeyinde hatta insan yapımı çeşitli substratlar üzerinde tutunarak yaşam sürdükleri gözlenmektedir. Tropiklerden subtropiklere kadar yayılış gösteren bazı likenlerin 1000 yıl hayatta kalabildiği tespit edilmiştir [6,19].

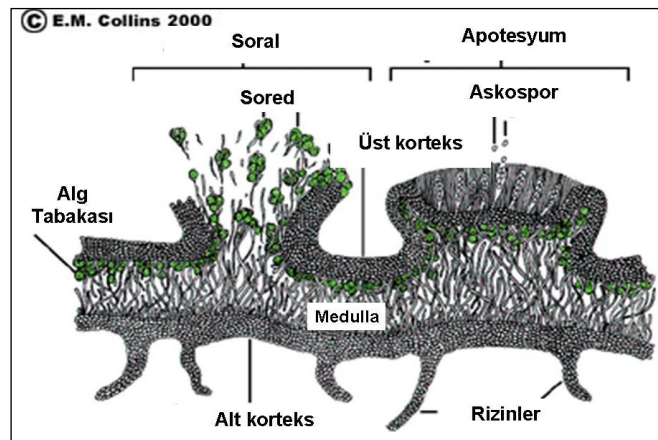
Likenler üzerinde yaşadıkları substrata göre farklı adlandırılmaktadırlar. Taş, kaya duvar, beton vs. üzerinde gelişenlere saksikol likenler; bitkiler ve bitki kısımları üzerinde gelişenlere epifitik likenler; toprak üzerinde gelişenlere terrikol likenler; bir başka liken üzerinde gelişenlere likenikol likenler; karayosunları üzerinde gelişenlere ise musikol likenler adı verilmiştir [6,10].

Likenler iklimin uzun vadeli etkileri, mikroiklime ilişkin yerel değişiklikler ve çeşitli alt katmanla ilişkili faktörler olarak kaya türü, kabuk veya toprak tipi, substrat

kimyası, kuşların besin zenginleştirme derecesi, tuzluluk veya kirlilik gibi birçok çevresel faktörden etkilenmektedir [20,21]. Bununla birlikte, likenler hava kirliliğine olan farklı duyarlılıkları nedeniyle biyoindikatör ve biyomonitör olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar [22-24]. Büyüme oranı ve liken boyutu türlere bağlı olarak 1 mm²'den az olanlarından 2 m uzunlukta olanlara kadar değişebilmektedir [6,10].

1.1.3. Likenlerin üremesi

Likenlerde üreme, sporlarla veya vegetatif olarak tallus parçalarıyla gerçekleşmektedir. Eşeyssiz üreme daha sık görülmektedir. Eşeyssiz üreme vegetatif olarak sored (alg ve onu saran mantar hücrelerinin oluşturduğu granüller) veya izid (alg ve mantar hücrelerini içeren korteks tabakası ile kaplı uzantılar) gibi tallus uzantıları ve eşeyssiz konidiosporlarla sağlanmaktadır [6,10,25]. Eşeyli üreme ise mantar ortağı tarafından üretilen askosporlarla sağlanmaktadır (Şekil 1.2). Askosporlar fruktifikasyonları adı verilen üreme yapılarında yer almaktadır. Tallusa gömülü fruktifikasyonlar peritesyum; tallus yüzeyindekiler ise apotesyum olarak adlandırılmaktadır. Fruktifikasyonlar himenyum, epitesyum ve hipotesyum olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Askosporları içeren askus keseleri ve askusların etrafındaki parafiz denilen steril filamentler himenyum tabakasını oluşturmaktadır. Himenyumun üstünde parafiz uçlarından oluşan tabaka epitesyum, himenyum altında mantar hiflerinden oluşan tabaka ise hipotesyum adını almaktadır [6,10,25]. Askosporların çimlenmesiyle gelişen miselyumun alg hücrelerini sarmasıyla yeni bir liken meydana gelmektedir.



Şekil 1.2. Likenlerde üreme yapıları [26].

1.1.4. Likenlerin fizyolojisi ve simbiyoz yaşam

Likenin yapısında bulunan mikobiyont ve fotobiyont hücreleri fizyolojik paylaşım ile birbirlerinden fayda sağladıkları simbiyoz bir yaşam sürdürmektedirler. Likenlerin bu simbiyotik beraberlik sonucunda meydana geldiği ilk kez 1867 yılında Schwendener tarafından ortaya atılmıştır. Pek çok bilim adamı bu birlikteliği fotobiyont hücrelerinin fotosentez yoluyla besin ürettiği; mikobiyont hücrelerinin ise su ve mineral maddeleri temin ettiği karşılıklı fayda sağlanan simbiyoz yaşam (mutualistik) olarak nitelirmektedir. Ancak Ahmadjian, (1982) bu birlikteliği kontrollü parazitlik olarak tanımlamaktadır. Mikobiyontun daima fotobiyonttan besin sağlamasını parazitlik olarak değerlendirmektedir [9]. Ancak likenleşmek fotobiyont açısından da yarar içermektedir [6,9,27]. Ortaklar ayrı halde iken çok ender veya hiç olamayacakları yerlerde liken halinde yayılabilmektedirler. Örneğin, çoğu serbest-yaşayan algler ve siyanobakteriler likenin parçası olduklarında daha kuru ortamlarda da yaşayabilmektedirler. Ayrıca mantar hücreleri fotobiyontun maruz kaldığı ışık şiddetini de azaltarak kuruma tehlikesini önlemektedir. Böylece yüksek ışıklı çevrelere yayılmalarına imkân sağlamaktadır. Mantar ortağı yönünden bakılırsa, besin üretmenin yanında siyanolikenlerde fotobiyont nitrojen fiksasyonu yaparak mikobiyont için nitrojen de sağlamaktadır, öyle ki ana partneri yeşil alg olan likenlerde dahi tallusdaki belirli bölgelerde mavi-yeşil alg ortaklı olanları çoktur [6,9,27]. Ayrıca yavaş gelişen mikobiyontun serbest yaşam durumunda diğer mantarlarla rekabet etmeleri ve hayatta kalmaları zorlaşmaktadır. Sonuç olarak mikobiyontlar çoğu zaman zorunlu likenleşmektedir [6,9].

1.1.5. Likenlerin sistematik tarihçesi ve sınıflandırılması

Yeryüzündeki karasal habitatların ilk kolonizatörleri muhtemelen likenlerdir; fosil kayıtları 400-600 milyon yıl öncesine kadar uzanmaktadır [28-30]. Theophrastus, ilk defa M.Ö. IV. yüzyılda “Lichen” sözcüğünü kullanmaktadır. Carolus von Linneaus ise “Species Plantarum” adlı eserinde 80 liken türünü tek bir “Lichen” cinsi altında toplayarak liken nomenklatürünü başlatmaktadır [6]. Ancak ilk uygun liken sınıflandırmasını gerçekleştiren Erich Acharius “liknolojinin babası” olarak kabul edilmektedir [31-32]. İlerleyen süreçte likenler mantar sistemi içinde likenleşmiş mantarlar (“lichenized fungi”) olarak diğer mantarlardan (“non-lichenized fungi”) ayrı

bir grup kabul görmektedir [6].

Dünya çapındaki likenlerin tür sayısı yaklaşık 28.000 takson olarak tahmin edilmektedir [33]. Mantar bileşeninin daha baskın olmasından dolayı mantarlar âlemi içinde sınıflandırılan likenler tüm mantarlar içinde % 20 orana sahiptir. Ascomycetes sınıfına ait mantarlardan da % 40 kadarı, yaklaşık 13500 tür likenleşmiş mantarlardan oluşmaktadır [6,27,34].

Evrimsel (geleneksel) metoda göre Tehler ve Wedin (2008) tarafından oluşturulan likenleşmiş mantarlarla ilgili son sınıflandırmaya göre Ascomycota filumuna (şube) ait 3 sınıf, 7 alt sınıf, 14 takım ve bu takımlara ait toplam 72 familya; Basidiomycota filumuna ait ise 1 sınıf, 1 takım ve 1 familya ile 20 türü olan tek bir cins bulunmaktadır. Bunun yanında özellikle cins ve familya düzeyinde sistematik yeri kesinleşmemiş taksonlar da vardır [6]. Günümüz moleküler teknikleri sınıflandırmaya önemli katkılar sağlamaktadır [6,35,36].

Liken türlerinin ikili adlandırmasında mantarlara ait isimler kullanılmaktadır, adlandırma ise Uluslararası Botanik İsimlendirme Kodu (International Code of Botanical Nomenclature-Code) ile kararlaştırılmaktadır [25,36].

Liken sekonder metabolitleri ayrıca sınıflandırma ve tür tayininde (identifikasyon) ayırt edici role sahiptir [37,38]. Bu maddeler türlerin, tür altı kategorilerin ve kemotiplerin sistematik analizlerinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte türlerin filogenetik ayrımında genetik sekonder metabolitlerin sentezlenmesinde etkili genler de tercih edilmektedir [39-42].

1.1.6. Likenlerin kullanım alanları

Liken türlerinin etno-likenolojik kullanımlarının yanında, potansiyel biyolojik aktiviteleri güncel bilimsel çalışmalarla tespit edilmektedir [43]. Doğada ise likenler diğer canlılar tarafından besin (insanlar, geyik, keçi, salyangoz vb. gibi) ya da barınak (böcek, kuş yuvası gibi) olarak kullanılmaktadır. Likenlerin mantar hücreleri tarafından üretilen likene-özümlü sekonder metabolitlerin tıp alanında, eczacılık ve ilaç sektöründe, boya maddesi üretiminde veya parfüm, pudra vb. kozmetik ürünlerinin içeriğinde, besin endüstrisinde vb. birçok endüstriyel alanda kullanıldıkları bilinmektedir [5,40,44-48]. Kırmızı turnusol kağıdı, orsey boyası ve etil alkol üretilmesi, ekmek unu elde edilmesi

ve develerin besini olarak tercih edilmesi, maket, çelenk gibi dekoratif ürünlerin tasarlanmasında yararlanılması likenlerin kullanımlarına örnek olarak gösterilmektedir [5,43,49]. Son yıllarda özellikle tıpta ve eczacılık alanında sekonder metabolitlerin kullanımı artış göstermektedir. Bilimsel çalışmalar likenlerin antibakteriyel, antifungal, antioksidan, anti-inflamatuar, antiviral, anti-ülser, sitotoksik, antikanser, antiproliferatif, apoptotik, analjezik, anti-allerjen, antiplatelet, antitrombotik, anti-genotoksik, antimutajenik, antiprotozoal, antiherbivor, bitki büyüme inhibitörü, enzim inhibitörü vb. birçok biyolojik etkinliklerini ortaya koymaktadır [1,3,8,43,44,50-55].

1.1.6.1. Likenlerin ilaç olarak kullanımı

Biyolojik organizmalar içerisinde incelenen likenler antik çağlardan beri tıbbi özellikleri itibarıyla değerlendirilmektedir [56]. Özellikle ılıman ve kutup bölgelerindeki kültürler tarafından geleneksel ilaçlarda kullanılmaktadır Dünyada ve ülkemizde çok eski zamanlardan beri halk hekimliğinde birçok hastalığı tedavi etmek için yararlanılmaktadır [1-4]. Geleneksel tıptaki likenler, yaralar, deri rahatsızlıkları, solunum ve sindirim sorunları ile obstetrik ve jinekolojik kaygıların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [56]. Afrika'da, Avrupa'da, Asya'da, Okyanusya'da, Kuzey Amerika'da ve Güney Amerika'da kültürlerde likenlerin tıbbi kullanımının kayıtları bulunmaktadır [56]. Avrupa'daki likenlerin tıbbi kullanımının kökenleri, M.Ö. 4. ve 3. yy. Antik Yunan bilim adamları Hipokrat ve Theophrastus'a kadar gitmektedir [6,56]. Bitkisel tedavinin çok yaygın olduğu Çin tıbbi gibi tamamlayıcı tedavilerde ve büyük bilgilerin eserlerinde *Bryoria*, *Evernia*, *Lobaria*, *Parmelia*, *Peltigera*, *Usnea*, *Xanthoria* cinslerine yer verilmektedir. Bu türlerin tıbbi önemlerine dair açıklayıcı bilgiler de verilmektedir [1-4,43,57,58]. Örneğin halk tarafından pek çok *Cladonia* türünün akciğer hastalıklarının ve tüberküloz hastalığının iyileştirilmesinde etkili olduğu kaydedilmiştir. *Usnea* cinsinin ağrı kesici ve ateş düşürücü etkilerine yer verilmiştir. Bununla birlikte *Usnea*'dan elde edilen usnik asidin güçlü bir antibiyotik olduğu da belirtilmektedir [59]. *Ramalina thrausta* türünün yara tedavisinde, mantar ve deri hastalıklarının iyileştirilmesinde, boğaz ve diş ağrısında etkili olduğu bilinmektedir [60]. Yine Kuzey Avrupa'da *Cetraria islandica* türünün öksürük ve nezle tedavisinde çay şeklinde kullanıldığı kaydedilmiştir [6].

1.1.6.2. Likenlerin antimikrobiyal, anti-quorum sensing, antibiyofilm etkisi

Hastalıkların önlenmesinde kullanılan likenlerin iyileştirici özelliklerinin, yapılarında bulunan sekonder bileşiklerden (asitlerden) kaynaklandığı bilinmektedir. Örneğin *Cladonia*, *Evernia*, *Cetraria*, *Usnea*, *Alectoria*, *Ramalina* cinslerinden bazı antibiyotikler elde edilmektedir. Literatürde protolikesterinik asit, pulvinik asit, evernik, olivetorik asit, giroforik asit, fisodik asit, lobarik asit, fumarprotosetrarik asit ve usnik asitin antimikrobiyal özelliğe sahip olduklarına yer verilmektedir [1]. Manojlavic ve ark. (2013) tarafından *Evernia prunastri* ve *Pseudevernia furfuracea* liken türlerine ait özütlerin *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *B. mycoides* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine karşı antibakteriyel etkileri tespit edilmiştir [61]. Evosin maddesinin Gram pozitif koklara, *Mycobacterium tuberculosis* (verem basili) ve *Corynebacterium diphtheria* (difteri basili) suşlarına karşı etkisi bilinmektedir. Ingolfssdottir ve ark. (1997) tarafından *Cetraria islandica*'dan elde edilen sekonder metabolit protolikesterinik asitin *Helicobacter pylori* üzerinde antimikrobiyal etkisi ortaya çıkarılmıştır [62]. Liken maddelerinin çoğunlukla Gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğu düşünülmektedir. Ancak pek çok araştırmada liken sekonder metabolitlerinin Gram negatif bakterilere karşı da antimikrobiyal etkileri kaydedilmiştir [61-66]. Örneğin, Açıkgöz ve ark. (2013) tarafından *Cladonia convoluta* kloroform özütünün Gram negatif *E. coli* suşu üzerinde yüksek antimikrobiyal etkisi olduğu tespit edilmiştir [52].

Packiavathy ve ark. (2011), bakteriyel patojenler arasında antibiyotik direncinin artması ve antibiyotiklerin etkisinin azalmasından dolayı, bakteri enfeksiyon tedavisinde yeni tedavi yollarına ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir [67]. Araştırmacılar birçok tıbbi vakanın oluşmasında bakterilerin oluşturduğu biyofilmin önemli rol oynadığını bildirmektedirler. Amerika'da bulunan Hastalıkları Koruma ve Kontrol Merkezleri hastane enfeksiyonlarının % 65'inin biyofilmler tarafından meydana geldiğini belirtmektedir. Geliştikleri biyofilm modeli içerisinde yaşayan türlerin, aynı türe ait planktonik türlere göre antibiyotik direncini 1000 kata kadar fazla arttırabildikleri gözlenmiştir [68]. Örneğin, çoğunlukla toprak ve suda bulunan Gram (-), çubuk şekilli, *P. aeruginosa*'nın, özellikle immün yetersizliği olan hastalarda solunum ve idrar yollarının, yanıkların ve açık yaraların fırsatçı patojeni olduğu ve kanda enfeksiyona ve

ciltte dermatite sebep olabildiği bilinmektedir. *P. aeruginosa*, son yıllarda artan etki alanı, ürettikleri virülans faktörlerinin farklılığı ve sürekli artış gösteren antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır [69]. Gram pozitif *S. aureus* ise *Staphylococcaceae* familyasından insan cilt florasında kommensal olarak da bulunabilen hastane enfeksiyonu etkeni bir bakteri türüdür [70]. *S. aureus* suşlarının da hastane ortamında antibiyotiklere karşı direnç kazanarak yok edilmesinin zorlaştığı bilinmektedir. Bu bakterilerin biyofilm oluşturarak, klor gibi çeşitli kimyasallara ve elektrik akımı, ultrases gibi fiziksel dezenfektanlara ve çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği ve ortamdaki uzaklaştırılmasının zorlaştığı bilinmektedir.

Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesinde ilk aşama, biyofilm oluşmadan önce gerekli tedbirlerin alınması olarak belirtilmektedir. Yeni bir yaklaşım ise, bakteriyel büyüme devam ederken hücreler arasındaki haberleşmenin engellenmesi şeklindedir. Çünkü biyofilm oluşumunun en önemli sebebinin, bakterilerin kendi popülasyonlarının içinde algılama ve cevaplama kabiliyeti olarak tanımlanan “hücre-hücre etkileşimi” veya “quorum sensing (QS)” yardımıyla oto-indükleyici (autoinducer) moleküller tarafından gerçekleştirilen iletişim sonucu oluşan bakteriyel patogeneze olduğu belirtilmektedir [71]. Bu nedenle, dezenfeksiyon işlemi sırasında bakterilerin etkilerinin azaltılması veya yok edilmesinin yanı sıra bakterilerin biyofilm oluşturmalarını önleyici anti-QS özelliğe sahip, doğa ile dost ve insanlara zarar vermeyen biyolojik materyallerden elde edilen dezenfektanların kullanılmasının önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bu bağlamda antimikrobiyal madde olarak ilk test edilen ve en çok öne çıkan liken maddesi, dirençli *Staphylococcus* suşlarına karşı dahi etki gösterdiği bilinen ve pek çok liken türünde bulunan usnik asit olmuştur [72,73]. Usnik asitin antimikrobiyal etkisinin yanında anti-QS ve antibiyofilm etkileri de ortaya çıkarılmaktadır [74]. Nithyanand ve ark. (2015) liken sekonder metabolitlerinden olan usnik asidin *Streptococcus pyogenes* bakteri türü üzerinde hem antibakteriyel aktivite gösterdiğini hem de bakterinin biyofilm formunu inhibe ettiğini rapor etmektedir [75]. Riedel ve ark. (2008) tarafından gerçekleştirilen ilk çalışmalarda ise lakton liken bileşiklerine odaklanmış ve protolikastinik asidin, *P. aeruginosa* ve *Burkholderia cenocepacia*'nın iletişim sistemleri ile etkileşime girdiğini ortaya koymuştur [76]. Yine *Platismatia glauca* ve *P. furfuracea* türlerinin farklı çözücülerle elde edilmiş özütlerinin

antibiyofilm etkisi tespit edilmiştir [77]. Zeaksantin, atranorin, fumarprotosetrarik asit ve usnik asit biyofilm önleyicileri olarak rapor edilmiştir ve araştırılmaya devam edilmektedir. [78-80]. Görüldüğü gibi antibakteriyel etkinliği yüksek likenlerin, QS (Quorum Sensing) sinyal mekanizmasının bloke edilmesi yoluyla biyofilm tabakasının oluşumunun engellenmesi için yeni etken maddelerin geliştirilmesinde iyi bir alternatif olabileceği açıktır. Ancak liken türleri ve sekonder metabolitleri ile ilgili henüz yeni başlamış olan bu alandaki çalışmalar oldukça sınırlıdır.

1.2. Liken Kültür Uygulamaları ve Son Gelişmeler

Dünyada likenler, mantarlarla fotosentetik alg veya siyanobakteriler arasındaki en yavaş büyüyen simbiyotik yaşam birliğini oluşturmaktadır. Likenler kendilerine özgü geniş bir sekonder metabolit dizisi üretmektedirler. Sekonder liken metabolitlerinin birçoğu, çok düşük konsantrasyonlarda, çeşitli biyolojik aktivitelerde belirgin inhibisyon gösterebilmektedir. Ancak günümüzde, sadece az sayıda liken ve bileşikleri biyolojik önemleri açısından test edilmiştir ve halen test edilmek için çok daha fazlası bulunmaktadır. Umut verici sonuçlar sergileyen bu bileşiklerin derinlemesine çalışmaları da dahil olmak üzere bu alandaki araştırmaların genişletilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Endüstriyel ve tıbbi açıdan pek çok alanda faydalanılan likenlere özgü sekonder metabolitler her geçen gün biraz daha önem kazanmaktadır. Likenlerin iyileştirici güçlerini belirlemek için, etken maddeler hakkında bilgi sahibi olmak en önemli aşama olarak değerlendirilmektedir. Liken esaslı ilaç tedavileri ve ardından bu bileşiklerin en iyilerinin büyük ölçekli üretimi konusunda da güçlü bir odaklanma gerekmektedir [81]. Ancak likenlerin doğada oldukça yavaş büyüyen organizmalar olması nedeniyle etken madde elde edilmesi açısından bitkilere oranla daha sınırlı bir materyal kaynağı oldukları da göz önüne alınmalıdır [6]. Birçok likenin doğadan istenilen miktarlarda toplanması mümkün olmamaktadır. Bu sebepten endüstriyel anlamda kullanmak için uygun miktarı bulmak bazı liken türleri bakımından oldukça zordur. Bu nedenlerle son yıllarda likenlerin kültür ortamında laboratuvar koşullarında çoğaltılması ve mümkün olursa doğadakine oranla daha hızlı ve daha fazla miktarda üretilmeleri alternatif yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır.

Liken maddelerinin ticari olarak kullanılması için, doğal olarak yetişen tallusa ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bu durum yüksek miktarda doğal liken örneğinin yok

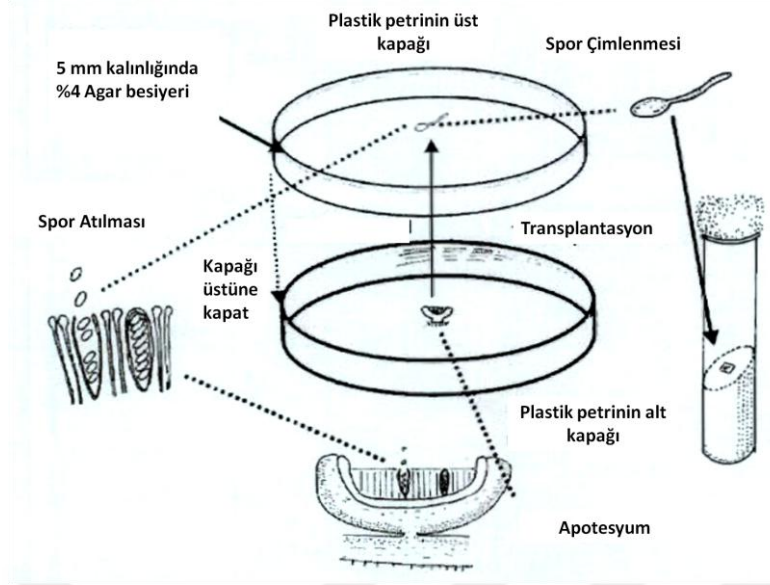
edilmesine sebep olmaktadır. Korunan alanlardaki liken popülasyonunun düşüşünü önlemek için, akla getirilebilecek tek alternatif liken örneklerinin *in vitro* kültürde çoğaltılmasıdır [82]. Liken *in vitro* kültürü, liken metabolitlerinin biyosentetik yollarını ve üretim için gerekli olan koşulları araştırmak için önemli bir araç olarak değerlendirilmektedir [82]. 1970'lerden beri, deneysel likenoloji, kültür koşullarının iyileştirilmesi ve optimizasyonu üzerine yoğunlaşmaktadır [83]. Thomas, (1939) *Cladonia pyxidata*'nın ilk kez yeniden çoğaltıldığını rapor etmektedir [84]. Ahmadjian, (1961)'de kültür tekniklerinde bazı değişiklikler yapmıştır [85]. Ancak, bütün liken tallus kültürü çok zordur ve pek çok problem çözülememiştir. Çok az sayıda likenolog tüm liken tallusunu çoğaltmayı başarmıştır. *Cladonia cristatella*, *Endocarpon pusillum* and *Staurothele clopima* başarılı bir şekilde Ahmadjian (1966), Ahmadjian ve Heikkilä (1970) tarafından kültürlenmiştir [86,87]. Daha sonra, *Usnea rubescens*, *Ramalina yasudae* ve *Cladonia vulcani*, thallus indüksiyonu ile kültürlenmiştir ve kültürde usnik asit üretimi bildirilmektedir [88,89]. Liken kültürü dokusunun büyümesi üzerine kültür koşullarının etkileri çeşitli araştırmalarla incelenmiştir [90,91]. Siyanobakteri liken türleri kültürlenmiştir [92]. Liken simbiyontlarının başarılı bir şekilde kültüründen sonra veya izole edilmiş mikobiyontlardan sekonder metabolit elde edilmeye ve biyolojik aktivite çalışmalarına geçilmiştir [46,88,93-103]. Son yıllarda ise liken örneklerinin sanayiye aktarılmasını sağlamak amacıyla kültür koşullarının değiştirilerek en iyi büyümenin sağlandığı besin ortamı bulunmaya çalışılmaktadır [103-105].

Likenlerin kültüre alınmasında en sık kullanılan iki yöntem bulunmaktadır. Üreme yapısı olarak apotesyum veya peritesyum içeren örneklerde, ilk kez Ahmadjian (1993) and Pyatt (1973) tarafından önerilen ve spor çimlenmesine dayanan bir yöntem uygulanmaktadır [106,107]. Bu yöntemle liken yapısında bulunan mantar ortağına ait sporlar kültür ortamında çimlendirilmesi ve tek bir spordan mikobiyontun gelişmesi sağlanmaktadır [108]. Diğer yöntemde ise liken tallusundan mikobiyont dokusu izole edilerek steril şartlar altında kültüre alınmaktadır. Hücrelerin çoğalması ile kültürde liken mikobiyontu büyümektedir [109]. Seçilen likenlerin kültürü, numunelerin toplanmasından sonraki birkaç gün içinde başlamalıdır, çünkü yeni toplanan örneklerden en iyi sonuçlar elde edilebilmektedir [110]. Liken kültürü oluştururken besin yönünden zengin besiyerleri kullanmak genellikle zor olmaktadır. Çünkü bu durum kontaminasyon riskini artırmaktadır. Bakteriler, mayalar ve diğer mantarlar için

uygun ortam oluşturmaktadır. Kullanılacak tüm malzemelerin steril olmasına özen gösterilmeli ve çalışmalar UV kabin içinde gerçekleştirilmelidir. Likenlerin taze toplanması veya bir hafta içinde kullanılması tavsiye edilmektedir. Bununla birlikte, birkaç hafta boyunca kurutulmuş veya birkaç yıldır dondurucuda saklanan likenlerde kullanılabilir.

1.2.1. Spordan türetilmiş kültür (Spore-derived culture)

Yoshimura ve ark. (2002) tarafından geliştirilen yöntemde doğadan toplanan liken tallusu, stereo mikroskop altında taranarak sağlıklı üreme yapıları (apotesyum) sterilizasyon için seçilmektedir [108]. Olgun apotesyumlar tallustan kesilip alınarak 24 saat oda sıcaklığında steril su içeren bir ortamda bekletilmektedir. Daha sonra apotesyumlar 30 dk-1 saat kadar musluk suyu altında yıkanmakta ve % 2'lik Tween 80'de 5 dakika bekletilmektedir. Kimyasalın uzaklaşması için deiyonize su ile yıkanmaktadır. Sterilize edilmiş apotesyumlar steril şartlarda kurutulmaktadır. Apotesyumlar petrilerin üst kapağına petrolum jel ile tutturulmaktadır. Petrinin üst kapağı sadece % 4 agar içeren besi yeri üzerine kapatılarak ve sporların besiyerine atılması için karanlık ortamda 15 °C'de inkübe edilmektedir. Periyodik olarak gözlemlenmektedir. Mikroskop altında sporların çimlenmesi lacto-fenol-blue boyası kullanılarak izlenebilmektedir. Çimlenme bazı türlerde bir gün sürerken bazılarında bu süre 2-3 haftaya ulaşmaktadır. Bu süreçte günlük olarak alttaki besiyerini değiştirmek çimlenen sporları gözlemlmeyi kolaylaştırabilmektedir. Çimlenme gerçekleşikten sonra sporlar tek tek malt-yeast besiyerine alınarak inkübe edilmektedir. Bu yöntemin başarılı olması olgun apotesyum seçimine, toplanma dönemine, toplanırken apotesyumların hasar almasına, spor keselerinin yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Sporların tek tek izole edilmesinin zor olduğu durumlar için Ahmadjian (1993) tarafından mikropipet tekniği geliştirilmiştir. Kültür ortamının sıcaklığı ve pH seviyesi çimlenme sürecini etkilemektedir [106].



Şekil 1.3. Liken apotesyumundan kültüre alma aşamaları

1.2.2. Liken tallus parçasından türetilmiş kültür (Thallus fragment-derived culture)

Yamamoto ve ark. (2002) tarafından geliştirilen yöntem özellikle apotesyum içermeyen veya olgun apotesyum bulundurmeyen türler için sıklıkla kullanılmaktadır [109]. Ancak kontaminasyon oranı daha fazla olmaktadır. Çünkü tallus yüzeyinde veya izidlerde çok sayıda farklı organizma yer almaktadır. Yöntem uygulanırken önce tallus'tan yaklaşık 1 cm uzunluğunda bir bölüm makas veya bıçak ile ayrılarak, musluk suyu altında 30 dk-1 saat boyunca yıkanmaktadır. Tallus parçası daha sonra distile su içeren havanda ezilerek homojenize edilmektedir. Homojenat önce 500 µm, sonra 150 µm por çapına sahip filtrelerden geçirilmektedir. Filtre üzerinde kalan tallus parçaları mikroskop altında seçilerek steril iğne ile toplanarak eğimli malt-yeast agar besiyeri yüzeyine inoküle edilmektedir. Örnekler 15 °C'de inkübasyona bırakılmaktadır. İnokülasyondan iki hafta sonra eğrilikler üzerinde mikobiyont hifleri ve alg hücreleri gözlemlenebilmektedir

Örneğe göre uygun yöntemle elde edilen kültürler uzun süre muhafaza edilebilmektedir. Ancak 2-3 ayda bir alt kültür almak tavsiye edilmektedir. Kültür koşullarında sıcaklık ve pH büyümeyi etkilemektedir. Mikobiyontlar maksimum büyümeyi genellikle 15-20 °C'de göstermektedirler. Türden türe değişmekle birlikte genellikle pH 5-6 aralığı optimum değer olarak bilinmektedir. Kültür ortamındaki besin

içeriği büyümeyi etkilemektedir. Aminoasit ve karbonhidrat kaynakları genellikle büyümeyi olumlu etkilemektedir. Mannitol, maltoz ve laktoz gibi karbon kaynakları olumlu etki yaparken sitrat, asetat, erithritol gibi zayıf karbon kaynakları olumsuz etki göstermektedir. Karbon ve nitrojen kaynakları mikobiyontun morfolojisinde ve fizyolojisinde değişikliklere sebep olabilmektedir [108,110].

1.3. Liken Sekonder Metabolitleri

Likenler, temel ve yaşamsal faaliyetler için üretilen metabolitlerinin yanında organizmanın kendini savunmasını sağlayan, çok olumsuz ve sert çevre koşullarında yaşamasına yardımcı olan sekonder metabolitlerde sentezlemektedirler [111,112]. Likenlerde bulunan sekonder metabolitlerin çoğunluğu mantarın sekonder metabolitleri olarak değerlendirilmektedir. Çünkü liken sekonder metabolitleri mantar hücrelerinde sentezlenmektedir. Ancak likenlerin alg ve mantar ortaklarının ayrı iken üretmedikleri, sadece simbiyotik ilişki içerisinde üretebildikleri maddeler de bulunmaktadır [1,6,8]. Liken sekonder metabolitlerinin sentez mekanizması likenleşmeyen mantarlarla benzerlik göstermektedir. Bu nedenle liken sekonder metabolitlerinin sentezinde fotobiyontun (alg bileşeni) gerekli olmadığı düşünülmektedir. Bu düşüncenin kanıtı olarak likenden izole edilen mantarların kültür ortamında uygun şartlar sağlandığında aynı metabolitleri sentezleyebilmesi gösterilmektedir. Ancak sekonder metabolitlerin çoğunluğu sadece liken oluşturan mantarlar tarafından üretilmektedir ve izole edilen mantarlar simbiyotik mantarlardan farklı metabolitler üretebilmektedir [14]. Fotobiyontun metabolitin sentezlenmesi için gerekli ön maddelerin sentezlenmesinde ve uygun şartların oluşmasında etkili olduğu düşünülmektedir [27]. Aynı zamanda sekonder metabolitlerin fotobiyont yapısındaki enzimlerin düzenleyicisi olduğu da ifade edilmektedir [27]. Liken sekonder metabolitleri diğer mantarlar ve bitkilerin metabolitleriyle benzer özellikler göstermektedir ancak pek çok liken maddesi veya metaboliti yüksek bitkilerinkine göre daha benzersizdir [1,27,82,111,113,114].

Liken kimyası 19. yüzyılın başlarından buyana geçtiğimiz yüz yıl boyunca likenlerde bulunan birçok aromatik bileşiğin benzersizliği nedeniyle pek çok likenolog tarafından incelenmiştir [30]. Yapılan incelemeler sonucu alifatik ve aromatik yapıda 1050'den fazla sekonder metabolit özelliği taşıyan bileşik olduğu belirtilmektedir [114]. Metabolitlerin çoğunlukla liken tallusunun üst korteksinde veya meyve toplulukları gibi

özelleşmiş yapılarda biriktiği bilinmektedir [113]. Genellikle suda çözünmeyen ve sadece organik çözücüler ile ekstrakte edilebilen bu bileşiklerin insan sağlığı ve beslenme konularında büyük rolleri bulunmaktadır. Liken metabolitleri ile ilgili pigment üretimi, bağışıklık düzenleyici, toksin atıcı, böcek öldürücü, antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antioksidan, antitümöral, anti-allerjen, bitki büyüme inhibitörü, bellek artırıcı, antiherbivor, enzim inhibitörü v.b. pek çok biyolojik etki literatürde kaydedilmiştir [1,3,8,43,52,82]. Liken sekonder metabolitleri ayrıca tür tayini açısından büyük önem taşımaktadırlar [37].

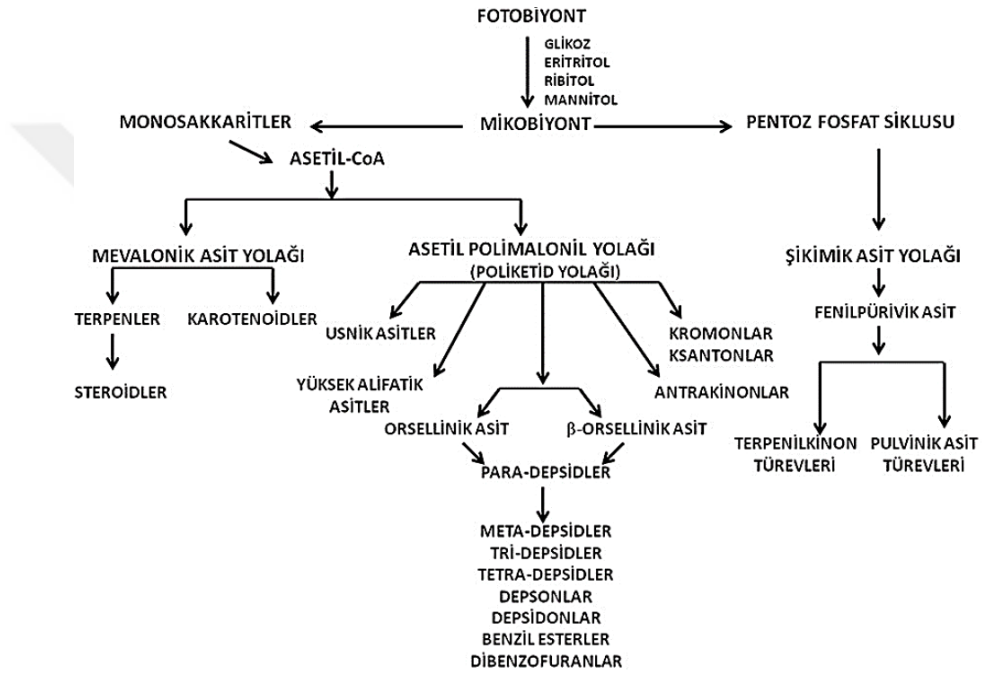
1.3.1. Liken sekonder metabolitlerinin sentez mekanizması

Çeşitli biyosentetik yollarla üretilen liken sekonder metabolitlerinin sentez mekanizması ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Asahina ve Shibata (1954) tarafından gerçekleştirilen araştırma metabolit sentez mekanizması ile ilgili ilk araştırma olarak bilinmektedir [6]. Culberson ve Elix, (1989), yollarla ilgili çalışmayı genişleterek modifiye etmişlerdir [115]. Son bilgilere göre sekonder metabolit sentezinde esasen Asetil-polimalonil (Poliketid), Şkimik asit ve Mevalonik asit yolu olmak üzere üç önemli yolak rol oynamaktadır [1,6,8,43,114-116]. Tüm yolların glikoz katabolizmasının ana ürünü olan Asetil-CoA ile başladığı düşünülmektedir. Bu süreçte fotobiyont ve mikobiyontun ortak çalışması söz konusudur. Alg tarafından salınan ve mantara verilen karbonhidrat çeşidi fotobiyonta göre değişmektedir. Siyanobakterileri içeren likenlerde glikoz salınmaktadır ve mantara aktarılmaktadır. Yeşil algleri içeren likenlerde ise şeker alkoller (eritritol, ribitol, sorbitol, mannitol) salınarak mantara aktarılmaktadır. Mikobiyonta ulaşan karbonhidratlar, glikoliz veya pentoz fosfat döngülerinden geçerek sekonder metabolitlerin sentezinde kullanılmaktadır (Şekil 1.4).

1.3.1.1. Asetil-polimalonil yolağı

Likene özgü sekonder metabolitlerinin çoğunluğu bu yolla sentezlenmektedir [117]. Asetil-polimalonil yolağı poliketid yolağı olarak da adlandırılmaktadır. Adından da anlaşılacağı üzere, genellikle, karbon omurgasında keto ($C = O$) grupları içermektedir. Çok sayıda malonilCoA molekülü asetilCoA molekülleriyle birleşerek liken sekonder metabolitlerine dönüşmektedir [1,6,8,114,115]. Bu moleküllerin

birleşmesiyle poliketid ana zinciri meydana gelmektedir. Ana zincirin elde edilmesinden sonra metilasyon veya farklı halkalanma şekilleri ile farklı özelliklere sahip metabolitler sentezlenmektedir. Poliketidler, doğal olarak bulunan metabolitlerden oluşan bir sınıftır. Bakteri, mantar, algler ve yüksek yapıli bitkiler ile hayvanlar aleminde de sentezlenmektedir. Likenlerde bulunan en yaygın monoaromatik bileşikler orsellinik asit ve onun türevleridir. Orsellinik asit en basit poliketid bileşigidir ve ayrıca hem *Penicillium* spp., hem de bazı bakterilerde bulunmaktadır [30].



Şekil 1.4. Liken sekonder metabolit çeşitleri [43].

Özellikle depsid, depsidon, dibenzofuran, usnik asit, depson, kromon, ksanton, antrakinin gibi kompleks sekonder metabolitler “Poliketid” grubunda yer almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar para-depsidlerin daha büyük moleküller olan meta-depsid, depson, depsidon, difenil eter ve dibenzofuranların öncü maddesi olduğunu ortaya çıkarmıştır [6]. Barbatik asit, difraktaik asit, 4-Odemetilbarbatik asit, atranorin, kloroatranorin, baeomisesik asit, skuamatik asit, lekanorik asit, divarikatik asit, obtusatik asit, perlatolik asit vb. para depsidler ise iki veya üç orsinol ve β-orsinol moleküllerinin kendi halinde ester, karbon-karbon bağları ya da eter bağları oluşturmasıyla sentezlenmektedir [1,6,8]. Depsid, depsidon ve depsonlar 2 orsellinik asit fenol grubunun birbirine bağlanmasıyla oluşmaktadır. Daha sonra yapısında

bulunan fonksiyonel (R) grubun yapısına ve fenil üzerindeki sayısına göre birbirinden farklı metabolitler ortaya çıkmaktadır. Orsinol ve β -orsinol türevleri (depsid, depsidon ve dibenzofuran) likenlerde ortak yaşamın kurulmasında partnerler arasında ve çevreyle etkileşim kurulmasında muhtemelen rol oynamaktadır [8,118,119].

Dibenzofuranlar ise orsellinik asit halkalanması yoluyla elde edilen fenol yapı bloğundan türetilmektedir [1]. Streptisilin, alektosarmentin, didimik asit ve pannarik asit bu şekilde oluşturulan dibenzofuranlara örnektir. Usnik asitler de dibenzofuranlara benzer yapı gösterirler ancak usnik asitlerin yapısında orsellinik asit tip fenol grupları yerine 2-metil-flor-asetofenon halkaları bulunmaktadır.

Asetil-polimalonil yolağı ile sentezlenen kromon, ksanton, antrakınon gibi aromatik bileşikler ise poliketid zincirinin iç halkalanması yoluyla düzenlenmektedir. Bu ürünler liken oluşturmeyen mantarların ve yüksek bitkilerin metabolitleri ile aynı ya da benzerdir.

1.3.1.2. Şikimik asit yolağı

Şikimik asit yolu aromatik bileşiklere alternatif bir yol sağlamaktadır. Şikimik asit yolağı özellikle pulvinik asit ve terpenilkinon türevlerini içermektedir. Bu bileşikler, iki adet fenilpürivatın birleşmesi ile elde edilir. Özellikle aromatik amino L-fenilalanin, L-tirozin ve L-triptofan asitleri kullanılmaktadır. Özellikle *Stictaceae* familyasına ait likenlerde bu gruba ait metabolitler geniş yer tutmaktadır [8]. Son yıllarda Epidithiodioxopiperazine grubunda şikimik asit yolağında sentezlendiği bildirilmektedir. Bu gruba ait Methylscabrosin maddesi liken sekonder metaboliti olarak kayda geçmiştir [30].

1.3.1.3. Mevalonik asit yolağı

Liken sekonder metabolitlerinin karotenoidler, terpenler ve terpenoidler gibi az bir kısmı mevalonik asit yolu ile sentezlenmektedir. Bu yolağın sonucunda üretilen maddeler diğer canlılardakiler oldukça benzemektedir [1]. Triterpenler likenlerde sıklıkla görülmektedir. Farklı likenlerden 20 farklı triterpen türetilmiştir. Zeorin metaboliti çeşitli likenlerde bulunan başlıca triterpenlerdendir [8]. Mevalonik asit yolakları, öte yandan C5 isopren birimlerinden türetilen terpenoidleri üretmektedirler

[120]. Likenler aynı zamanda ergosterol ve sitosterol denilen birkaç sterol de sentezlemektedir. Bu moleküller skualen tip öncünün halkalanması ile elde edilmektedir [1]. Likenlerde tespit edilen diterpenlerden 16 α -hidroksikauran maddesi, likenleşmemiş mantarlarda gibberellik asitin öncü formu halinde bulunmaktadır [1].

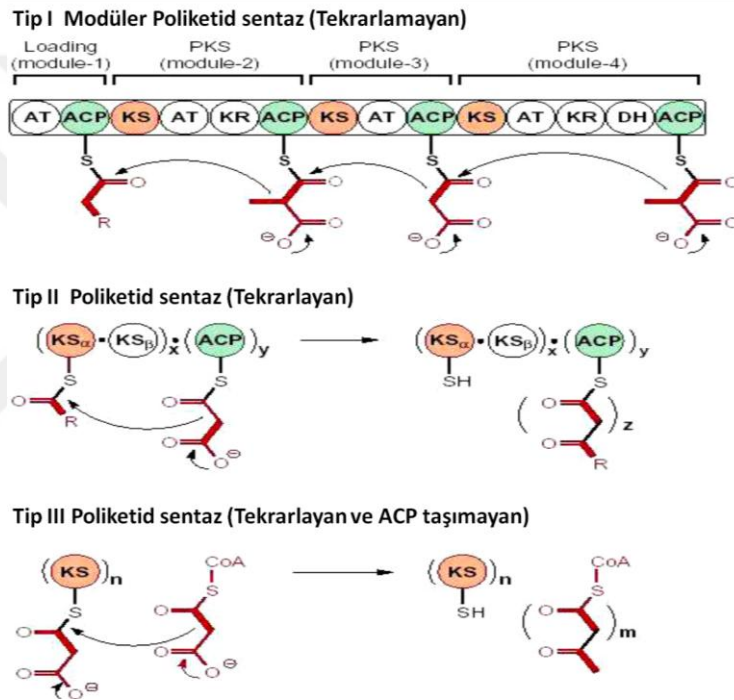
1.3.2. Liken poliketid sentezinden sorumlu genler ve işleyiş mekanizması

Son yıllarda likenlerin sınırlı bir materyal kaynağına sahip oldukları düşüncesiyle etken madde eldesi için farklı yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri de likenlerde sekonder metabolitlerin sentezlenmesinde etkili olan genlerin belirlenmesi ve bu genlerin başka bir canlıya aktarılmasıyla etken maddenin salgılanmasını sağlamaktır [6,8,114]. Bu nedenle likenlerdeki sekonder metabolitlerin sentez mekanizmasının açığa çıkarılmasında poliketid genlerinin tam olarak incelenmesi gerekmektedir. Poliketidlerin biyosentezinde poliketid genlerine göre sentezlenmiş poliketid sentaz enzimleri görev almaktadır ve bu multienzim kompleksleri asetil-CoA ve malonil-CoA türevlerinin farklı şekillerde aktive edilmesini sağlamaktadır [1,30,41,121]. Sentez aşamasındaki farklılıklar enzimlerin yapısındaki farklı işlevlere sahip ketoaçilsentetaz (KS), açıltransferaz (AT), ketoredüktaz (KR), dehidrataz (DH), enolredüktaz “ER”, açıl taşıyıcı protein (ACP), C-metil transferaz (CMeT) vb. bölgelerinin içeriğinden veya yerleşiminden kaynaklanmaktadır [6,41,114,121]. PKS genleri bir cluster (bir kromozomun üzerinde küme halinde birine bitişik genler) içinde bulunmaktadır. Mantar sekonder metabolitleri bu sıralı olarak düzenlenmiş kümeler tarafından kodlanmaktadır [122]. Fungal PKS genleri, sıralı ve tekrar tekrar kullanılan ketoaçıl sentez (KS) bölgesiyle C₂ birimlerini yoğunlaştıran çok fonksiyonlu proteinleri kodlamaktadır. Ketoaçıl sentez bölgesini (KS) kodlayan gen parçası oldukça korunumludur ve PKS primerleri ile kolayca hedeflenebilmektedir [6,30].

Poliketid sentezinde görevli enzimler genel olarak üç grupta toplanmaktadır. Bakterilerde ve mantarlarda Tip I ve Tip II poliketid sentez mekanizması gözlenirken, yüksek bitkilerde Tip III poliketid sentezinin daha yaygın olduğu belirtilmektedir [41]. Tip III poliketid sentezinde açıl taşıyıcı protein (ACP) yerine koenzim A esterleri kullanılmaktadır [6].

Tip I sistemleri, ya tekrarlanmayan (örneğin, makrolidlerin biyosentezinden sorumlu modüler sistemler, eritromisin, rifamisin gibi büyük halka bileşikleri) ya da

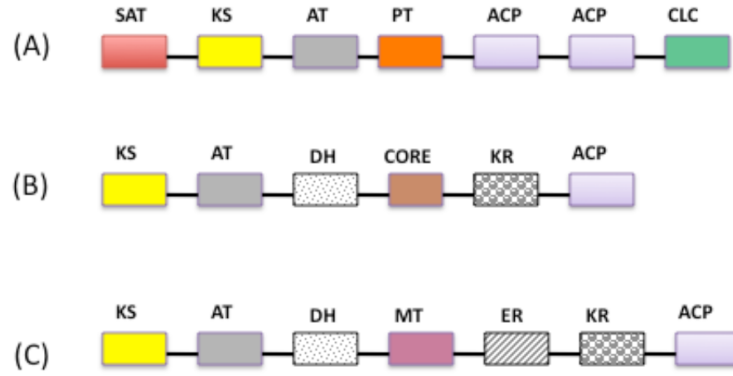
tekrarlanan çok işlevli proteinlerden oluşmaktadır [123]. Tekrarlayan tip I (tek modüller) PKS'ler gerekli tüm alanları içeren ve aktif yerlerini tekrar tekrar kullanan tekli protein kompleksleri ile belirli bir poliketid üretmektedirler. Her yoğunlaşma ve döngü tekrarıyla büyüyen zincire bir C_2 molekülü (örneğin bir CoA esteri) eklemektedirler. Tekrarlamayan Tip I sistemleri ise modüller şeklinde oluşum göstermektedir ve özellikle poliketid uzun karbon zincirlerinin oluşmasını sağlamaktadır. Tekrarlanan ve tekrarlanmayan PKS ürünleri birleştirilebilmektedir. Bu durumda, dallanmış bir PK'nin oluşmasına neden olmaktadır. PKS'lerin çeşitliliği, bu üç isteğe bağlı PKS indirgeyici alanın kullanımından kaynaklanmaktadır (Şekil 1.5) [41].



Şekil 1.5. Poliketid sentezinde görevli enzimlerin sentez mekanizması [30].

Likenlerde ise Tip I poliketid sentezi daha yaygın görülmektedir. Tip I poliketid sentezinde görevli enzimler de öncelikle tekrarlayan (iterative) ve tekrarlamayan (non-iterative) bölümler içermelerine göre gruplandırılmaktadır. Tekrarlayan Tip I poliketid sentezi enzimleri ise üç tipe ayrılmaktadır (Şekil 1.6):

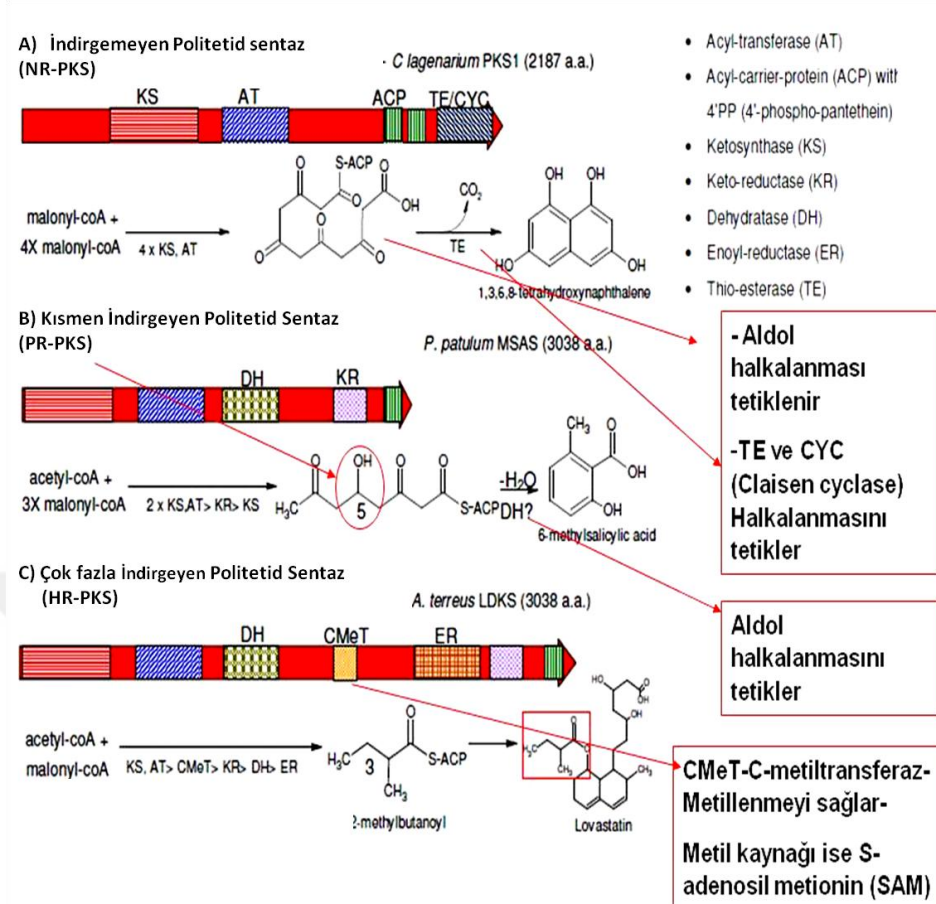
- İndirgemeyen (non-reduced-NR)
- Kısmen indirgeyen (partially reduced-PR)
- Çok fazla indirgeyen (High-reduced-HR)



Şekil 1.6. Tekrarlayan Tip I poliketid sentez enzimlerinin yapısı [30].

A: İndirgemeyen (non-reduced-NR), B: Kısmen İndirgeyen (partially reduced-PR) C: Çok fazla İndirgeyen (High-reduced-HR) SAT: Başlangıç bölgesi, KS:Ketosentaz, AT:Açıltransferaz PT: Ürün kalıbı, ACP: Açıl taşıyıcı protein, CLS: Klaisen siklaz, DH:dehidrataz, KR:ketoredüktaz, ER: Enol redüktaz, MT: Metil transferaz

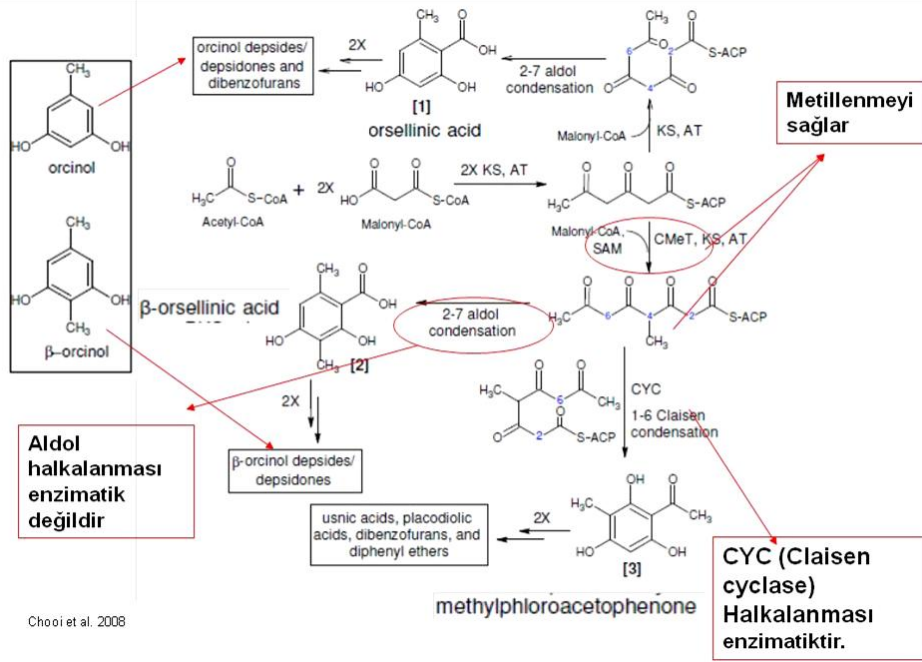
Bu ayırım enzim yapısında β -keto kısımlarının işlenmesini sağlayan bölgelerin varlığına veya yokluğuna göre yapılmaktadır. İndirgemeyen (NR) tip poliketid enzimlerinde indirgeyici fonksiyonel etki eksikliği nedeniyle tüm keto grupları zincir içinde indirgenmemiş olarak kalmaktadır [41,114,121,124]. İndirgenmemiş poliketid zinciri genellikle aldol ve / veya Claisen yoğunlaştırmasıyla aromatik halka (lar) oluşturmak üzere siklize olmaktadır [125]. Oksitlenmiş poliketidlerin (çoğunun bilinen ve yaygın liken poliketleri) oluşumu indirgenmeyen PKS genleri tarafından kontrol edilmektedir [124]. Şimdiye kadar bilinen tek kısmen indirgenmiş (PR) poliketid enzim sistemi 6-metilsalisilik asit sentezinde tespit edilmiştir. Bu tipte ketoaçıl sentez (KR) bölgesi, C-5'deki keto grubunu bir hidroksil grubuna indirgemektedir. İndirgenmiş (HR) poliketid enzim sisteminde ise enol redüktaz (ER), ketoaçıl sentez (KR) ve dehidrataz (DH) bölgeleri bulunmaktadır. Bu tipteki enzimler metillenmeyi gerçekleştirmektedir. Zincir uzatması veya ER bölgesi ile komple indirgeme tamamlandıktan hemen sonra C-metil transferaz (CMeT) bölgesi ile metil grubunun C-2'ye aktarılması gerçekleştirilmektedir. Birçok metil transferaz gibi, CMeT alanı ile aktarılan metil grubuna da S-adenosil metiyonin (SAM) kaynak oluşturmaktadır (Şekil 1.7) [30,41].



Şekil 1.7. PKS sentaz çeşitleri [30].

Liken kaynaklı muazzam fenolik çeşitliliği esas olarak üç basamakta gerçekleştirilmektedir (Şekil 1.8) [6,30].

- 1) Ayrı poliketid yollarından kaynaklanan farklı temel monoaromatik zincirlerin oluşturulması
- 2) Monoaromatik birimleri çeşitli bağlantılarla birleştirerek bir araya getirmek
- 3) Temel monoaromatik birimlerin post-PKS modifikasyonu yoluyla şekillenmesini sağlamak.



Şekil 1.8. Metabolit sentez mekanizması [30].

Liken bağlı fenoliklerin yapısal çeşitliliğini güçlendiren post-PKS değişiklikler arasında O-metilasyon, oksidasyon, halojenleme, dekarboksilasyon ve kısa-orta zincirli yağ asitleri ile esterifikasyon, klorlanma yer almaktadır. Bu post-PKS'lerin modifikasyon reaksiyonlarının bazıları poliketit siklizasyonundan sonra meydana gelebilirken, bazıları aromatik ünitelerin eşleştirilmesinin ardından gerçekleşebilmektedir [6,30].

1.3.3. PKS gen bölgesi ile ilgili yapılan çalışmalar

PKS geninin tanımlanması aynı zamanda ilgili gen kümesinde kodlanan enzimlerin tek tek biyokimyasının incelenmesine, çeşitli bağlantı mekanizmalarına ve post-PKS modifikasyonlarına değerli bilgiler sağlayacaktır. Zamanla Tip I PKS genlerinin alt gruplarının belirlenmesi, özellikle seçilen liken düzenleri veya kimyasal olarak karakterize edilmiş ailelerdeki metabolik çeşitliliğin gelişimini aydınlatmak umulmaktadır. Likenlerdeki sentez mekanizmasına daha uygun olduğu düşünülerek bu alanda yapılan çalışmalarda genellikle Tip I indirgemeyen (non-reduced-NR) genler incelenmektedir. Ancak likenlerdeki poliketid sentez genleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Kroken ve ark. (2003) patojen ve saprobik ascomycetes içinde Tip I türü poliketid sentaz genlerinin filogenomik analizini gerçekleştirmiş, bakteri ve

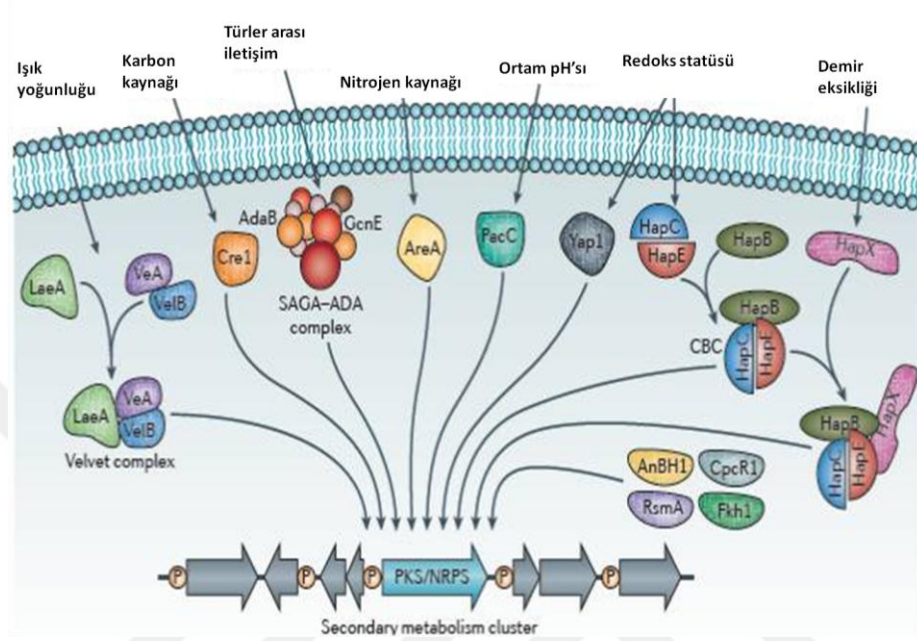
mantarlardaki poliketid genlerini gruplandırmıştır [41]. Schmitt ve ark. (2005) Pertusariales takımı üyeleri üzerine yaptıkları çalışmada diğer mantar gruplarında bulunan indirgemeyen (non-reducing) genlerden yararlanarak geliştirdikleri primerlerle PZR ürünleri elde etmiş ve sekonder metabolitleri temel alarak filogenetik analiz gerçekleştirmişlerdir [124]. Opanowicz ve ark. (2006) Parmeliaceae familyası içinde paralog poliketid sentaz genlerini spesifik primerlerle saptamışlardır [126]. Chooi ve ark. (2008) *Xanthoparmelia semiviridis*, Brunauer ve ark. (2009) *Xanthoria elegans*, Valarmathi ve ark. (2009) *Dirinaria applanata*, Gagunashvili ve ark. (2009) *Solorina crocea*, Wang ve ark. (2011) *Usnea longissima*, Yu ve ark. (2012) *Hypogymnia physodes* türlerindeki Tip I indirgenmeyen (non-reducing) genleri çalışmış ve bu genlere özgü primerler geliştirmişlerdir [30,127-131]. Muggia ve Grube (2010) liken mikobiyontunda Tip III poliketid sentaz genlerini incelemişlerdir [132]. Armaleo ve ark. (2011) *Cladonia grayi* türü ile yaptıkları çalışmalarında grayanik asit sentezinde etkili olabilecek genleri ortaya çıkarmak için dört farklı gen bölgesini ayırt etmişler ve gen ekspresyonunu kRT-PZR ile test etmişlerdir [119]. Kim ve ark. (2012) ise *Cladonia metacorallifera* türünde mantarlara özgü indirgenmiş (reducing) genleri incelemiş kRT-PZR ile gerçekleştirdikleri çalışmada belirledikleri genin ekspresyonunun mikobiyontun erken büyüme aşamasında tercihen ifade edildiğini ve kültür ortamındaki karbon kaynağına bağımlı olduğunu ileri sürmüşlerdir [133]. Timsina ve ark. büyüme ortamındaki farklılıkların *Ramalina dilacerata* kültür örneklerinin büyümesi, PKS gen ekspresyonu ve metabolit üretimine etkisini incelemişlerdir [134]. Wang ve ark. (2014), *Usnea longissima* türüne ait üç farklı indigenmemiş poliketid sentez geni tespit etmişlerdir. Üç gen bölgesinden ikisi metillenmeyi sağlayan bölge içerirken bir tanesi monoaromatik sekonder metabolitlerden sorumlu gen olarak tespit edilmiştir ve farklı besin ortamlarının gen ekspresyonuna etkisini incelemişlerdir [135].

Enzimlerin, endüstriyel kullanım için yüksek verimlilikte üretilmesi için taşıyıcı konakçılar vasıtasıyla sentezlenmesi son yıllarda sıkça uygulanmaktadır. Bu genetik mühendislik tekniğinin liken poliketid yolağını klonlamak için kullanılabileceği düşünülmektedir. Sınırlı bir materyal kaynağına sahip oldukları ve doğal çeşitlilik için önemleri sürekli dile getirilen likenler açısından bu teknik önemli yer tutmaktadır. Ancak bu süreçte poliketid üretmek için bir ön şart, fonksiyonel poliketid sentazın (PKS) heterolog ifadesini sağlamaktır. Bu amaçla *Solorina crocea*'dan elde edilmiş PKS geni

rekombinasyon tekniği ile hazırlanarak, *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae* ve *Fusarium venenatum* gibi birkaç ipliksi mantara standart klonlama ile klonlanmıştır. Liken PKS geninin transkripsiyonu ve güçlü bir fungal promoter, higromisin direncine aracılık eden bir işaretleyici ile 16 kb bir plazmid oluşturularak aktarılmıştır. *A.niger*'in bu plazmid yapısıyla genetik dönüşümü sonucunda kimyasal yapısı henüz bilinmeyen pigment üretebilen transformantları ortaya çıkmıştır [6,136]. Benzer şekilde Chooi ve ark. (2006), *Chondropsis semiviridis* tipik liken poliketidlerinin (depsidonlar ve usnik asitler) öncüleri olarak borsellinik asit ve metil-floroasetofenonun üretilmesinden sorumlu bir PKS genini araştırmışlardır. Genin hem depsidonu hem de usnik asit üretimini kontrol eden, muhtemelen daha büyük bir gen kümesinin parçası olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durumda, poliketit geni heterolog ev sahibi *A. nidulans*'a aktarılmıştır [137].

PKS genlerini klonlayarak, *A. niger* veya *A. oryzae* gibi iyi tanımlanmış hücre fabrikalarına taşınabildiği ve eksprese edilebildiği tespit edilmiştir. Blast araştırması, diğer bilinen PKS enzimleriyle, özellikle de *A. nidulans* wA geniyle yüksek homoloji ortaya koymuştur. Bu durumda araştırma konusu, biyosentezi, modifikasyonu ve bazı durumlarda poliketidlerin salgılanmasını ve direncini kontrol eden genlerin bulunması olarak görülmektedir. Bunun için PKS'nin bir cDNA'sı diziliminin belirlenmesi yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır [82,114,138]. Akselik olarak yetiştirilen mikobiyonttan, temiz RNA izole edilmesi ve daha sonra cDNA sentezi gerçekleştirilmesi tercih edilmektedir. Ancak günümüzde PKS genlerinin heterolog ifadesi ve daha büyük miktarlarda biyolojik olarak aktif poliketidlerin ardışık üretilmesi ile şimdiye kadar yapılmış olan teşebbüslerde prokaryotik veya ökaryotik konak organizmalarda liken poliketid üretmek için tam bir başarı elde edilememiştir. Fungal PKS için genler, genellikle 6-8 kb'lık çok büyük DNA sekansı içermektedir [40]. Genellikle intron dizileri içerdiği için klonlaması çok zor olurken, özellikle proteininin orijinal işlevi ile sentezlenmesi tam mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla, hem uygun konakçı hem de hızlı büyüyen mantarların bulunması ve orijinal liken PKS'nin ekspresyonu için daha fazla çalışma gerekmektedir. Bu nedenle son yıllarda liken örneklerinin sanayiye aktarılmasını sağlamak amacıyla kültür koşullarının değiştirilerek en iyi büyümenin sağlandığı besin ortamının ve sekonder metabolit sentezinin artmasını sağlayacak stres koşullarının tespit edilmesine yönelik çalışmalar artmaktadır (Şekil 1.9)

[103-105]. Schimming ve ark. (2016) *Evernia prunastri*'ye ait post transkripsiyonel bir gen bölgesini *E.coli*'ye aktararak test etmişlerdir ve pigment oluşumu gözlemişlerdir [139].



Şekil 1.9. Metabolit sentezinde etkili faktörler [140].

1.3.4. Stres koşullarının likenler üzerine etkisi

Likenler çok sayıda biyotik ve abiyotik strese maruz kalırlar ve sekonder metabolitlerin üretimi bu stres ile başa çıkmanın birçok yolundan biridir [27,141]. Çevre şartlarının değişmesi ile likenler strese bağlı yanıt verirler. Öyle ki, fiziksel ve biyolojik stres koşulları, liken sekonder metabolitlerinin kimyasal yapısında hem kalitatif hem kantitatif hem de pozisyonel değişiklikler oluşturur. Uzun ömürlü ve yavaş büyüyen likenlerin ekstrem koşullarda yaşamını sürdürmesini ve çevresel etmenlere karşı kendisini korumasını sağlayan bu liken asitleri allelopatik etki gösterirler. Liken metabolitlerinin, liken talluslarında patojen veya parazit olan ve “likenikol mantarlar” olarak bilinen mantar türlerinin büyümesini ve gelişmesini önlediği bilinmektedir. Biryofitlerin, tohumlu bitkilerin ve diğer likenlerin kimyasal olarak inhibisyonunu sağlarlar ve ayrıca mikoriza mantarlarını engelleyerek dolaylı şekilde de rakip bitkileri etkilerler. Diğer tehdit unsurları olan böcekler, salyangoz vb. canlılara karşı likenin kendini korumasında büyük öneme sahiptirler [142-144].

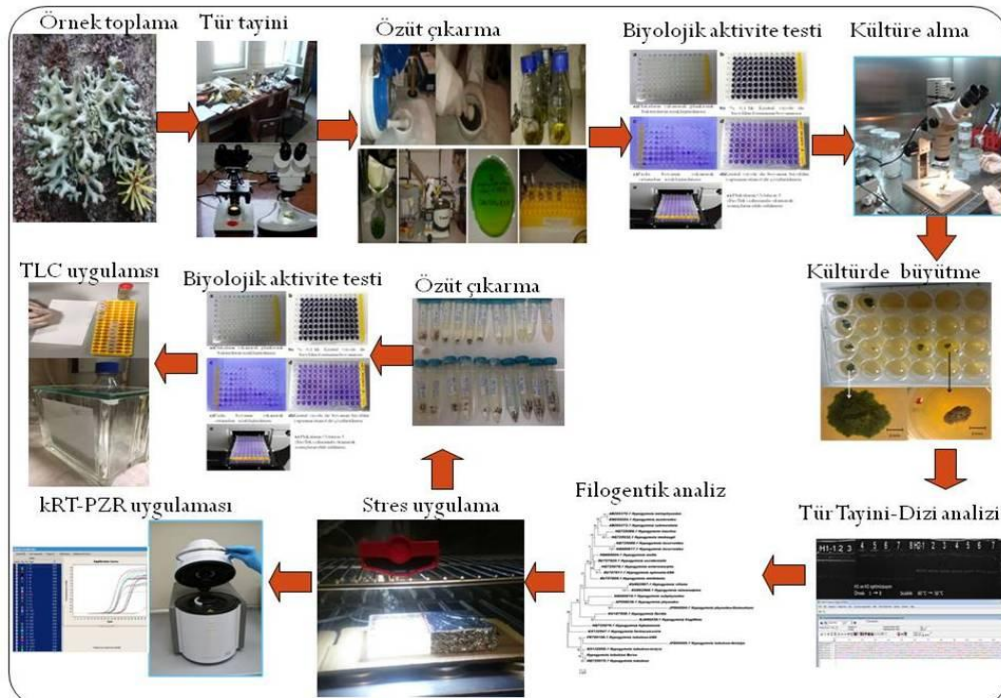
Örneğin İrlanda'da *Cladonia glauca* liken koleksiyonu içinde sıkça bulunan nematod faunası olarak, mantar ortağından beslenen *Nothanguina. Aphelenchoides lichenicola* sp. nov. ve alg ortağının paraziti olan *Ottolenchus cabi* sp. nov., ayrıca bunların yanında *Belondira*, *Chilwoodius*, *Discotnyctus* ve *Rotylenchulus* cinslerine ait çeşitli türlerde nematodlar rapor edilmiştir [145]. Liken bileşiklerinden anti-beslenme aktivitesine sahip (-)-usnic asit, (+)-usnic asit, vulpinik asit ve stiktik asidin, herbivor polifag (çeşitli besinlerle beslenen) *Spodoptera littoralis* böcek larvalarına karşı çok güçlü toksik etkileri olduğu kaydedilmiştir [146].

Suda çözünmeyen ancak organik çözücülerle çözünebilen sekonder metabolitler, mantar hiflerini oluşturan hücrelerin dış yüzeylerinde birikerek özellikle öz bölgesinde hava boşluklarını korumaya yardımcı olurlar ve böylece fotobiyont hücreleri etrafındaki gaz değişimini, aynı zamanda mantar hifleri içinde suyun kalıcılığını sağlarlar [27,116]. Renkli olan sekonder metabolitler çoğunlukla likenin üst yüzeyine yakın kısımlarda birikim gösterirken, öz kısmı renksizdir. Liken yüzeyi liken metabolitlerinin varlığı nedeniyle genellikle sarı, turuncu, gri veya kahverengidir ve çoğu bitki gibi parlak yeşil değildir. Üst yüzeyde bulunan bazı metabolitler ışık koruyucu olarak görev yapar ve fotobiyont hücrelerini zararlı UV ışınlarından korurlar [27]. Çünkü bu bileşiklerin tümü güneş ışığını filtreleyerek alttaki hassas fotobiyont hücrelerini koruma yeteneğine sahip pigmentlerdir. Örneğin *Cladonia subtenuis* fazla ışıklı ortamlarda yüksek konsantrasyonda usnik asit üretmiştir [147]. Yine ribitol ve ışık kombinasyonu test edilmiş ve sonucunda usnik asit sentezinin uyarılmasının arttığı görülmüştür [143]. Benzer şekilde *Xanthoria parietina* likeninin ışığa maruz kalan habitatlarda daha fazla parietin metabolitine sahip olduğu belirlenmiştir [148]. Nybakken ve ark. (2004), *Xanthoria parietina* türünü kullanarak gerçekleştirdikleri deneyler sonucunda, UV-B'nin parietin maddesinin sentezinin uyarılması için gerekli olduğunu ve bu uyarılmanın yüksek ışık yoğunluğunda daha hızlı olduğunu ortaya çıkarmışlardır [149]. Bazı likenler ise ışık koruyucu melanin üretmektedir. Melanin konsantrasyonu ışık yoğunluğuna ve fotosentetik aktif ışığa ve UV-B yeteneğine göre değişmektedir. Bazı likenlerin taşınma sonucu, yüksek ışıklı bölgelerde melanin varlığına bağlı olarak daha koyu üst yüzeye sahip oldukları görülmüştür [27,149-151]. Bununla birlikte yapılan bazı çalışmalar, izole mikobiyontların da bu maddeleri ürettiklerini fakat bu üretimin ışığa daha az duyarlı olduğunu ortaya koymuştur [141,152-154].

1.4. *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. Liken Türünün Karakteristik Özellikleri

Hypogymnia tubulosa, Askolikenler grubunda yer alan, yapraksız, yeşilimsi griden soluk yeşile kadar farklı renk tonları içeren 3 - 8 cm uzunluğunda, tüp benzeri uzama gösteren ve uzantıların uçları sorallerle sonlanan bir liken türüdür [25]. *H. tubulosa* 'nın yapısında atranorin, physodic asit ve 3-hidroksiopropanoik asit temel metabolit olarak tespit edilmiştir. 2'-O-methylphysodic asit içerdiği de gözlenmiştir.

Liken mikobiyont örneklerinin ve metabolitlerinin doğal yollarla daha ucuz ve daha fazla elde edilebilmesini mümkün kılmak hedefiyle Türkiye'de ilk kez kültüre alınması, *H. tubulosa* mikobiyontunun stres koşullarında sekonder metabolit sentezinde görevli genlerin ekspresyonunun ve metabolit üretiminin değişiminin incelenmesi, metabolitlerin etkinlik farklılıklarının bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine aktivitesinin test edilmesi, TLC yöntemi ile de liken örneklerinin içerdiği sekonder metabolit çeşitliliğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Şekil 1.10' da belirtilen basamakların uygulanması planlanmıştır.



Şekil 1.10. Çalışmanın hedefine ulaşması için yapılması planlanan uygulamalar

BÖLÜM 2

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Deneylerde kullanılan sarf malzemeler

1. Malt-yeast agar besiyeri (Sigma-Almanya)
2. LB broth besiyeri (Sigma-Almanya)
3. Etil asetat (Merck-ABD)
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 mikrolaka (Thermo NUNC-ABD)
12. 24 ve 96 kuyucuklu şeffaf mikrolaka
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. Kristal viyole (Sigma-Almanya)
25. Liken spot test çözeltileri

K: % 10 KOH Potasyum hidroksit çözeltisi

- C: Ticari amaşır suyu, sodyum hipoklorid özeltisi
I : % 70 etil alkolde çözünmüş iyot kristalleri
P: % 95 etil alkoldeki doygun parafenilendiamin
N: % 50 Nitrik asit

26. ̢-merkapttoetanol (Merck)
27. Kloroform/izoamilalkol (orsinol) karışımı (24:1 V/V) (Merck)
28. Etanol (% 96 ve % 70'lik) (Merck)
29. İzopropanol % 100'lük (Merck)
30. PZR tampon çözeltisi ve MgCl₂ (Biorad),
31. dNTPmix (25mM) (Fermantas),
32. Taq DNA polimeraz (Fermantas)
33. Etidyum bromür
34. Toluene (Merck)
35. Dioksan (Merck)
36. Asetik asit (Merck)

2.1.2. Deneylerde kullanılan cihazlar

Tez alışmamızdaki tüm deneylerde kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları aşağıdaki Tablo 2.1'de listelenmiştir.

Tablo 2.1 Laboratuarda kullanılan cihazların adı, modeli ve kullanım amaçları

Kullanılan Cihaz	Kullanım alanı
Multimod Mikroplaka Okuyucu ve Görüntüleyici (Biotek-ABD)	Bakterilerin floresan, absorbans ve biyofilm ölçümü
Ultra Derin Dondurucu (Esco-Singapur)	Örneklerin -86 °C'de uzun süreli (6 ay) saklanması
Derin Dondurucu (Vestel-Türkiye)	Örneklerin -20 °C'de kısa süreli (1-3 ay) saklanması
Manyetik Karıştırıcı (WiseStir-Almanya)	Besiyerleri ve kimyasalların hazırlanmasında ve karışımların homojenize edilmesi
UV-VIS Spektrofotometre (Beckman-Coulter-ABD)	Sıvı bakteri süspansiyonlarının yoğunluk ölçümü
Dijital Hassas Terazı (Ohaus-ABD)	Besiyeri ve katı kimyasalların tartımı

İnkübatör (Memmert-Almanya)	Besiyerlerine inoküle edilen bakteri suşlarının üretilmesi ve çoğaltılması
Soğutmalı İnkübatör (Memmert-Almanya)	Liken kültür örneklerinin üretilmesi ve çoğaltılması
Vorteks (Heidolph-Almanya)	Sıvı bakteri kültürlerinin ve kimyasalların çalkalanması
Buzdolabı (Siemens-Almanya)	Hazırlanan kimyasalların ve besiyerlerinin +4°C’de saklanması
Otoklav (Nüve-Türkiye)	Besiyerlerinin ve laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonu
Mikropipetler (1000 µl, 100 µl, 10 µl) (Thermo/Finnpipette-ABD)	Besiyerleri, sıvı bakteri kültürleri ve sıvı kimyasalların aktarımı
Mikrodalga Fırın (Phillips-ABD)	Besiyeri hazırlanması
Class II Ayaklı Steril Güvenlik Kabini (Esco ve Faster-Singapur ve İtalya)	DNA izolasyonu, RNA izolasyonu, PZR, jel hazırlanması, bakteri kültürlerini pasajı ve deneylerin yapılmasında
Steril Kabin ve Çeker Ocak (Tez-San-Türkiye)	Liken örneklerinin kültüre alınması
GPS (Garmin marka etrex summit)	GPS kayıtları elde edilmesi
Stereo mikroskoplar Micros (SZ45) ve Olympus (SZ61) (Japonya)	Liken örneklerinin tayini ve Liken örneklerinin görüntülenmesi
Gradient Thermal Cycler 96 Örneklik (Biorad-ABD)	Genomda hedef bölgenin <i>in vitro</i> çoğaltımı
Agaroz Jel Elektroforezi Gereçleri (Thermo-ABD)	DNA izolasyonu ve PZR sonucu oluşan ürünlerinin varlığı ve miktarının tespiti
UV Transilluminatör (Vilber Lourmat-Fransa)	DNA izolasyonu ve PZR sonucu oluşan ürünlerin UV ışık altında tespiti
UV Görüntüleme Kabini (CAMAG UV Cabinet)	Jelden hedef bölgenin kazanımı için UV ışıktan korunma amacıyla
Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge® 18 Microcentrifuge)	DNA izolasyonu ve jel kazanımı esnasında örneklerin çöktürülmesinde
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı (Labnet-ABD)	Tampon çözeltilerinin hazırlanmasında
Isıtmalı Çalkalayıcı Tabla (Esco- Singapur)	DNA izolasyonu sırasında
Fotometre (RQFEKX PLUS (Tayvan)	Işık şiddeti ölçümü
MagNa Lyser (Roche-Almanya)	Homojenizasyon işlemi

2.1.3. Kullanılan besiyerleri ve kimyasalların hazırlanması

Lysogeny Broth (LB) sıvı besiyerinin hazırlanması

10 g Tripton, 5 g Maya özütü, 5 g NaCl içeren hazır haldeki toz LB brothtan 20 g tartılarak, distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti ısıtıcıda kaynayana kadar karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Homojen haldeki karışım 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Besiyerleri soğuduktan sonra +4-8 °C'de buzdolabında kullanıma kadar saklanmıştır.

Lysogeny Broth agar (LB agar) katı besiyerinin hazırlanması

20 g LB broth ve 12 g agar tartılarak, hacmi 1000 ml'ye tamamlanacak şekilde distile su içinde çözülmüştür. Çözelti ısıtıcıda kaynayana kadar karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Homojen haldeki karışım 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavlanmış besiyeri yeterli derecede soğuduktan sonra kabin içinde 90 mm'lik petri kaplarına dağıtılmıştır. Besiyerleri katılaştıktan sonra +4-8 °C'de buzdolabında kullanıma kadar saklanmıştır.

Malt-yeast agar besiyeri hazırlanması

20 g Malt ekstrakt, 2 g yeast ekstrakt, 20 g agar tartılarak, hacmi 1000 ml'ye tamamlanacak şekilde distile su içinde çözülmüştür. Çözelti ısıtıcıda karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Homojen karışım 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavlanmış besiyeri yeterli derecede soğuduktan sonra kabin içinde 24'lük plakalara dağıtılmıştır. Besiyerleri kullanılıncaya kadar +4-8 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

CTAB (Setil Trimetil Amonyum Bromid) çözeltisi hazırlanması

2,0 g CTAB (Setil Trimetil Amonyum Bromid)

10,0 ml 1 M Tris pH 8,0,

4,0 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (Etilen Diamin Tetraasetikasit DisodyumTuzu),

28,0 ml 5 M NaCl,

1 g PVP (polyvinyl pyrrolidone)

100 ml'ye steril distile su ile tamamlanarak otoklavlanmıştır ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

5x TBE (Tris Borikasıit EDTA) Tamponu

54 g Tris baz

27,5 g Borik asit

20 ml 0,5M EDTA (pH 8.0) 1 L'ye tamamlanmıştır. 1:5 oranında sulandırılarak 1x TBE tamponu elde edilmiştir.

2.1.4. Liken materyalinin temini, tayini ve saklanması

2.1.4.1. Materyal toplama çalışmaları

Çalışmamızda Bursa Uludağ Kestel Alaçam/Alaçam Milli Parkı lokalitelerinden taze liken örnekleri toplanmıştır (Şekil 2.1). Arazide toplanan örnekler kese kâğıtları içinde muhafaza edilmiş ve havalandırılmıştır. Zarfların üzerlerine toplandığı yer, yükseklik, tarih, substrat tipi yazılmıştır. Toplanan liken örneklerine ait GPS, yükseklik, toplama tarihi Tablo 2.2'de verilmiştir. Toplanan liken örnekleri Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Herbaryumu'na (MUFE) getirilmiştir. Kültürü yapılacak örnekler temizlenerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.1. Arazi çalışması aşaması

Tablo 2.2. Liken örneklerinin toplandığı istasyonlara ait bilgiler

Lokalite	İst. No	GPS kayıt	Yükselik	Tarih
Bursa Uludağ Kestel Alaçam	İst. 1	N 40° 06' 44,3" E 29° 17' 27,6"	1168 m	20.09.2015
Bursa Uludağ Kestel Alaçam	İst. 2	N 40° 06' 48,4" E 29° 17' 14,5"	1115 m	20.09.2015
Bursa Uludağ Kestel Alaçam	İst. 3	N 40° 06' 01,6" E 29° 17' 11,2"	1600 m	20.09.2015

2.1.4.2. Liken türlerinin tayin çalışmaları

Araziden toplanan likenlerin, tür tayini liken mikota kitapları ve tayin anahtarları esas alınarak stereo mikroskop (Olympus) ile morfolojik ve spot testler (K, C, I, P, N) uygulanarak kimyasal gözlemler sonucunda klasik sistematığe göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2). Buna göre çalışmamızda kullanılmak üzere seçilen liken örneklerimizin türü *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. olarak belirlenmiştir. Tür tayini aşamasında temel kaynak olarak Smith ve ark. (2009) kullanılmıştır [25]. Örneklerin her biri substratlarından ve etrafında bulunabilecek yabancı maddelerden (farklı likenler, karayosunları, bitki veya toprak vb.) arındırılarak ayrı ayrı etiketlenilerek stoklanmıştır.



Şekil 2.2. *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. liken türü

2.1.5. Bakteri suşlarının temini, saklanması ve çoğaltılması

Çalışmamızda kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 CECT 4122 yurt dışından satın alınmıştır. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakteri suşları Yeditepe Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Bakteri suşlarından öncelikle LB broth besiyerine ardı ardına 2 kez pasaj alınmıştır. Sonrasında bakteri stok kültürleri hazırlanarak - 86 °C'de (Esco) %50 gliserol içerisinde muhafaza edilmiştir. Deney sırasında kullanmak amacıyla tekrar stok kültürden LB broth besiyerine ardı ardına 2 kez pasaj alınmış ve sıvı besiyerinde gelişen kültürlerin saflığı çizgi plak yöntemi ile LB agar besiyerinde test edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Doğadan toplanan *Hypogymnia tubulosa* örneklerinin bakterilerin büyüme eğrisi ve biyofilm formu üzerindeki aktivitelerinin incelenmesi

Doğadan toplanan *H. tubulosa* örnekleri kültüre alınmadan önce bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla test edilmişlerdir. Bu amaçla örnekler öncelikle büyüme eğrisine etki ve antibiyofilm testine tabi tutulmuştur.

2.2.1.1. *H. tubulosa* liken örneklerinden özüt elde edilmesi

Bursa Uludağ Kestel Alaçam/Alaçam Milli Parkı lokalitesinden toplanan ve teşhis edilen *H. tubulosa* örnekleri toprak, kabuk, karayosunu vb. yabancı maddelerden temizlenerek yıkanmış ve kurutulmuştur. Liken örnekleri kuruduktan sonra 3 gr *H. tubulosa* tartılarak alınmış ve steril havanlarda ezilerek toz haline getirilmiştir. Liken parçaları steril falkon tüpe alınıp üzerlerine 35 mililitre aseton eklenmiştir. Falkon tüp 24 saat boyunca karanlık bir ortamda bekletilmiş, daha sonra çözelti kurutma kağıdı ile süzülerek steril cam petrilere aktarılmıştır. Cam petrilere bulunan liken özütü, çözücülerinin uçması için çeker ocakta (Tez-San) 24 saat boyunca bekletilmiştir. Çözücüsü uçtuktan sonra toz halindeki liken özütü steril santrifüj tüpe alınmış ve özüt toz ağırlığı 0,05 g tartılmıştır (Şekil 2.3).

Steril falkon tüpler içerisindeki toz liken özütleri 5 ml %100'lük Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck) 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.

2.2.1.2. Bakterilerin belirli bir konsantrasyona göre ayarlanması

S. aureus ATCC 25923 suşu 37 °C'de bir gece inkübe edildikten sonra testlerde kullanılacak kültürler spektrofotometrede OD: 625 nm'de (Beckman-Coulter) ölçülerek 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5 \times 10^8$ cfu/ml) standardına göre ayarlanmıştır.



Şekil 2.3. Özüt çıkarma aşamaları

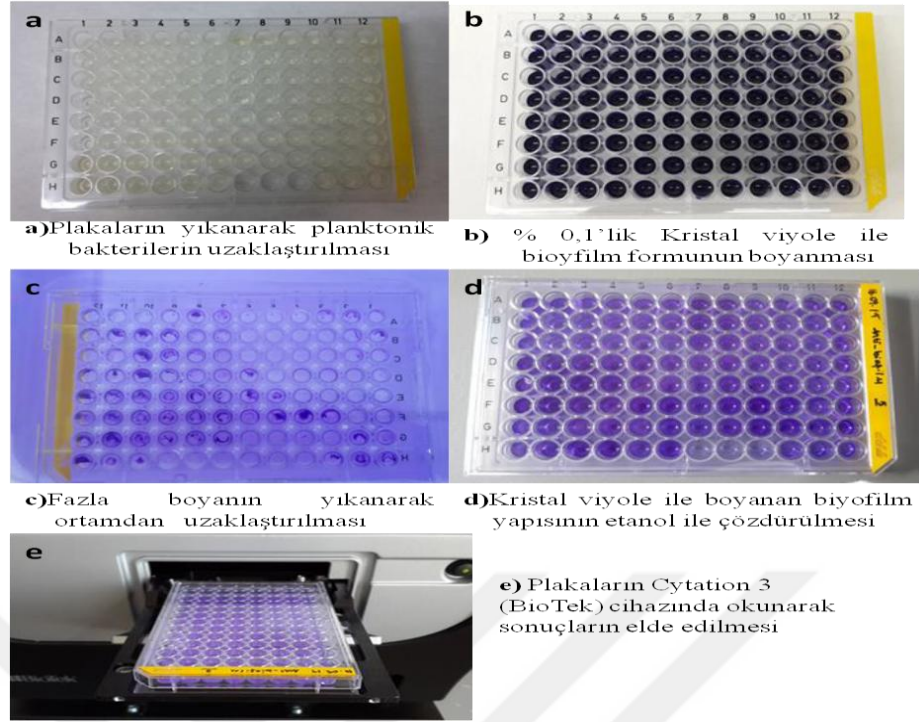
2.2.1.3. Özütlerin bakterilerin büyüme eğrisi üzerindeki etkilerinin incelenmesi

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

2.2.1.4. Özütlerin bakterilerin anti-biyofilm özelliklerinin incelenmesi

H. tubulosa aseton özütlerinin *S. aureus* biyofilm formu üzerindeki etkinlik testleri 96 kuyucuklu şeffaf mikropalakalar kullanılarak seri mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 0,5 McFarland standardında hazırlanan bakteri süspansiyonu LB broth besiyeri ile 1:100 oranında dilüe edilmiş ve kör olarak kullanılan kuyucuklar hariç tüm kuyucuklara 100 µl seyreltilmiş bakteri süspansiyonundan konulmuştur. Test edilecek liken özütlerinden ilk kuyucukta 240 µg/ml olacak şekilde özüt eklenmiştir. Diğer kuyucuklara seri mikrodilüsyon yöntemi ile dozlar yarıya inecek şekilde liken özütleri eklenmiştir. Biyofilm testi okumalarında kör olarak kullanılmak üzere 3 kuyucuk boş bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak sadece seyreltilmiş bakteri süspansiyonu içeren gruplar kullanılmıştır. Mikroplakanın tüm kuyucuklarındaki son hacim 100 µl olarak ayarlanmıştır. Mikropalakalar 37 °C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

24 saatlik inkübasyonun ardından mikropalakadaki tüm kuyucuklar planktonik bakteri hücrelerinin ortamdaki uzaklaştırılması için boşaltılmış ve 3 defa distile su ile yıkanmıştır. Distile su ile yıkanan mikropalakalar 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 ortamdaki uzaklaştırılması için kuyucuklar 3 defa distile su ile yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Mikropalakaların kurummasının 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 3 kez tekrarlanmıştır (Şekil 2.4).



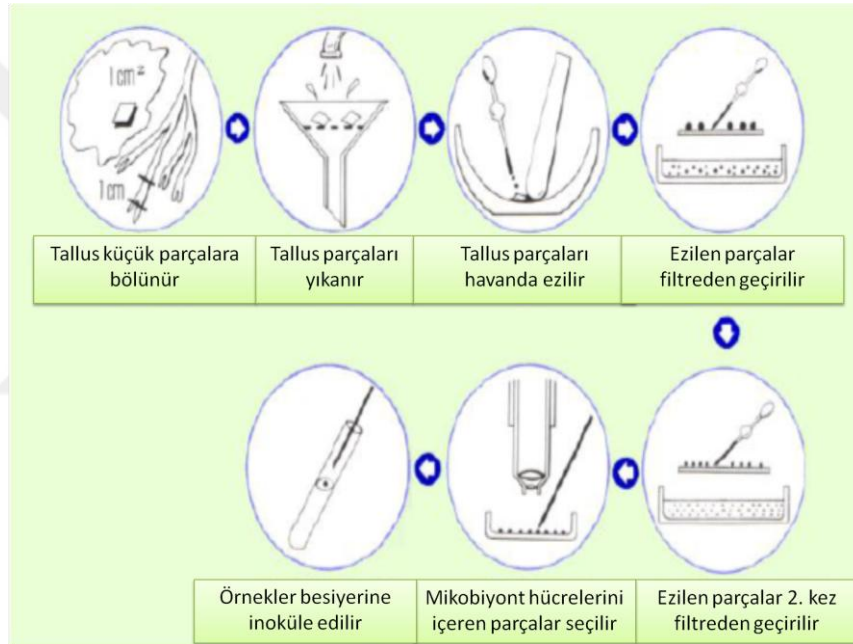
Şekil 2.4. Anti-biyofilm test aşamaları

2.2.2. Doğadan toplanan *Hypogymnia tubulosa* örneklerinin kültüre alınması

Antimikrobiyal etkisi gözlenen liken örneklerinin yapısında bulunan mantar türü izole edilerek Yamamoto (2002) protokolüne uygun olarak kültüre alınmıştır [109]. (Şekil 2.5).

- Bursa lokalitesinden taze örnekler toplanmıştır.
- Liken örnekleri stereo mikroskop (Olympus) altında incelenmiştir.
- Tür teşhisi yapıldıktan sonra *H. tubulosa* örneklerinin yaklaşık 1 cm'lik tallus parçaları temiz petriye alınmıştır.
- Kesilen tallus parçaları özel tasarlanmış falkonlarda 1-1,5 saat akan suyun altında yıkanmıştır.
- Kesilen tallus parçaları son olarak steril distile su ile yıkanmıştır.
- Yıkanan tallus parçaları steril havana alınmış ve üzerine 1 ml steril su eklenerek ezilmiştir.
- Havadaki ezilmiş liken parçaları 3 ml'lik şırıngaya toplanmıştır.

- Şırınga içindeki örnekler filter holder kullanılarak önce 180 mikronluk filtre ile filtre edilmiştir ve filtre steril petriye alınmıştır.
- Filter holder kullanılarak 180 mikronluk filtreden geçen örnekler tekrar 100 mikronluk filtreden geçirilmiştir ve filtre steril petriye alınmıştır.
- Stereo mikroskop altında filtreler incelenerek şeffaf görünen (yeşil olmayan) mikobiyont parçaları steril kürdan veya lanset yardımıyla MYA besiyeri içeren 24'lük plakaların kuyucuklarına ayrı ayrı inoküle edilmiştir.
- Plakaların etrafı parafilm ile sarılmış ve örnekler 15 °C'de soğutmalı inkübatörde (Memmert) inkübe edilmiştir.



Şekil 2.5. Kültüre alma aşamaları [109]

2.2.3. Kültürde çoğalan örneklerin pasaj geçilmesi

24'lük plakalara alınan *H. tubulosa* mikobiyont parçaları sık sık mikroskop altında incelenerek büyümeleri takip edilmiştir. Kontaminasyon durumunda temiz örnekler yeni plakaya alınmıştır. Büyüyen örnekler her ay yeni besiyerine pasaj geçilmiştir. Yeterince büyüyen örnekler küçük parçalara bölünerek tekrar 24'lük plakalara pasaj geçilmiş ve örnek sayısı artırılmıştır.

2.2.4. Kültür rneklerinin moleküler tür tayini

2.2.4.1. DNA izolasyonu

H. tubulosa mikobiyont kültür örneklerinden DNA izolasyonu modifiye edilmiş CTAB yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [155].

Protokole uygun olarak DNA izolasyonu için;

- Kültür örneklerinden 0,1 g örnek hassas terazide tartılmıştır.
- Örnekler sıvı azot yardımıyla steril havanlarda toz haline getirilmiştir.
- Toz halindeki örnekler 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınarak kullanılıncaya kadar -20°C de tutulmuştur.
- İzole edilecek örneklerin üzerine ısıtılmış CTAB çözeltisinden 1 ml ve 0,2 % β -merkaptetanol (Merck) eklenmiştir.
- Steril Cam boncuklar eklendikten sonra tüpler MagNa Lyser (Roche) cihazına yerleştirilmiş ve 7000 devirde yaklaşık 1 dk homojenize edilmiştir.
- Homojenat içine proteinaz K eklenerek 30 dk 37°C'de ve sonra 30 dk 55°C'de çalkalayıcı ısıtma tablasında inkübasyona bırakılmıştır.
- Homojenat inkübasyondan sonra 12 000 rpm'de 5 dk santrifüj (Beckman Coulter) edilmiş ve süpernatant (st faz) kısımları 2 ml'lik steril ependorflara alınmıştır.
- Süpernatant zerine 0,5 ml kloroform/2-orsinol (Merck) karışımı (24:1 V/V) eklenmiştir.
- 14000 rpm'de 2 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant steril ependorfa alınmıştır.
- Süpernatant zerine bir hacim 3 M sodyum asetat (NaOAc) (pH 5) ve soēuk izopropanol (Merck) eklenerek yavaş hareketlerle karıştırılmıştır.
- Tüpler 1 saat -20°C'de bekletildikten sonra 14000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Tüplerin süpernatant kısımları atılarak dibinde kalan peletler elde edilmiştir.
- Pelet zerine % 96'lık soēuk etanol (Merck) eklenerek 14 000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Bu işlem sonucunda alkol dökülerek, pelet üzerine % 70'lik soēuk etanol eklenerek tüpler tekrar 14 000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Bu yıkama işlemi iki defa tekrarlanmış, etanolün uzaklaştırılması için tüpler havada kurutulmuştur.
- Tüplere 50-100 μ l TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) eklenmiştir ve 65 °C 'de 15 dk ısıtılmalđ çalkalayıcı tablada peletin çözünmesi için bekletilmiştir.

- DNA içerdiği düşünülen tüpler elektroforez işlemi yapılıncaya kadar +4 °C’de bekletilmiş daha sonra uzun süre saklanmak için -20 °C’ye alınmıştır.

2.2.4.2. DNA saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi

İzolasyon ürünlerinin miktarı ve saflık derecesinin belirlenebilmesi için 2 yöntem uygulanmıştır. Birinci yöntem olan agaroz jel elektroforezinde (Thermo); etidyum bromür boyası içeren % 0.8-1’lik agaroz jel üzerinde yürütülen izolasyon ürününün DNA içerip içermediği jel görüntüleme sisteminde belirlenmiştir. % 1’lik agaroz jeli hazırlamak için 40 ml 1 X TBE tampona 0,4 gr agaroz eklenerek mikrodalga fırında agaroz tamamen çözününceye kadar ısıtılmıştır. Bu işlemten sonra çözeltinin 45 °C’ye kadar soğuması beklenmiş ve üzerine 3 µl etidyumbromür (EtBr) (10mg/ml) eklenerek uygun taraklar yerleştirilmiş kasete jel boşaltılarak donması beklenmiştir. Agaroz jelin donmasından sonra kaset tanka yerleştirilmiş ve tankın içerisine agaroz jelin yüzeyini kaplayıncaya kadar 1 X’lik TBE tamponu eklenmiştir. Daha sonra 5 µl DNA üzerine aynı miktarda 6X yükleme boyası (“loading dye”) eklenerek örnekler kuyucuklara yüklenmiştir. Moleküler ağırlık cetveli olarak “Fermentas” firmasının 100 bp’lik cetveli kullanılmıştır. Elektroforez işlemi 100 voltta 30 dk koşturularak gerçekleştirilmiştir. Jel görüntüleme sisteminde gözlenen DNA varlığı fotoğraflanarak bilgisayara kaydedilmiştir.

İkinci yöntemde Cytation 3 (BioTek) cihazı kullanılarak 260/280 nm değerine göre izole edilen DNA’nın saflık derecesi ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu konsantrasyon değerlerine göre örnekler için dilüsyon oranları hesaplanmış ve her bir tüpte 50 ng/µl olacak şekilde aligotlara ayrılarak kullanılıncaya kadar -20 °C’de derin dondurucuda saklanmıştır.

2.2.4.3. Hedef bölgenin PZR ile çoğaltılması

Örneklerin tür tayinini gerçekleştirmek amacıyla izole edilen ve konsantrasyonu belirlenen DNA’ların 18S rRNA kısmı, Ribozomal DNA transkripsiyon arası (ITS1, ITS2) bölgelerinin tamamı, 5.8.rDNA geni tamamı ve 28S rRNA kısmı gen bölgesinin çoğaltılması polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gerçekleştirilmiştir. Hedef bölgenin çoğaltılması için mantara özgü ITS primerleri tercih edilmiştir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Tür tayininde kullanılan ITS bölgesine uygun primerler

Primer Kod	Primer Adı	Primer Dizisi	Tm
Primer F	ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	57
Primer R	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	57

Konsantrasyonları 100 pmol olacak şekilde sulandırılarak hazırlanan stok primerler, PZR sırasında kullanmak üzere 10 pmol konsantrasyonuna seyreltilip, aligotları oluşturulmuştur. PZR’de istenilen hedef gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla protokole göre PZR cihazı (MyCycler Personal Thermal Cycler Biorad (Gradient) ile istenilen gen bölgesinin kopyalanma işlemi gerçekleştirilmiştir.

PZR için belirlenen protokol,

Reaksiyon bileşenleri

DNA (50 ng/ µl)	1 µl
Tampon çözelti (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,25 µl
dNTP karışımı (2 mM)	2,5 µl
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0,2 µl
Primer F (10 pmol)	1 µl
Primer R (10 pmol)	1 µl
Steril ultra saf su	15.55 µl

Toplam hacim 25 µl

Döngü Koşulları

95 °C 4 dakika (ilk denaturasyon)	}	30 döngü
95 °C 1 dakika (denaturasyon)		
57 °C 1 dakika (primer bağlanması)		
73 °C 1 dakika (uzama)		
73 °C 7 dakika (son uzama)		
4 °C ∞ son		

Bu protokol uygulanarak elde edilen PZR ürünleri elektroforezde (Thermo) % 2’lik jelde 6X yükleme boyası ile karıştırılarak hazırlanan 10 µl’lik örneklerin her biri ayrı kuyucuğa yüklenerek 100 voltta 30 dk yürütülmüştür. Çoğaltılan hedef DNA

bölgesinin moleküler ağırlığı 100 bp'lik moleküler ağırlık cetveli kullanılarak belirlenmiştir. Ürünlerin jel fotoğrafları jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat-Fransa) kullanılarak görüntülenmiştir.

2.2.4.4. Jelden geri kazanım

UV Jel Görüntüleme Cihazında (CAMAG UV-Cabinet II) görüntülenen en parlak ve belirgin bantlar jelden geri kazanılmıştır. Geri kazanım için yüksek saflıkta PZR ürünlerinin pürifikasyon kiti (Roche) tercih edilmiştir. ITS bölgesinin agaroz jelden pürifikasyonu üretici firma tarafından kitin üzerinde belirtilen protole uygun olarak yapılmıştır.

Geri kazanım basamakları;

- Jelden alkol ile temizlenmiş bir jilet veya skapel yardımıyla ultraviyole ışık altında kesilen PZR ürünleri 1,5 ml'lik steril tüplere alınmıştır.
- 1,5 ml'lik tüplerde bulunan yaklaşık 100-200 mg olan agaroz jel üzerine 300- 600 µl bağlayıcı solüsyon eklenmiştir.
- 15–20 sn hafifçe karıştırıldıktan sonra 56 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 10 dk inkübe edilmiştir.
- Jel eridikten sonra her tüp içine 150 µl izopropanol (Merck) eklenerek hafifçe çalkalanmıştır.
- Inkübasyon sırasında kit ile birlikte gelen filtreli tüpler toplama tüplerinin içine yerleştirilmiştir. Örnekler mikropipet yardımıyla filtrelerin üst yüzeyine bırakılmıştır.
- Hedef DNA bölgesinin filtreye yapışması 13000 devirde 1 dk santrifüj edilerek sağlanmış ve daha sonra toplama kabında biriken atıklar dökülmüş, filtreli tüpler tekrar toplama kabına yerleştirilmiştir.
- Tüplere 500 µl yıkama solüsyonu (Washing buffer) filtrenin üzerine gelecek şekilde eklenmiş ve 13000 devirde 1 dk santrifüj (Beckman Coulter) edilerek DNA parçalarının jel atıklarından uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Toplama kaplarındaki atıklar tekrar boşaltılmış ve filtreler yeniden toplama kaplarına yerleştirilmiştir.
- Filtreli tüplere ikinci defa 200 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 13000 devirde 1dk santrifüj edilmiş ve toplama tüpleri atılmıştır.
- Filtreler 1,5 ml'lik steril ependorf tüplere yerleştirilmiş, üzerine 50 µl ayırma

solüsyonu (Elution Buffer) tam filtre üzerine gelecek şekilde pipetle bırakılmış ve 1–3 dk kadar bekletilmiştir.

- Tüpler 13000 devirde 1dk kadar santrifüj edilerek istenilen DNA bölgelerinin elution buffer ile birlikte steril tüpe geçmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen son ürün % 1,5 lik jelde yürütülerek (Thermo) geri kazanımın sonucu kontrol edilmiştir ve fotoğraflanmıştır.

2.2.4.5. Dizi analizi

Hedef DNA bölgesi, PZR sonucunda çoğaltılmış ve jelden geri kazanılarak dizi analizine alınmıştır. Pürifikasyon ile elde edilen ürünler yeni nesil dizileme sistemi (Applied Biosystems) ile diziletilmiştir. Çift yönlü dizilerin kendi içinde uyumları kontrol edilerek verilerin doğruluğu teyit edilmiştir. Diziler GenBank'taki (NCBI) verilerle BLAST programı kullanılarak kontrol edilmiştir. Dizilerin eşleşme yüzdelere göre tür tayini gerçekleştirilmiştir [156].

2.2.4.6. Filogenetik analiz

H. tubulosa mikobiyont örneklerine ait diziler BLAST yapılarak GenBank'taki verilere uygunluğu belirlendikten sonra *Hypogymnia* cinsine ait ITS hedef bölgesi kullanılarak elde edilmiş bazı türlerin dizileri NCBI veri tabanından fasta formatında indirilmiştir (Tablo 2.4) [156]. Tüm dizilerin ClustalX 2.0, BioEdit ve MEGA4 programı ile çoklu dizi hizalaması (Multiple alignment) yapılmıştır. Hizalanmış olan diziler kullanılarak MEGA4 programında farklı metotlar (NJ, MP) kullanılarak türlerin gruplaşmasını gösteren dendrogramlar çizilmiştir. Dendrogramların güvenilirliği 1000 kez "Bootstrap" testi yapılarak kontrol edilmiştir [157-159].

Tablo 2.4. GenBank'tan indirilen ITS bölgesi dizilerine ait GenBank erişim numaraları

Tür Adı	GenBank Erişim No
<i>Hypogymnia apinnata</i>	EU707811.1
<i>Hypogymnia austerodes</i>	KM250204.1
<i>Hypogymnia enteromorpha</i>	HQ725078.1
<i>Hypogymnia farinacea</i>	KX132947.1
<i>Hypogymnia flavida</i>	KU187958.1
<i>Hypogymnia fragillima</i>	KJ690239.1

Tablo 2.4. devamı

<i>Hypogymnia fujisanensis</i>	HQ725079.1
<i>Hypogymnia imshaugii</i>	HQ725032.1
<i>Hypogymnia inactiva</i>	HQ725086.1
<i>Hypogymnia incurvodes</i>	HQ725089.1
<i>Hypogymnia incurvodes</i>	HQ680617.1
<i>Hypogymnia metaphysodes</i>	AB205370.1
<i>Hypogymnia minilobata</i>	EU707809.1
<i>Hypogymnia mollis</i>	HQ680604.1
<i>Hypogymnia occidentalis</i>	EU707820.1
<i>Hypogymnia physodes</i>	AF058036.1
<i>Hypogymnia physodes</i>	JF800094.1
<i>Hypogymnia submundata</i>	AB205373.1
<i>Hypogymnia subphysodes</i>	HQ680616.1
<i>Hypogymnia taiwanalpina</i>	KU862966.1
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	HQ725075.1
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	FR799196.1
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	KX132956.1
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	JF800095.1
<i>Hypogymnia vittata</i>	KU862967.1

2.2.5. Kültürde çoğalan örneklerde metabolit üretiminin artırılması için stres uygulanması

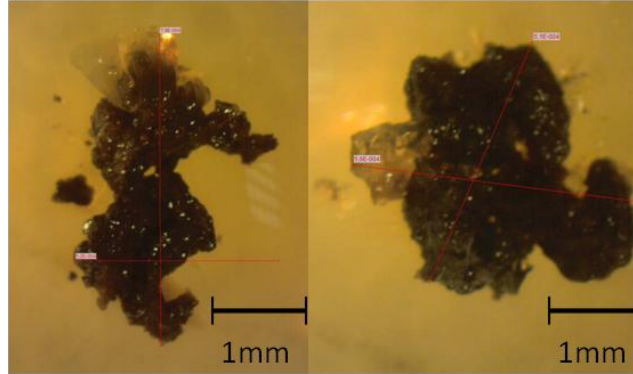
2.2.5.1. Stres uygulanacak mikobiyont örneklerinin pasaj geçilmesi ve büyümelerinin sağlanması

H. tubulosa mikobiyontları strese maruz bırakılmak üzere yeni plakalara pasaj geçilmişlerdir. Yeni pasaj geçilen *H. tubulosa* mikobiyontları test edilecek boyutlara ulaşması için 15 gün ve 30 gün süreyle 15°C'de soğutmalı inkübatörde inkübe edilerek büyütülmüşlerdir. Bu süreçte mikobiyontların büyüme oranını belirlemek için pasaj geçilen ilk gün örneklerin boyutları ölçülmüştür. 15 gün ve 30 gün süreyle bekleyen örnekler strese maruz bırakılmadan önce tekrar ölçülmüştür. Büyüme oranları hesaplanmıştır.

2.2.5.2. Kültürde çoğalan örneklerin büyüme oranlarının ölçülmesi

Liken mikobiyont kültürlerinin büyüme oranları hesaplanmıştır. Büyüme oranlarının hesaplanması için örnekler ilk gün ölçülmüş ve büyüme hızı ölçümleri yapılarak takip edilmiştir ((Şekil 2.6). Örnekler 1 ay sonra tekrar ölçülmüştür. Ölçümler sırasında stereo mikroskop yardımıyla LC20 model kamera (Olympus) kullanılarak aynı

büyütme ve zoomda ölçümler yapılmıştır. Ölçümler kaydedilerek büyüme oranı hesaplanmıştır.



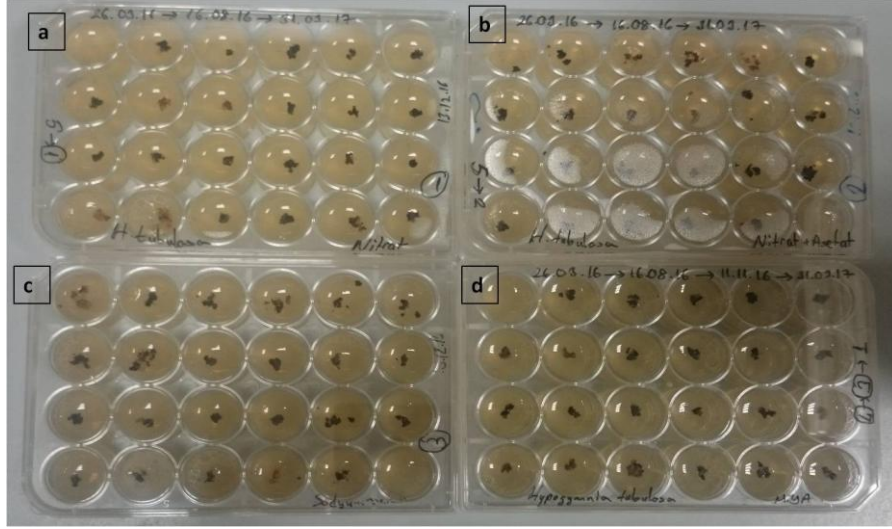
Şekil 2.6. Mikobiyont boyutunun ölçümü

2.2.5.3. Örneklerin nitrat ve asetat içeren besiyerinde strese maruz bırakılması

Liken mikobiyontlarının strese maruz bırakılarak metabolit üretiminin artırılması amacıyla mikobiyontlar üzerinde stres yaratacak koşullar oluşturulmuştur (Şekil 2.7). *H. tubulosa* mikobiyontunun strese girmesini sağlamak için besiyerine azot kaynağı ve metabolit üretim yolağında kullanıldığı bilinen asetil-CoA miktarını artırmak hedefiyle asetat kaynağı eklenmiştir. Bunun için yapılan literatür araştırması sonucunda dozlar belirlenmiştir. Tablo 2.5'deki deney grupları oluşturulmuştur.

Tablo 2.5. Nitrat ve asetat stres koşulları

Kod	Stres koşulu	Besiyeri İçeriği	Stres Süresi	Örnek sayısı
HSK	Kontrol	Malt-yeast-agar besiyeri	30 gün	23
HS1	Nitrat	0,25 M Potasyum nitrat	30 gün	23
		Malt-yeast-agar besiyeri		
HS2	Nitrat-Asetat	0,25 M Potasyum nitrat	30 gün	23
		% 0,25 Sodyum asetat		
		Malt-yeast-agar besiyeri		
HS3	Asetat	% 0,25 Sodyum asetat	30 gün	23
		Malt-yeast-agar besiyeri		



Şekil 2.7. Karbon ve azot kaynağı nitrat ve asetat stres uygulaması: Nitrat (a), nitrat-asetat (b), asetat (c), kontrol (d) besiyerlerinde çoğaltılması

2.2.5.4. Örneklerin sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılması

H. tubulosa mikobiyontlarından 15 ve 30 gün süreyle büyüyen örnekler 72 saat boyunca 15 ve 37 °C'de bekletilerek sıcaklık stresine, ışıklı ve karanlık ortamda bekletilerek ise ışık stresine maruz bırakılmıştır (Tablo 2.6).

Sıcaklık stresi için 15 ve 37 °C'lik etüvler kullanılmıştır. Işık ve karanlık stresi için plakaların yarısı folyo ile kaplanarak karanlıkta bırakılırken üstü kaplanmayan diğer yarısı 960,3 lux'lük ışık şiddetine maruz bırakılmıştır (Şekil 2.8). Işık şiddeti fotometre (Rqfekx Plus) ile ölçülmüştür.



Şekil 2.8. Sıcaklık ve ışık stres uygulaması

Tablo 2.6. Sıcaklık ve ışık stres koşulları

Kod	Stres koşulu		Süre (saat)	Büyüme Süresi	Örnek sayısı
	Sıcaklık (°C)	Işık			
HK	15°C(Kontrol)	Karanlık	72	30 gün	23
H1	37 °C	Işık	72	15 gün	23
H2	37 °C	Karanlık	72	15 gün	23
H3	15°C	Işık	72	15 gün	23
H4	15°C	Karanlık	72	15 gün	23
H5	37°C	Işık	72	30 gün	23
H6	37°C	Işık	72	30 gün	23
H7	37°C	Işık	72	30 gün	23
H8	37°C	Karanlık	72	30 gün	23
H9	37°C	Karanlık	72	30 gün	23
H10	37°C	Karanlık	72	30 gün	23
H11	15°C	Işık	72	30 gün	23
H12	15°C	Işık	72	30 gün	23
H13	15°C	Işık	72	30 gün	23
H14	15°C	Karanlık	72	30 gün	23
H15	15°C	Karanlık	72	30 gün	23
H16	15°C	Karanlık	72	30 gün	23

2.2.6. Kültürde çoğalan *H. tubulosa* türünün PKS gen bölgesinin analizi

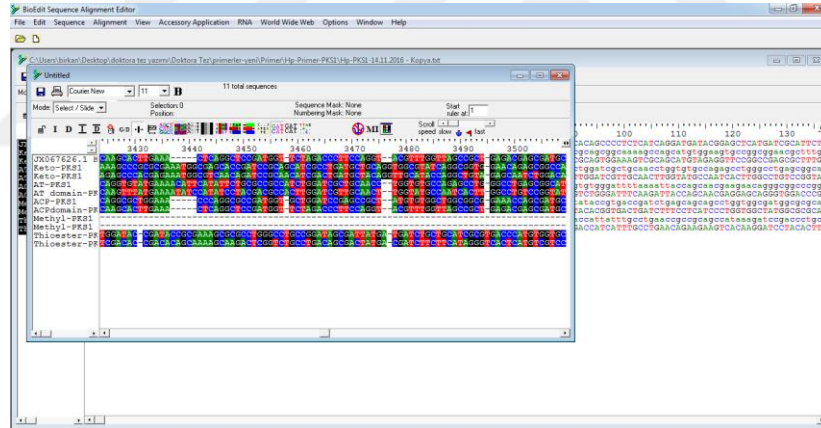
2.2.6.1. PKS gen bölgesinin seçilmesi

Literatür incelemesi sonucunda poliketid sentezinden sorumlu genlerin poliketid sentezinde görevli enzimlerin sentezinde etkili olduğu görülmektedir. *H. tubulosa* türünün PKS gen bölgesine ait hiç bir veri bulunmamaktadır. Bu nedenle *Hypogymnia* cinsine ait PKS gen bölgeleri ve PKS enzimlerine ait protein dizileri NCBI'dan indirilerek KS, ACP, AT, CMeT, TE dizi bölgeleri tespit edilerek tüm bölgelere ait nükleotit dizileri elde edilmiştir (Tablo 2.7). Gen bölgeleriyle ilgili çalışmalar PKS gen bölgesi üzerinde asetilCoA molekülü üzerine etki eden enzimlerin sentezinden sorumlu

ACP, AT dizilerinin varlığını ortaya koymaktadır. ClustalX 2.0, BioEdit ve MEGA4 programı ile çoklu dizi hizalaması (Multiple alignment) ile ACP ve AT dizileri belirlenmiştir (Şekil 2.9). Bu diziler kullanılarak *H. tubulosa* türünde çalışması beklenen primerler dizayn edilmiştir.

Tablo 2.7. Kullanılan örneklere ait bilgiler ve GenBank erişim numaraları

Tür Adı	GenBank Erişim No	Açıklama	Araştırmacı
<i>Hypogymnia physodes</i>	JX067626.1	non-reducing polyketide synthase 1 (pks1) gene	Jae-Seoun Hur
<i>Hypogymnia physodes</i>	JX067627.1	non-reducing polyketide synthase 2 (pks2) gene	Jae-Seoun Hur
<i>Hypogymnia physodes</i>	AFO67255	non-reducing polyketide synthase 1-Protein	Jae-Seoun Hur
<i>Hypogymnia physodes</i>	AFO67256	non-reducing polyketide synthase 2-protein	Jae-Seoun Hur



Şekil 2.9. Gen bölgesinin seçimi (Bio-Edit programı)

2.2.6.2. Primer dizaynı

Liken PKS bölgesini çoğaltmak için Primer3 programıyla spesifik primerler dizayn edilmiştir (Tablo 2.8) [160]. Referans gen bölgesi olarak aktin geni kullanılmıştır. Referans gen için uygun primerler dizayn edilmiştir.

2.2.6.3. Primerlerin optimizasyonu

Primer3 programıyla dizayn edilen spesifik primerler konsantrasyonları 100 pmol olacak şekilde sulandırılarak stoklanmıştır (Tablo 2.8). Stok primerler PZR sırasında kullanmak üzere 10 pmol konsantrasyonuna seyreltilip, aligotları oluşturulmuştur. PZR’de istenilen hedef gen bölgesinin başarıyla çoğaltılması için primerlerin optimum sıcaklık derecesinin ve MgCl₂ konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle belirlenen protokole göre PZR cihazı (MyCycler Personal Thermal Cycler Biorad (Gradient) ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar için 50 - 60°C arasında çeşitli sıcaklık dereceleri; 2,5 ve 3 µl olacak şekilde MgCl₂ konsantrasyonları denenmiştir. Optimizasyon sonucu 3 µl MgCl₂ konsantrasyonu ve Tablo 2.8 'de verilen Tm değerleride optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

Tablo 2.8. Liken PKS bölgesini çoğaltmak için dizayn edilen primerler

Primer Kod	Primer Dizisi (5'→3')	Uzunluk (bp)	Tm	GC%
H1F	ATCGATCAATGGGTCCGCTC	20	53	55.00
H1R	CGTAGGGGCAGATACAGCAG	20	53	60.00
H2F	TATCGCCAGTCCAATCGCTC	20	60	55.00
H2R	CCCCAGCAATCCCTCACAAT	20	60	55.00
ACT-F1	ATGAAGATCTTRGCTGAGCG	20	54	50.00
ACT-R1	GAYCTCTGGYTGGCGGTCTG	20	54	60.00

2.2.6.4. *H. tubulosa* mikobiyontuna ait PKS gen bölgesinin dizilenmesi

H. tubulosa PKS gen bölgesinin belirlenmesi için daha önce *H. tubulosa* mikobiyontundan elde edilen DNA kullanılarak H1 ve H2 primerleriyle PZR cihazında (MyCycler Personal Thermal Cycler Biorad (Gradient) optimize edilmiş protokol uygulanarak istenilen gen bölgesinin kopyalanma işlemi gerçekleştirilmiştir.

PZR için belirlenen protokol,

Reaksiyon bileşenleri

DNA (50 ng/ µl)	1 µl
Tampon çözelti (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
dNTP karışımı (2 mM)	2,5 µl
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0,2 µl
Primer F (10 pmol)	1 µl

Primer R (10 pmol)	1 µl
Steril ultra saf su	15,3 µl
Toplam hacim 25 µl	

Döngü Koşulları

95 °C 4 dakika (ilk denaturasyon)	}	30 döngü
95 °C 1 dakika (denaturasyon)		
54 °C /60°C 1 dakika (primer bağlanması)		
73 °C 1 dakika (uzama)		
73 °C 7 dakika (son uzama)		
4 °C ∞ son		

Bu protokol uygulanarak elde edilen PZR ürünleri elektroforezde % 2'lik jelde 6X yükleme boyası ile karıştırılarak hazırlanan 10 µl'lik örneklerin her biri ayrı kuyucuğa yüklenerek 100 voltta 30 dk yürütülmüştür. Çoğaltılan hedef DNA bölgesinin moleküler ağırlığı 100 bp'lik moleküler ağırlık cetveli kullanılarak belirlenmiştir. Ürünlerin jel fotoğrafları jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

UV Jel Görüntüleme Cihazında (CAMAG UV-Cabinet II) görüntülenen en parlak ve belirgin bantlar jelden geri kazanılmıştır. Geri kazanım için yüksek saflıkta PZR ürünlerinin pürifikasyon kiti (Roche) tercih edilmiştir. PKS bölgesinin agaroz jelden pürifikasyonu kitin protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

2.2.6.5. *H. tubulosa* mikobiyontuna ait PKS gen bölgesi dizisinin incelenmesi ve filogenetik analiz

Hedef PKS bölgesi, PZR sonucunda çoğaltılmış ve jelden geri kazanılarak gen bölgesinin dizisi yeni nesil dizileme sistemi (Applied Biosystems) ile dizilenmiştir. Çift zincirden analizi gerçekleştirilen diziler GenBank'taki (NCBI) verilerle BLAST programı kullanılarak kontrol edilmiştir. *H. tubulosa* PKS gen bölgesine ait diziler daha sonra GenBank'a yeni veri olarak yüklenecektir. Elde edilen dizilerin PKS gen bölgesi üzerindeki konumu analiz edilmiştir.

H. tubulosa mikobiyont örneklerine ait diziler BLAST yapılarak GenBank'taki verilere uygunluğu belirlendikten sonra PKS hedef bölgesine ait tam dizisi bilinen türlerin dizileri NCBI veri tabanından fasta formatında indirilmiştir (Tablo 2.9) [156].

Tüm dizilerin ClustalX 2.0, BioEdit ve MEGA4 programı ile çoklu dizi hizalaması (Multiple alignment) yapılmıştır. Hizalanmış olan diziler kullanılarak MEGA4 programında NJ metodu kullanılarak türlerin gruplaşmasını gösteren dendrogramlar çizilmiştir. Dendrogramların güvenilirliği 1000 kez "Bootstrap" testi yapılarak kontrol edilmiştir [157-159].

Tablo 2.9. GenBank'tan indirilen PKS bölgesi dizilerine ait GenBank erişim numaraları

Tür Adı		GenBank Erişim No
<i>Dirinaria applanata</i>	<i>polyketide synthase (PKS) gene</i>	EU872212.2
<i>Cladonia grayi</i>	<i>putative non-reducing PKS (PKS2)</i>	GU930714.1
<i>Hypogymnia physodes</i>	<i>non-reducing polyketide synthase 1 (pks1) gene</i>	JX067626.1
<i>Hypogymnia physodes</i>	<i>non-reducing polyketide synthase 2 (pks2) gene</i>	JX067627.1
<i>Peltigera membranacea</i>	<i>non-reducing type I polyketide synthase (PKS4) gene</i>	HM180407.1
<i>Peltigera membranacea</i>	<i>non-reducing type I polyketide synthase (PKS6) gene</i>	HM180409.1
<i>Roccella belangeriana</i>	<i>Oorani morphotype putative non-reducing polyketide synthase-like</i>	EF682016.1
<i>Roccella montagnei</i>	<i>Oorani morphotype putative non-reducing polyketide synthase-like</i>	EF569220.1
<i>Roccella montagnei</i>	<i>putative non-reducing polyketide synthase-like gene</i>	EF569219.1
<i>Roccella belangeriana</i>	<i>putative non-reducing polyketide synthase-like gene</i>	EF569218.1
<i>Solorina crocea</i>	<i>iterative type I polyketide synthase</i>	EF554834.1
<i>Usnea longissima</i> strain CH050148	<i>non-reducing polyketide synthase (PKS1)</i>	JN408682.1
<i>Usnea longissima</i> strain CH050148	<i>polyketide synthase 1 (PKS1) gene</i>	JN580453.1
<i>Usnea longissima</i>	<i>type I polyketide synthase PKS2 (PKS2)</i>	JX232185.1
<i>Usnea longissima</i>	<i>type I polyketide synthase PKS6 (PKS6)</i>	JX232188.1
<i>Usnea longissima</i>	<i>type I polyketide synthase PKS4 (PKS4)</i>	JX232186.1
<i>Xanthoparmelia semiviridis</i>	<i>polyketide synthase (PKS1)</i>	EF547512.1
<i>Xanthoparmelia semiviridis</i>	<i>putative non-reducing polyketide synthase (NR3KS1) gene</i>	EU003878.1
<i>Xanthoparmelia substrigosa</i>	<i>strain XsmPKSI polyketide synthase type I (PKSI)</i>	KJ501919.1

2.2.7. Kültürde  o alan örneklerin stres ko ullarında PKS gen ekspresyon seviyelerinin  l  lmesi

2.2.7.1. *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinden total RNA izolasyonu

Mikobiyontlardan kaliteli total RNA izolasyonu gerçekleştirmek için literatürde adı geçen çeşitli kit ve manuel yöntemler belirlenmiştir. Bu yöntemler liken örnekleriyle test edilerek deneyin yapılacağı laboratuvar koşullarında en kaliteli RNA izolasyonu sağlayan yöntem TRIGent total RNA izolasyon kiti olarak belirlenmiştir. İzolasyona ba lamadan önce tüm malzemeler DEPC ile oluşturulan RNaz içermeyen distile su ile yıkanmış ve steril edilmiştir. Deney ortamı RNaz uzakla tırıcı solüsyonlarla temizlenmiştir. TRIGent total RNA izolasyon kiti protokolüne uygun olarak örneklerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

- Stres koşullarında bekletilen örneklerden steril koşullarda yaklaşık 50 mg mikobiyont hassas terazide tartılmıştır.
- Sıvı azot yardımıyla steril havanlarda toz haline getirilmiş örnekler 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınarak üstüne 1 ml TRIGent solüsyonu eklenmiştir.
- Ependorflara Cam boncuklar eklendikten sonra tüpler MagNa Lyser (Roche) cihazına yerleştirilmiş ve 7000 devirde yaklaşık 1 dk homojenize edilmiştir.
- Homojenizasyondan sonra örnekler fazladan hücresel membranlar, polisakkaritler ve yüksek molekül ağırlıklı DNA'yı içeren    lmeyen maddeyi homojenattan uzaklaştırmak için 2-8  C'de 10 dakika boyunca 12,000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj edilen tüplerin süpernatant kısmı temiz steril tüplere alınarak pellet kısmı atılmıştır.
- Homojenize edilen örnekler 5 dk 15~30  C'de inkübe edilmiştir.
- Homojenat  zerine 0,2 ml kloroform eklenmiştir. Tüpler 15 sn kadar elde kuvvetlice çalkalanmıştır. Çalkalanan  rnekler 2-3 dk 15~30 C'de inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra örnekler faz ayrımı için 15 dk boyunca 2-8  C'de 12,000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj edilen tüplerde faz ayrımı oluşmuştur. En altta fenol-kloroform fazı ( o unlukla protein içerir), ortada bulanık beyaz faz ( o unlukla DNA içerir) ve renksiz sulu üst faz ortaya çıkmıştır. RNA, sadece sulu fazda kalmıştır. Sulu fazın

hacminin, homojenizasyon için kullanılan TRIGent hacminin yaklaşık % 60 olması beklenir.

- Sulu, şeffaf üst faz alınarak yeni steril ependorflara aktarılmıştır. Sulu fazı içeren tüplere 0,5 ml izopropil alkol eklenmiştir. Tüpler 10 dk 15~30 °C'de inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra 2-8 °C'de 10 dakika boyunca en fazla 12,000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır. Tüplerin yan ve alt kısmında jel kıvamında RNA pelleti gözlenmiştir.
- RNA pelletinin yıkanması için tüplere 1ml % 75 etanol eklenmiştir ve tüpler yavaş hareketlerle karıştırılmıştır.
- Tüpler 2-8 °C'de 5 dakika boyunca en fazla 7500 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj edilen tüplerdeki süpernatant kısmı hızlıca tüpten uzaklaştırılmıştır.
- RNA pelletini içeren tüpler havada kurutulmaya bırakılmıştır.
- Havada kuruması sağlanan örneklerin üstüne 50-100 ml RNaz içermeyen distile su eklenmiştir. RNA'nın tam olarak çözülmesi için tüpler 55~60 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
- RNA'lar uzun süreli kullanım için -20 veya -86 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.7.2. İzole edilen total RNA saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi

Cytation 3 (BioTek) cihazı kullanılarak 260/280 nm değerine göre izole edilen RNA'nın saflık derecesi ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu konsantrasyon değerlerine göre örnekler için dilüsyon oranları hesaplanmış ve her bir tüpte 50 ng/μl olacak şekilde aligotlara ayrılarak örnekler kullanılıncaya kadar -86 °C'de saklanmıştır.

2.2.7.3. İzole edilen total RNA'lardan cDNA sentezi

cDNA sentezi Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki karışım hazırlanarak *H. tubulosa* mikobiyontundan elde edilen RNA'lardan cDNA sentezlenmiştir. Çalışmalar buz üstünde ve soğuk ortamda gerçekleştirilmiştir.

- Birinci aşamada her örnek için aşağıdaki karışım hazırlanmıştır.

RNA (50 ng/μl)	10 μl
Anchored-oligo(dT)18 primer	1 μl
Random hekzamer primer	1 μl
<u>H₂O</u>	<u>1 μl</u>

Toplam 13 μl

- Karışımı içeren tüpler 65°C’de 10 dakika boyunca bekletildikten sonra buz üstüne alınmıştır.
- İkinci aşamada her bir örnek için aşağıdaki karışım hazırlanmış ve örneklerle toplam hacim 20 μl olacak şekilde eklenmiştir.

RT Tamponu (5x)	4 μl
RNaz inhibitörü	0,5 μl
dNTP (10mM)	2 μl
<u>Revers transkriptaz</u>	<u>0,5 μl</u>

Toplam 20 μl

- Örnekler kısaca santrifüj edilip PZR cihazına (MyCycler Personal Thermal Cycler Biorad (Gradient)) konulmuş ve aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

25 °C 10 dakika

55 °C 30 dakika

85 °C 5 dakika

- Elde edilen cDNA’lar kRT-PZR uygulaması gerçekleşene kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.7.4. kRT-PZR ile cDNA’ların çoğaltılması

Kültürde çoğalan örneklerin stres koşullarında PKS gen ekspresyon seviyesinin ölçülmesi için cDNA’lar belirlenen primer kullanılarak gerçek zamanlı PZR cihazında çoğaltılmış ve ekspresyon seviyesi belirlenmiştir. kRT-PZR uygulaması Light Cycler SYBR Green I Master kiti yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Roche Light Cycler 2.0 cihazı

kullanılarak cDNA'ların çoğalma miktarı SYBR Green ile ölçülmüştür. Aşağıda belirtilen karışım hazırlanmış ve ilgili protokol uygulanmıştır.

PZR Karışımı:

Primer F (10pmol)	1 µl
Primer R (10pmol)	1 µl
Master Miks	10 µl
H ₂ O	3 µl
cDNA	5 µl

Toplam 20 µl

PZR Döngüsü:

95°C 10 dk (İlk Denatürasyon)	} 45 döngü
95°C 10 sn (Denatürasyon)	
53°C 10 sn (Yapışma)	
72°C 1 sn (Uzama)	

2.2.7.5. kRT-PZR bulgularının analizi

Dizayn edilen spesifik primerler kullanılarak kRT-PZR cihazı ile gen ekspresyonu incelenmiştir. kRT-PZR sonucunda elde edilen “Eşik Değeri” (Crossing Threshold, Ct) değerleri ile hedef genin çoğalmaya başladığı döngüler belirlenebilmiştir. Düşük Ct değerine sahip bir örneğin, gen ekspresyon seviyesinin yüksek olduğunu ifade ettiği bilinmektedir. Stres uygulaması sonucu elde edilen hedef genlere ait Ct değerleri, referans gen ekspresyonu ile karşılaştırılarak normalize edilmiştir. PKS gen ekspresyon seviyesi kRT-PZR sonuçlarının hesaplanmasında kullanılan yeni bir matematiksel modelle örneklerin kontrol grubuna oranları Pfaffl yöntemine göre hesaplanmıştır (Şekil 2.10) [161].

$$Oran = \frac{2^{\Delta Ct_{\text{örnek}}(Ct_{\text{kontrol}} - Ct_{\text{örnek}})}}{2^{\Delta Ct_{\text{Referans}}(Ct_{\text{kontrol}} - Ct_{\text{örnek}})}}$$

Şekil.2.10. PKS gen ekspresyon seviyesi normalizasyon denklemi

2.2.8. Stres koşullarında kültürde çoğalan *Hypogumnia tubulosa* mikobiyont örneklerinin bakterilerin büyüme eğrisi ve biyofilm formu üzerindeki aktivitelerinin incelenmesi

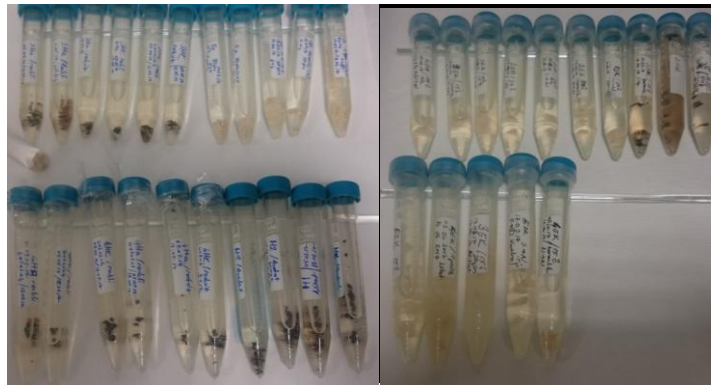
Kültüre alınan örneklerde strese maruz bırakıldıktan sonra biyolojik aktivite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla test edilmişlerdir. Bu amaçla örnekler bakteri suşlarının büyüme eğrisi üzerine etkisi ve antibiyofilm testine tabi tutulmuştur.

2.2.8.1. Kültürde çoğalan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinden özüt elde edilmesi

Kültürde çoğalan örneklerin stres koşullarında poliketid üretimi ve etkinliğindeki değişimin incelenmesi amacıyla *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinden özüt elde edilmiştir (Şekil 2.11).

Gen ekspresyon seviyesinin ölçülmesi için nitrat-asetat ve sıcaklık-ışık stresine maruz bırakılan örneklerden aynı zamanda özüt elde etmek için de örnekler seçilmiştir. Seçilen örnekler (yaklaşık 100 mg) üzerine 10 ml aseton eklenerek örnekler karanlıkta 72 saat bekletilmiştir. Daha sonra kurutma kağıdı ile süzülerek steril cam petrilere aktarılmıştır. Cam petrilere bulunan liken özütü, çözücülerinin uçması için çeker ocakta 24 saat boyunca bekletilmiştir. Çözücüsü uçtuktan sonra toz halindeki liken özütü steril santrifüj tüpe alınmış ve özütlerin toz ağırlığı tartılmıştır.

Steril falkon tüpler içerisindeki toz liken özütleri eşit konsantrasyonda olacak şekilde %100'lük Dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülmüştür ve 0,45 µm'lık filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Deneylerde kullanılmak üzere her örnek 1 µg/ µl liken özütü içerecek ve DMSO oranı %6 olacak şekilde seyreltilmiştir.



Şekil 2.11. Kültür örneklerinden özüt çıkarma aşaması

2.2.8.2. Bakterilerin belirli bir konsantrasyona göre ayarlanması

S. aureus suşu ATCC 25923 ve *P. aeruginosa* PAO1 bakteri suşu 37 °C 'de bir gece inkübe edildikten sonra testlerde kullanılacak kültürler OD: 625 nm'de ölçülerek 0,5 McFarland (yaklaşık $1,5 \times 10^8$ cfu/ml) standardına göre ayarlanmıştır.

2.2.8.3. Özütlerin bakterilerin büyüme eğrisi üzerindeki etkilerinin incelenmesi

Liken aseton özütlerinin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* suşlarının büyüme eğrileri üzerindeki etkileri 96 kuyucuklu şeffaf plakalar kullanılarak seri mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiştir. Mikroplaka kuyucuklarına 100 µl LB besiyeri konulmuştur. Yatay sıralarda bulunan ilk kuyucuklara *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin 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. 1 McFarland standardında ayarlanmış *S. aureus* ve *P. aeruginosa* suşları bakteri süspansiyonları kör olarak belirlenen kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 100 µl eklenmiştir. Kör olarak LB broth besiyeri, kontrol grupları olarak LB broth besiyeri ile bakteri süspansiyonu kullanılmıştır. Mikroplakalar Cytation 3 (BioTek) cihazına konulmuş ve 37 °C'de OD:600 nm'de ölçümler alınmıştır. Tüm testler 3 kez tekrarlanmıştır.

2.2.8.4. Özütlerin bakterilerin anti-biyofilm özelliklerinin incelenmesi

H. tubulosa aseton özütlerinin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* PAO1 biyofilm formu üzerindeki etkinlik testleri 96 kuyucuklu şeffaf mikroplakalar kullanılarak seri mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 0,5 McFarland standardında hazırlanan bakteri süspansiyonu LB broth besiyeri ile 1:100 oranında dilüe edilmiş ve kör olarak kullanılan kuyucuklar hariç tüm kuyucuklara 100 µl seyreltilmiş bakteri süspansiyonundan konulmuştur. Test edilecek liken özütleri antimikrobiyal testlerinde denenen konsantrasyonlarda seri mikrodilüsyon yöntemi ile kuyucuklara eklenmiştir. Biyofilm testi okumalarında kör olarak kullanılmak üzere 5 kuyucuk boş bırakılmıştır. Mikroplakanın tüm kuyucuklarındaki son hacim 100 µl olarak ayarlanmıştır.

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 3 kez tekrarlanmıştır.

2.2.9. Stres koşullarında kültürde çoğalan *Hypogymnia tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün içeriğinin belirlenmesi

2.2.9.1. İnce tabaka kromatografisi (Thin layer chromatography-TLC)

H. tubulosa mikobiyont örneklerinden elde edilen aseton özütünün içeriğini belirlemek amacıyla örnekler ince tabaka kromatografisi ile incelenmiştir (Şekil 2.12). Sabit faz olarak 20 x 20 alüminyum silika jel 60 F254 plaka kullanılmıştır. Orange ve ark. (2001) ve Culberson (1972) protokollerine uygun olarak [162,163]:

- Uygun boyutlarda kesilen silika plakaların alt ucundan 1 cm ölçülerek örneklerin uygulanacağı mesafe belirlenmiştir.
- Bu mesafede plakanın enine 1-1,5 cm aralıklarla örneklerin uygulanacağı noktalar kurşun kalem ile işaretlenmiştir. Noktalar numaralandırılmış veya örneklerin kodları ile belirtilmiştir.
- Test edilecek özütler aseton içinde çözülmüştür.
- Özüt içeren aseton çözeltisinden cam kapiller tüpler ile çok az miktarda çekilerek plaka üzerinde işaretlenen noktalara uygulanmıştır.
- Plaka üzerinde bir kaç noktaya referans maddeler yüklenmiştir.
- Durağan maddelerin plaka üzerinde ilerlemesi ve içeriğindeki maddelerin ayrışması için hareketli bir faz hazırlanmıştır.

- Hareketli faz olarak 50 ml Toluene/Diokzan/Asetik asit (180:45:5) karışımı hazırlanmıştır. Karışım yürütme tankına alınmıştır. Tabaka yerleştirilmeden önce tankın içinin çözücü buharıyla doyması beklenmiştir.
- Liken özütlerinin yüklendiği plakalar tank içine yerleştirilmiştir.
- Bu yöntemde hareketli faz aşağıdan yukarıya doğru durağan fazı hareket ettirir. Özüt içindeki moleküller çözücüye bağlanma afinitelerine göre hareketli fazın plaka üzerinde ilerlemesine bağlı olarak farklı seviyelere taşınırlar.
- Özüt içindeki maddelerin Rf (Retention value) değerleri çözücüye göre değişmektedir. Rf değeri maddenin ilerlediği mesafenin/çözücünün ilerlediği mesafeye oranıyla hesaplanmıştır (Şekil 2.13).
- Özüt içindeki maddeler referans maddeler ile karşılaştırılarak tespit edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 2.12. TLC uygulama aşaması

$$R_f = \frac{\text{Yürüyen maddenin mesafesi}}{\text{Yürüyen Çözücünün mesafesi}}$$

Şekil 2.13. Rf değerlerinin hesaplama denklemi

BÖLÜM 3

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

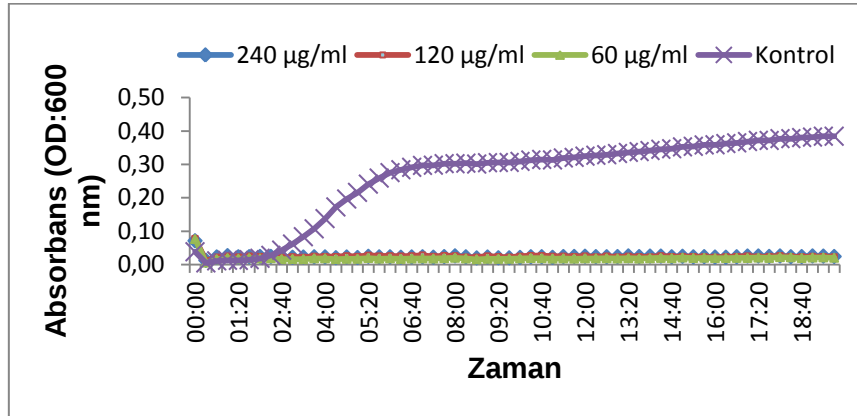
3.1. Bulgular

3.1.1. Doğadan toplanan *Hypogymnia tubulosa* örneklerinin bakterilerin büyüme eğrisi ve biyofilm formu üzerindeki aktiviteleri ile ilgili bulgular

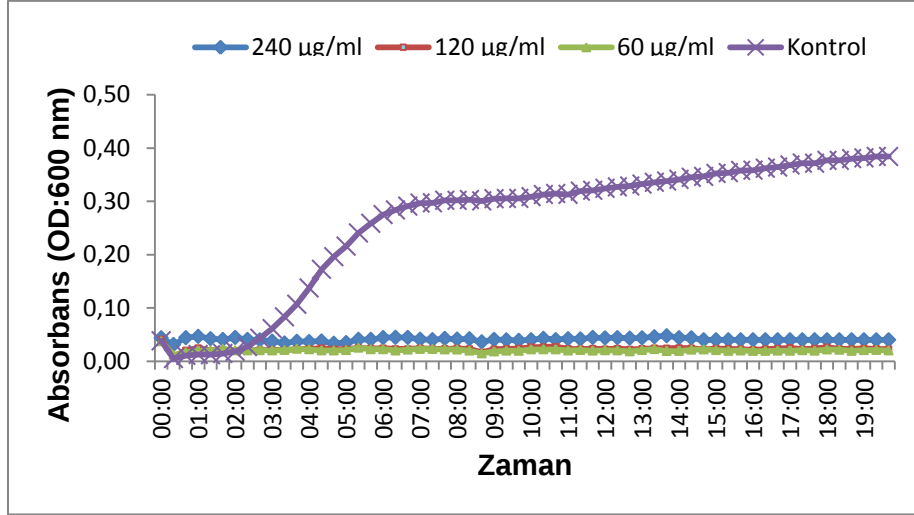
Doğadan toplanan *H. tubulosa* örnekleri kültüre alınmadan önce Bursa lokalitesi ist. 1 ve ist. 3'ten toplanan *H. tubulosa* liken örneklerinden elde edilen aseton özütü kullanılarak *P. aeruginosa* PAO1 ve *S. aureus* suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine etkileri test edilmiştir.

3.1.1.1. *H. tubulosa* aseton özütlerinin *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkileri

Doğadan toplanan *H. tubulosa* aseton özütlerinden 240 µg/ml, 120 µg/ml, 60 µg/ml dozları bakteri suşları üzerine uygulanmıştır. 20 saat boyunca 20 dakikada bir alınan absorbans ölçümleri (OD: 600 nm) sonucunda elde edilen verilerle büyüme eğrisi grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.1 - Şekil 3.2). Doğadan toplanan *H. tubulosa* aseton özütlerinin büyümeyi inhibe eden dozları incelenmiştir. Bursa ist. 1 ve ist. 3'ten toplanan örneklerin uygulanan tüm dozlarının büyümeyi inhibe ettiği gözlenmiştir.



Şekil 3.1. *H. tubulosa* Bursa ist. 1 örneği aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

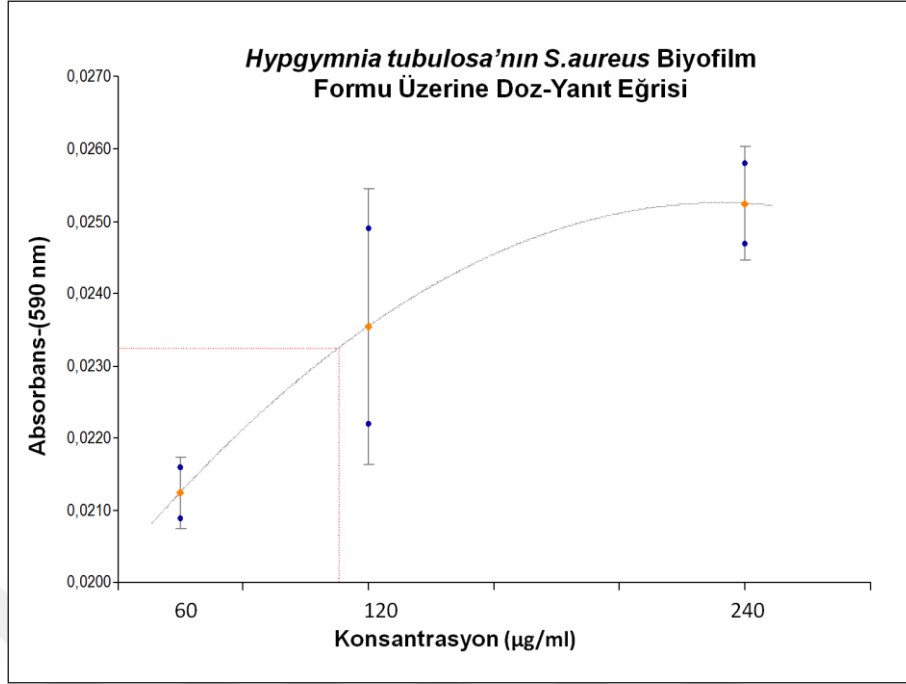


Şekil 3.2. *H. tubulosa* Bursa ist. 3 örneği aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

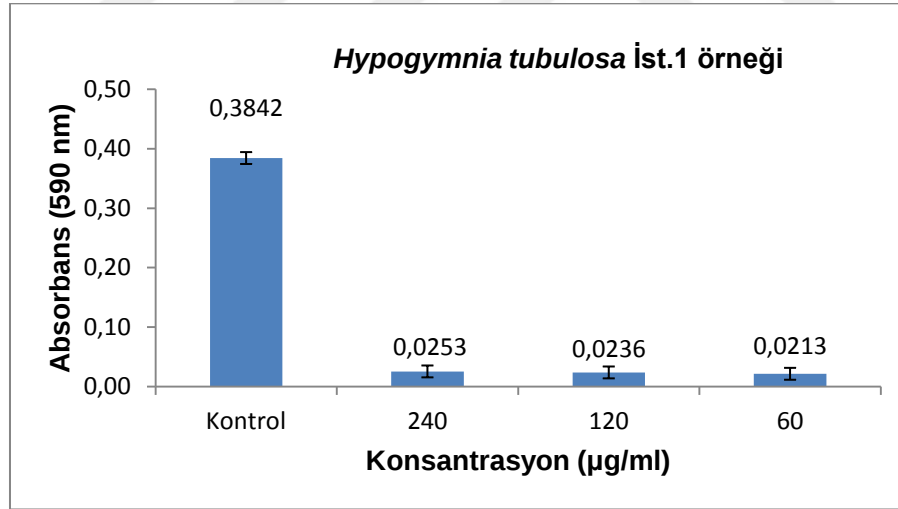
3.1.1.2. *H. tubulosa* aseton özütlerinin *S. aureus* suşlarının üzerindeki anti-biyofilm etkileri

H. tubulosa aseton özütünün *S. aureus* suşunun biyofilm formu üzerine etkisini incelemek için büyüme eğrisi üzerine etkisinin incelendiği testlerde tercih edilen dozlar uygulanmıştır. Hazırlanan plakalar 24 saat inkübe edildikten sonra kontrol grupları ile aseton özütü içeren grupların bulunduğu kuyucuklardaki biyofilm oluşumu Cytation 3 (BioTek) cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bursa ist.1 örneğine ait bulgular Şekil 3.3'te verilmiştir. Ölçüm sonuçları kullanılarak biyofilm inhibisyon grafikleri oluşturulmuştur. *H. tubulosa* aseton özütlerinin *S. aureus* suşunun biyofilm formu üzerindeki etkinlikleri analiz edilmiştir (Şekil 3.4). Bursa ist. 3 örneğine ait bulgular Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da verilmiştir. Testler 3 kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

Bursa ist. 1 örneklerinin aseton özütünün tüm dozlarının antibiyofilm etkisi bulunmaktadır. Bursa ist. 1 için en etkili doz 60 µg/ml olarak belirlenmiştir.

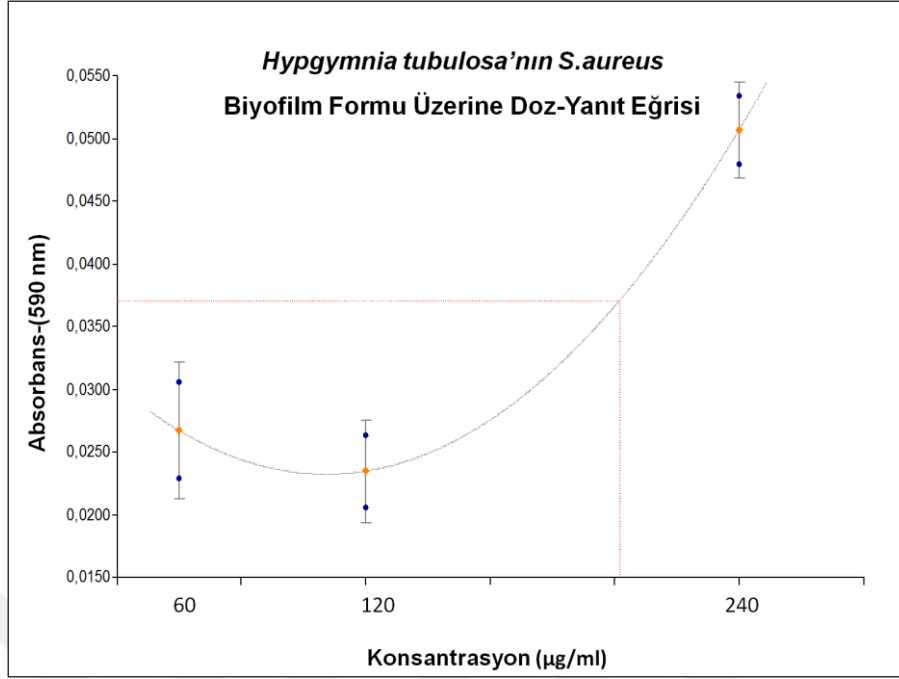


Şekil 3.3. *H. tubulosa* Bursa ist. 1 örneği aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

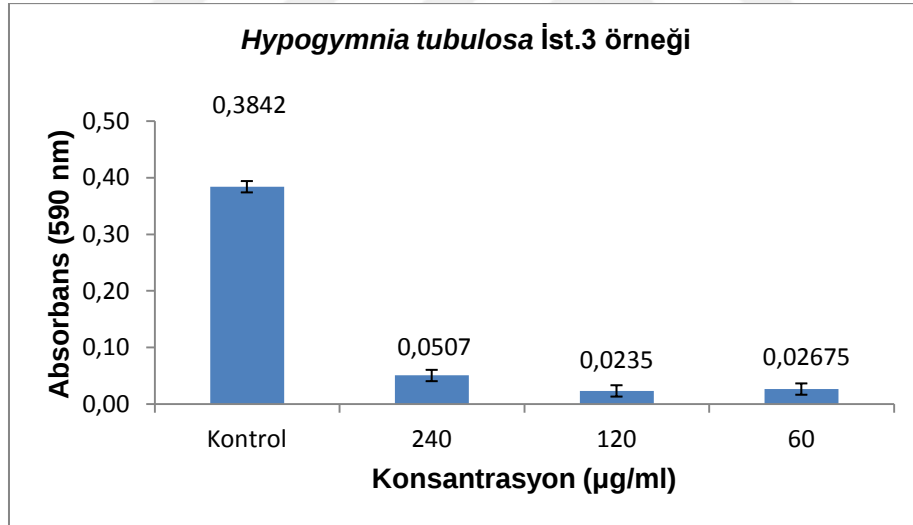


Şekil 3.4. *H. tubulosa* Bursa ist. 1 örneği aseton özütünün *S. aureus* suşuna muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590 nm) grafiği.

Bursa ist. 3 örneklerinin aseton özütünün tüm dozlarının antibiyofilm etkisi bulunmaktadır. Bursa ist. 3 için en etkili antibiyofilm dozu 120 µg/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.5. *H. tubulosa* Bursa ist. 3 örneği aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

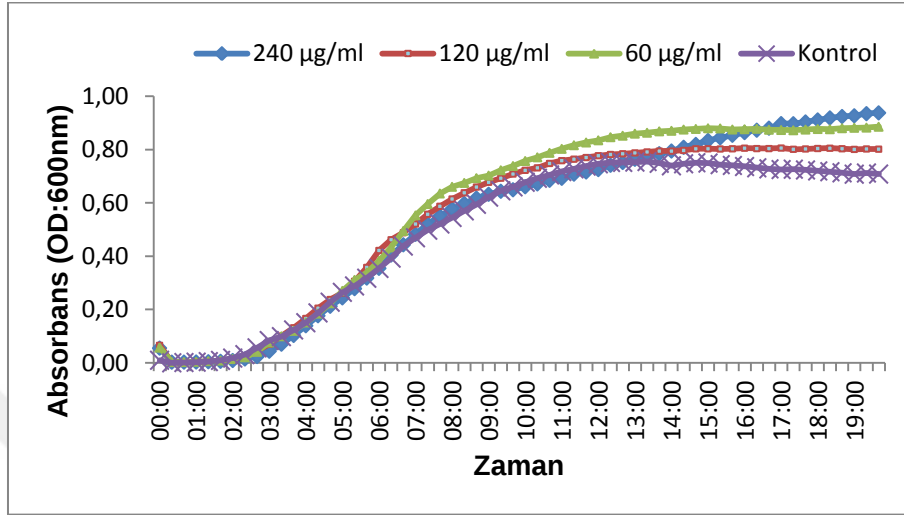


Şekil 3.6. *S. aureus* suşunun *H. tubulosa* Bursa ist. 3 örneği aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590 nm) grafiği.

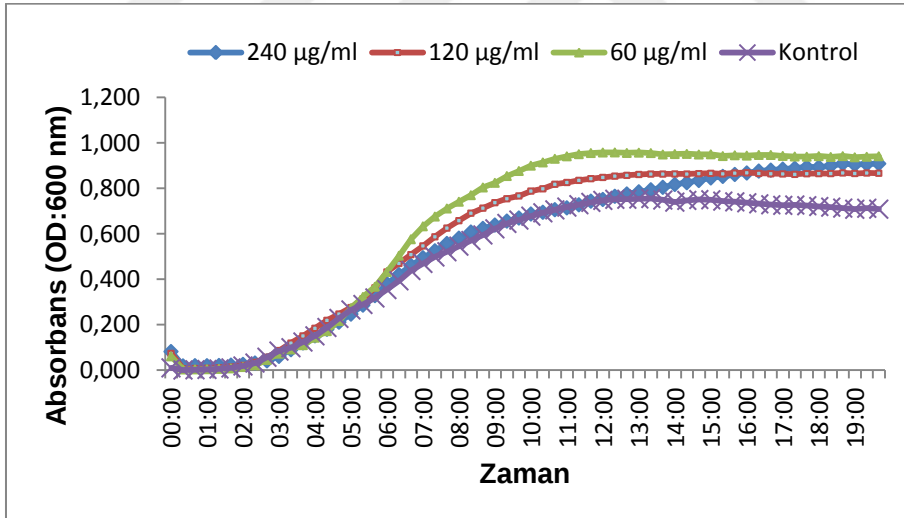
3.1.1.3. *H. tubulosa* aseton özütlerinin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkileri

H. tubulosa aseton özütlerinden 240 µg/ml, 120 µg/ml, 60 µg/ml dozları *P. aeruginosa* PAO1 bakteri suşu üzerine uygulanmıştır. 20 saat boyunca 20 dakikada bir alınan absorbans ölçümleri (OD: 600 nm) sonucunda elde edilen verilerle büyüme eğrisi

grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.7; Şekil 3.8). *H. tubulosa* Bursa ist. 1 ve ist. 3 örneklerinin aseton özütlerinin dozlarının büyümei inhibe etmek için yeterli olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 3.7. *H. tubulosa* Bursa ist. 1 örneği aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi



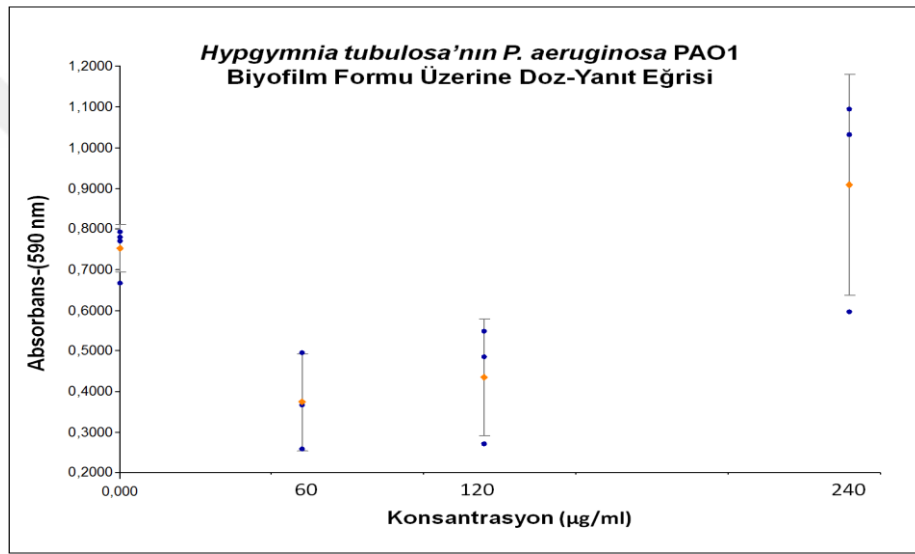
Şekil 3.8. *H. tubulosa* Bursa ist. 3 örneği aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

3.1.1.4. *H. tubulosa* aseton özütlerinin *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerindeki anti-biyofilm etkileri

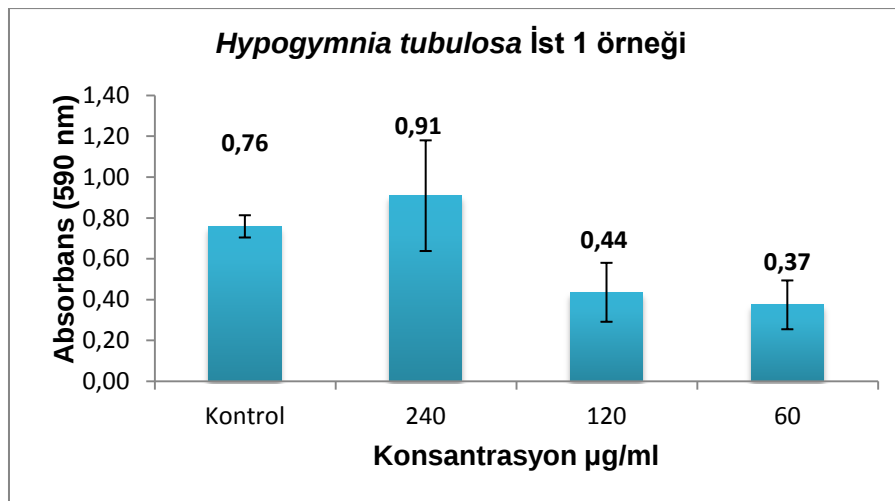
H. tubulosa aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 bakteri suşunun biyofilm formu üzerine etkisini incelemek için büyüme eğrisi üzerine etkisinin incelendiği

testlerde tercih edilen dozlar uygulanmıştır. Hazırlanan plakalar 24 saat inkübe edildikten sonra kontrol grupları ile aseton özütü içeren grupların bulunduğu kuyucuklardaki biyofilm oluşumu Cytation 3 (BioTek) cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları kullanılarak biyofilm inhibisyon grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.9; Şekil 3.10). *H. tubulosa* aseton özütlerinin *P. aeruginosa* PAO1 bakteri suşunun biyofilm formu üzerindeki etkinlikleri analiz edilmiştir (Şekil 3.11; Şekil 3.12). Testler 3 kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

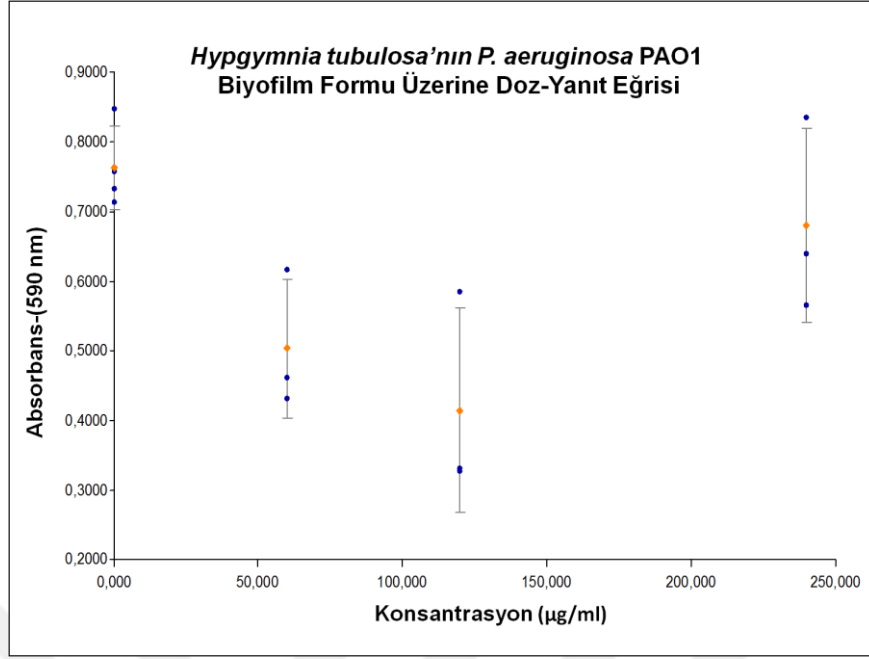
Bursa ist 1 ve ist 3 örneklerinin aseton özütünün 120 µg/ml, 60 µg/ml dozlarının biyofilm oluşumunu engellediği tespit edilmiştir.



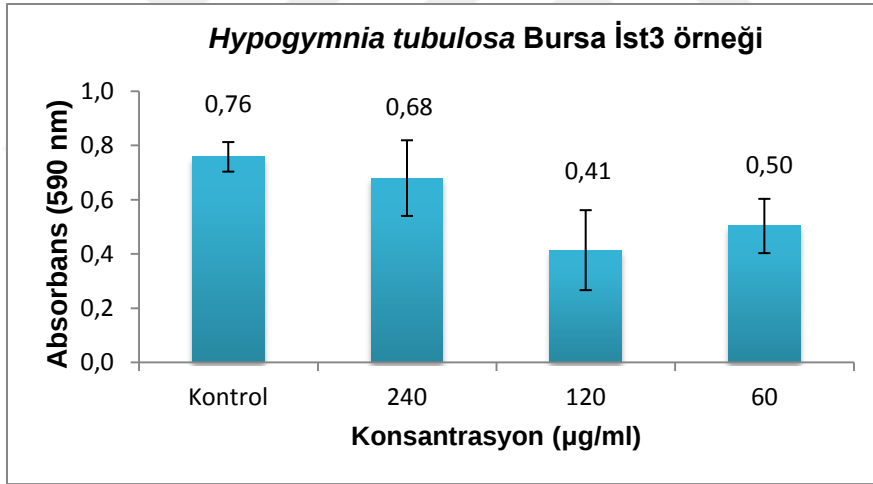
Şekil 3.9. *H. tubulosa* Bursa ist.1 örneği aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği



Şekil 3.10. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun *H. tubulosa* Bursa ist. 1 örneği aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590 nm) grafiği.



Şekil 3.11. *H. tubulosa* Bursa ist. 3 örneği aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

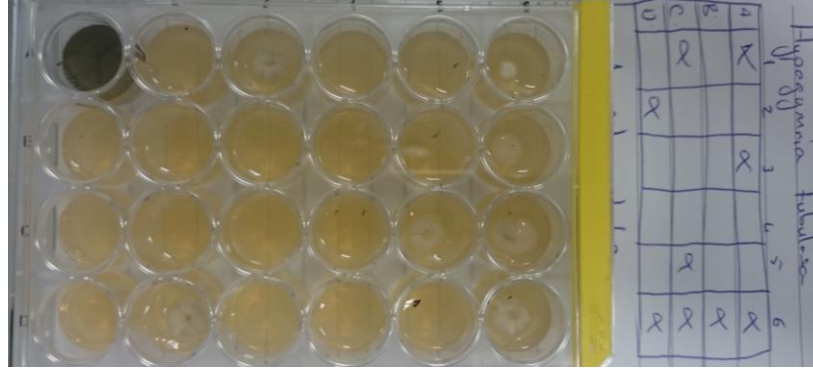


Şekil 3.12. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun *H. tubulosa* Bursa ist. 3 örneği aseton özütü ile muamelesi sonucu elde edilen biyofilm (OD-590 nm) grafiği.

3.1.2. Doğadan toplanan *Hypogymnia tubulosa* mikobiyontlarının kültüre alınması

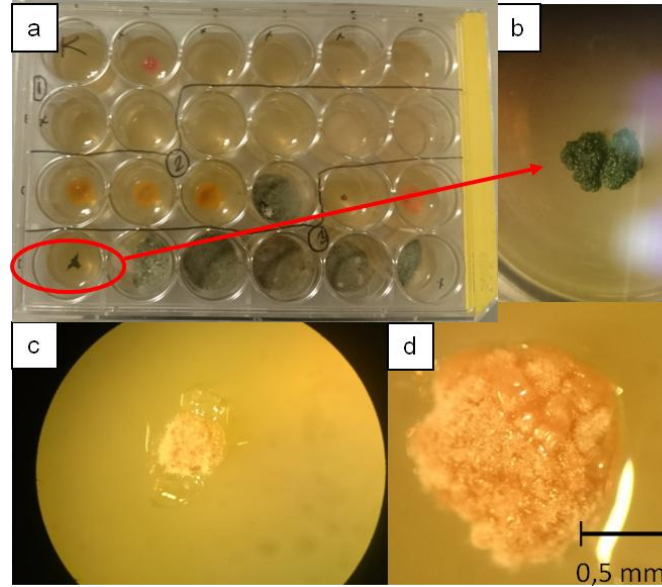
Bursa Uludağ Kestel Alaçam/Alaçam Milli Parkı lokalitelerinden taze liken toplama çalışması gerçekleştirilmiştir. Toplanan örneklerden Yamamoto, (2002) protokolüne uygun olarak *H. tubulosa* mikobiyontu 3 adet 24'lük plakada kültüre alınmıştır [109]. Örnekler düzenli olarak kontrol edilmiş örneklerin büyümeleri ve kontaminasyonları stereo mikroskop ile takip edilmiştir. Örneklerin bazılarında ilk 1

ayda kontaminasyon gözlenmiştir (Şekil 3.13). Kontaminasyon gözlenen 24'lük plakadaki kontamine olmamış örnekler temiz ve yeni besiyerine alınmıştır. *H. tubulosa* türüne ait 3 plakada bulunan örnekler 24'lük bir plakaya toplanmıştır.



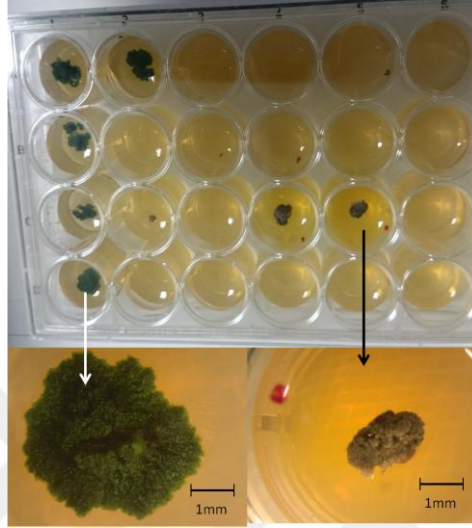
Şekil 3.13. Örneklerin büyümelerinin ve kontaminasyonlarının takibi

Pasaj geçilen örneklerinden 3 ay sonra sadece 5 kuyucukta *H. tubulosa* mikobiyont (mantar ortağı) örneklerinde büyüme ve hif uzantısı gözlenmiştir (Şekil 3.14). *H. tubulosa*'dan elde edilen örnekler arasında 24'lük plaka 1D kuyucuğunda fotobiyont (alg ortağı) örneği de büyüme göstermiştir (Şekil 3.14b). Bu süreçte yine kontaminasyonlar oluşmuştur. Kontamine olmayan büyüme ve hif uzaması gösteren örnekler tekrar yeni besiyerine pasaj geçilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 a) 3 aylık *Hypogymnia tubulosa* kültür örneği, **b)** *Hypogymnia tubulosa*'dan elde edilen fotobiyont (alg ortağı), **c-d)** *Hypogymnia tubulosa*'dan elde edilen mikobiyont (mantar ortağı)

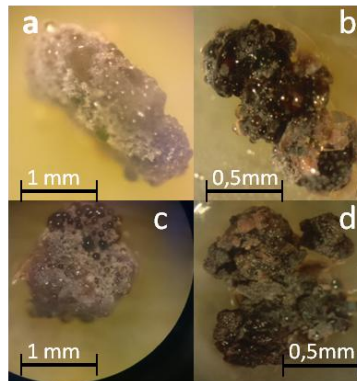
Pasaj geçilen örneklerinden 6 ay sonra sadece 3 kuyucukta *H. tubulosa* mikobiyont (mantar ortağı) rneklerinin büyümesi sağlanmıştır (şekil 3.15) 24'lk plakada C2, C4 ve C5 kuyucuklarında *H. tubulosa* mikobiyont (mantar ortağı); A1, A2, B1, C1 ve D1 kuyucuklarında ise *H. tubulosa* fotobiyont (alg ortağı) büyüme göstermiştir.



şekil 3.15. 24'lk plakada *H. tubulosa* mikobiyont (mantar ortağı) ve fotobiyont (alg ortağı) büyümesi

3.1.2.1. Kültürde çoğalan örneklerin pasaj geçilmesi

24'lk plakada C2, C4 ve C5 kuyucuklarında büyüme gösteren *H. tubulosa* rnekleri tekrar pasaj geçilmiş ve örnek sayısı artırılmıştır. 1 yıllık süreçte 10 plaka ve yaklaşık 300 örnek büyütülmüştür. Örneklerin bazılarında yaklaşık 10 kat büyüme gözlenmiştir. Büyüme oranı ortalama % 60 olarak hesaplanmıştır (şekil 3.16). şekil 3.16'da görülen a rneği büyüyerek b rneği şeklini almıştır, c rneği ise d rneği şeklini almıştır.



şekil 3.16. 24'lk plakada bir kaç aylık *H. tubulosa* mikobiyont büyümesi

Bu süreçte kontaminsyona sebep olan örnekler ayrıca test edilmiştir. Kontaminasyon kaynağı olarak en sık *Candida guilliermondii*, *Candida silvicola*, *Rhodotorula glutinis*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. türleri gözlenmiştir. İlk kültüre alınan ve pasaj geçilen örneklerdeki kontamine örnek sayısı kaydedilerek kontaminasyon oranı hesaplanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. *H. tubulosa* mikobiyont kültür örneklerinde kontaminasyon oranı

Örnek Grubu	Kontamine Örnek Sayısı	Toplam örnek sayısı	Kontaminasyon oranı
İlk kez kültüre alınan örnekler	23	70	%32
Pasaj geçilen örnekler	59	298	%20
Stres uygulamak için pasaj geçilen örnekler	5	300	%2
Toplam örnek sayısı	87	668	%13

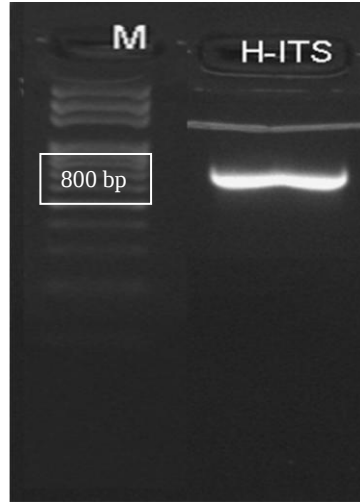
3.1.3. Kültür örneklerinin moleküler tür tayini bulguları

3.1.3.1. DNA izolasyonu ve saflığı

H. tubulosa mikobiyont örnekleri azot ile ezilerek CTAB metoduna göre DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA varlığı ve saflığı hem jel elektroforezinde yürütülerek hem de Cytation 3 (BioTek) cihazı ile ölçülerek tespit edilmiştir. Bu ölçüme göre DNA için 260/280 absorbans değeri 1,6 ölçülürken, DNA konsantrasyonu 45 µg/ml olarak belirlenmiştir.

3.1.3.2. Hedef bölgenin PZR ile çoğaltılması

H. tubulosa mikobiyont örneklerinden elde edilen total DNA'lardan rDNA küçük alt ünite geninin sonunu, ITS1, ITS2 bölgelerini, 5.8S rDNA genini ve rDNA büyük alt ünite geninin 5' ucunu içeren DNA bölgesinin çoğaltılması polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. PZR çalışmaları sonucu oluşan ürünler jel elektroforezinde yürütülmüş aşağıdaki jel fotoğrafında görülen 700-800 bp arasındaki bantlar elde edilmiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin tür tayini için PZR ile çoğaltılan ITS bölgesine ait jel görüntüsü

3.1.3.3. *H. tubulosa* mikobiyont örneklerine ait ITS Dizi analizi

H. tubulosa mikobiyont örneklerinden PZR sonucunda hedef bölge örnekleri çoğaltılmış ve pürifikasyon işlemi ile jelden istenen bantlar saflaştırılmıştır. Pürifikasyon ile elde edilen ürünlerden çift yönlü diziler elde edilmiştir. Diziler GenBank'ta bulunan verilerle BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmıştır [156]. Karşılaştırma sonucunda GenBank'ta verisi bulunan *H. tubulosa* ITS bölgesi dizileri ile %100 uyum gözlenmiştir (Şekil 3.18)

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Hypogymnia tubulosa voucher D42 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribe	1014	1014	67%	0.0	100%	HQ725075.1
☐ Hypogymnia tubulosa genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, biomaterial E.DNA.E	948	948	63%	0.0	99%	FR799196.1
☐ Hypogymnia tubulosa genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, biomaterial E.DNA.E	942	942	63%	0.0	99%	FR799195.1
☐ Hypogymnia tubulosa genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, biomaterial E.DNA.E	926	926	62%	0.0	99%	FR799194.1
☐ Hypogymnia tubulosa voucher tub4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribe	917	917	61%	0.0	99%	HQ680612.1
☐ Cladia aggregata internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed	905	905	60%	0.0	99%	AY245093.1
☐ Hypogymnia tubulosa voucher D22 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribe	944	944	64%	0.0	99%	HQ680595.1
☐ Hypogymnia tubulosa isolate LIFU047-16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tran	1386	1386	96%	0.0	98%	KX132956.1
☐ Hypogymnia farinacea isolate LIFU038-16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tran	926	926	67%	0.0	97%	KX132947.1
☐ Hypogymnia fuliginealis voucher HFUJ11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal tran	891	891	66%	0.0	96%	HQ725079.1

Şekil 3.18. Elde edilen dizilerin GenBank'ta bulunan verilerle BLAST programı kullanılarak karşılaştırılması

Morfolojik olarak tür tayini yapılamayan kültür örneklerinin moleküler teknikler kullanılarak türü tespit edilmiştir. Kültüre alınan tür ile kültürde çoğalan örneklerin aynı olduğu ve kontaminasyon olmadığı ortaya çıkarılmıştır. Reverse primere göre çoğaltılmış bölgeye ait nükleotit dizileri fasta formatında Şekil 3.19'da verilmiştir. Elde edilen diziye göre hedef bölgenin 810 bp uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir.

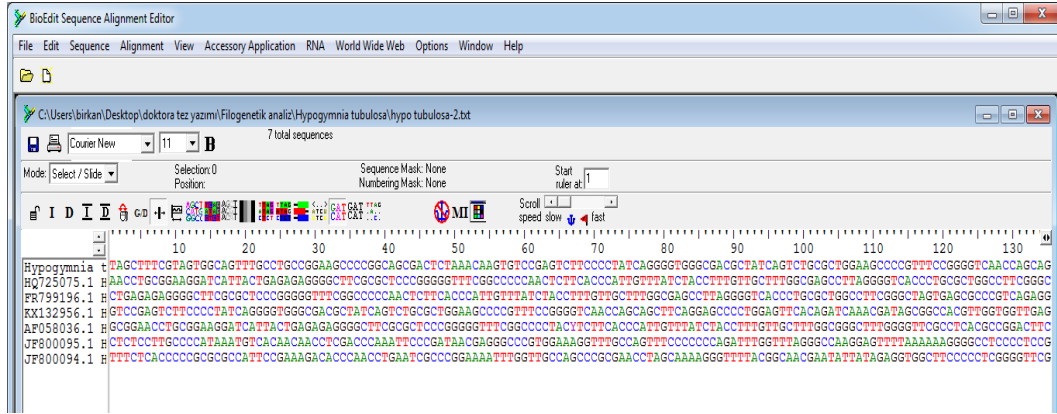
> *Hypogymnia tubulosa* _ITS-BR_

```
TGATCTACCTGATCGAGGTCATCATTGAAATAAATGGGGTTGTCTGGCAAGC
CACGGGGCGAACTTTCAAAGCGGGGAAGATTTACTGCGCTTAAAGTCACAC
CGGACCGCCACTGCTTTTCGGGCACGCCGCGGGGGCGAGAACCCAATACCA
AGCTACGCTTGAGGGGTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAAT
ACCGAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGC
AATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCTGGAACCA
AGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTACTATTATGTTTTTTGTTCTGATAATACT
CGATAGGCAGAATTGAATGGGCCTCTGACGGGCGCTCACTAGCCCGAAGGC
CAGCGCAGGGTGACCCCTAAGGCTCGCCAAAGCAACAAAGGTAGATAAAC
AATGGGTGAAGAGTTGGGGGCCGAAACCCCCGGGAGCGCGAAGCCCCTCTC
TCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCCGCAAACCTCTACAACCGGTGACGGCTG
AGACCCGGTCATATCTCAACCACCAACGTGGCCGCTATCGTTTGATCTGTGA
ACTCCAGGGGCTCCTGAAGCTGCTGGTTGACCCCGGAAACGGGGCTTCCAG
CGCAGACTGATAGCGTCGCCACCCCTGATAGGGGAAGACTCGGACACTTG
TTTAGAGTCGCTGCCGGGGCTTCCGGCAGGCAAACCTTGCCACCTACGGAAA
CCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCAATTGGGGAACCAGAGAAA
```

Şekil 3.19. *Hypogymnia tubulosa* ITS dizisinin fasta formatı

3.1.3.4. *H. tubulosa* mikobiyont örneklerine ait ITS dizilerinin filogenetik analizi

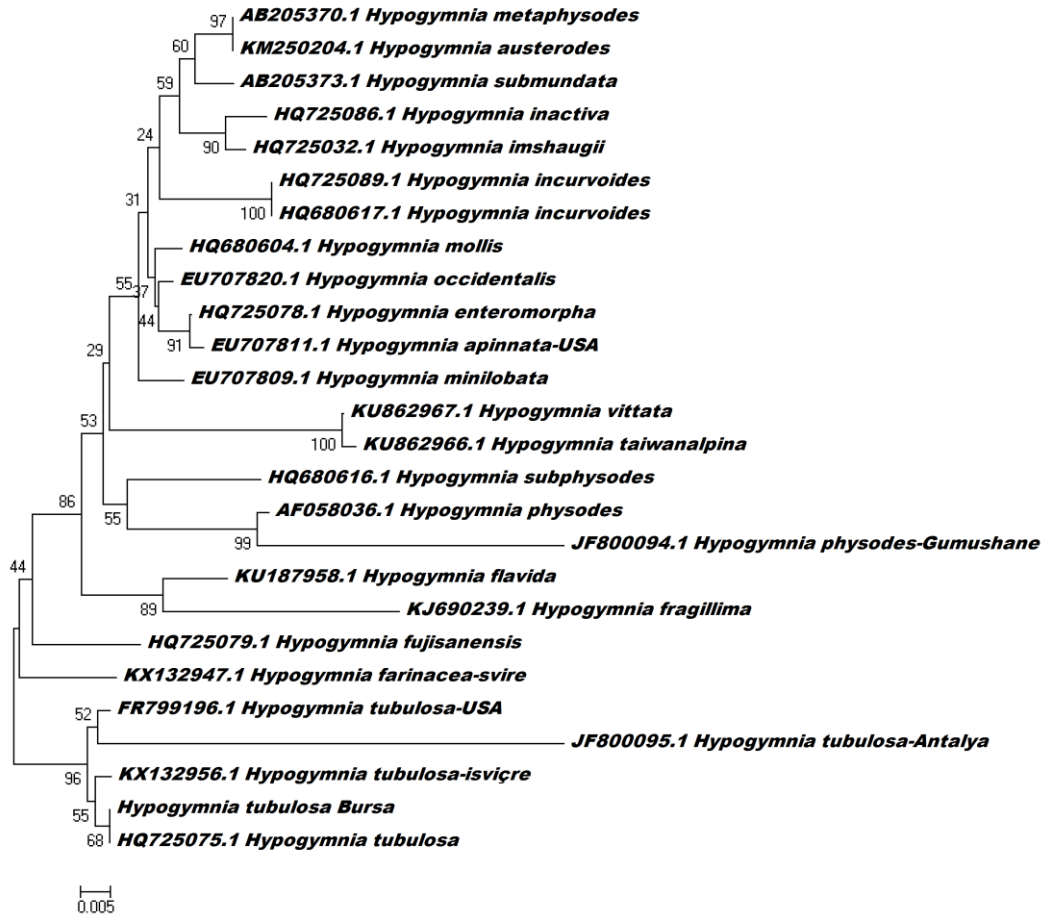
GenBank veri tabanında bulunan, *Hypogymnia* cinsine ait bazı türlerin ITS gen bölgesi kullanılarak elde edilmiş dizileri "Fasta" formatında indirilmiştir. *Hypogymnia* türlerinin ITS bölgelerine ait diziler BioEdit, ClustalX 2.0, MEGA4 programları kullanılarak hizalanmış ve dizilerin analizleri gerçekleştirilmiştir [157-159]. BioEdit programı ile yapılan çoklu hizalama ile sıralanmış ve görsel olarak ayarlanmıştır (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. *H. tubulosa* örneklerine ait dizilerin BioEdit programı ile çoklu hizalanması

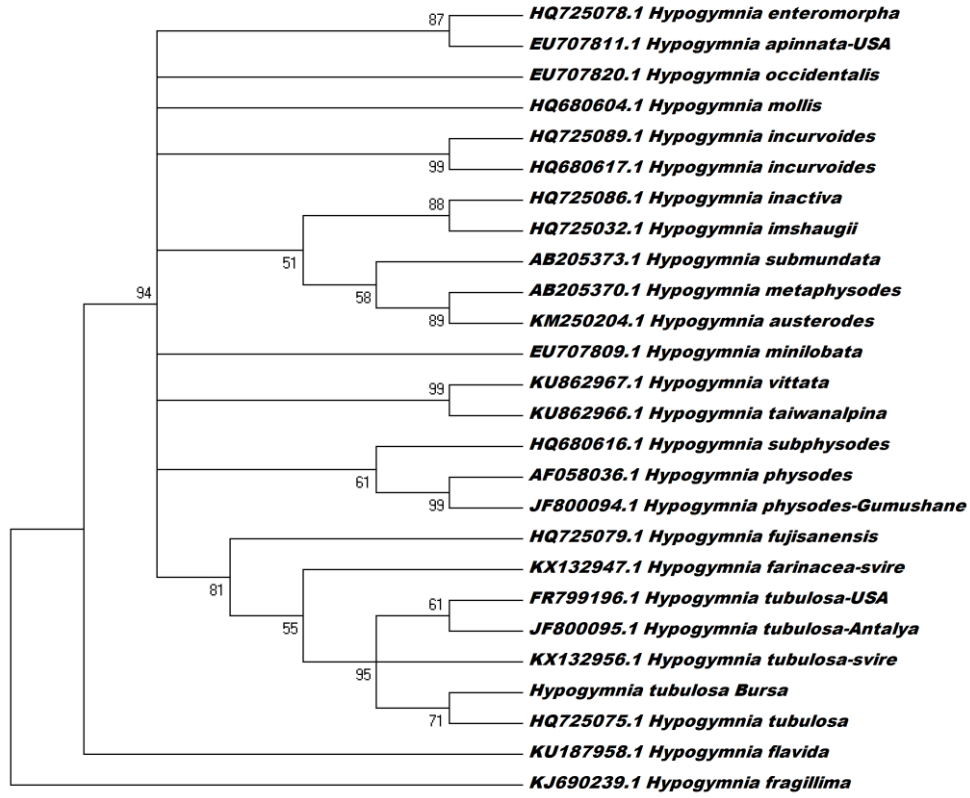
MEGA4 programında farklı algoritmalar (NJ, MP) kullanılarak türlerin gruplaşmasını gösteren dendrogramlar çizilmiştir. Neighbour - Joining (NJ) metodu ile oluşturulmuş cins dendrogramında *H. tubulosa* türüne ait örneklerin bir arada toplandığı ve diğer türlerden ayrıldığı ve monofiletik bir gruplaşma gösterdiği görülmektedir (Şekil 3.21). Türkiye Antalya lokalitesinden toplanarak daha önce Kabaoglu ve ark. (2007) tarafından GenBank'a kaydedilen *H. tubulosa* örneğinin çalışmamızda kullanılan *H. tubulosa* mikobiyont örnekleriyle aynı monofiletik grup içinde yer aldığı gözlenmektedir. Ancak grup içinde Türkiye örneklerinin birbirinden ayrıldığı ve dal uzunluğu dikkate alındığında Antalya'dan kaydedilen örneğin genetik olarak uzaklaştığı görülmüştür (Şekil 3.21).

MEGA4 programında Maksimum Parsimoni metodu ile oluşturulmuş cins dendrogramında ise *H. tubulosa* türüne ait örneklerin bir arada toplandığı ancak diğer türlerden tam olarak ayrılmadığı görülmektedir. Neighbour - Joining dendrogramı ile benzer şekilde Türkiye Antalya *H. tubulosa* örneği ile çalışmamızda kullanılan *H. tubulosa* mikobiyont örnekleri aynı grup içinde yer almıştır. *H. tubulosa* örneklerinin *H. fujisanensis* ve *H. farinacea* türleri ile daha yakın akraba oldukları ortaya çıkmaktadır (Şekil 3.22). Türkiye'de yayılış gösteren *H. physodes* türünün ise *H. tubulosa* örneklerinden ayrılarak farklı bir grup oluşturduğu gözlenmiştir.

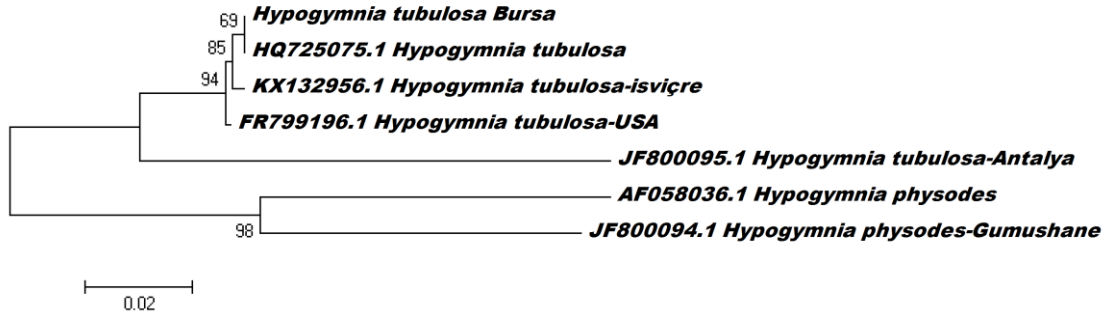


Şekil 3.21. *Hypogymnia* cinsine ait Neighbour - Joining ile oluşturulmuş dendrogram

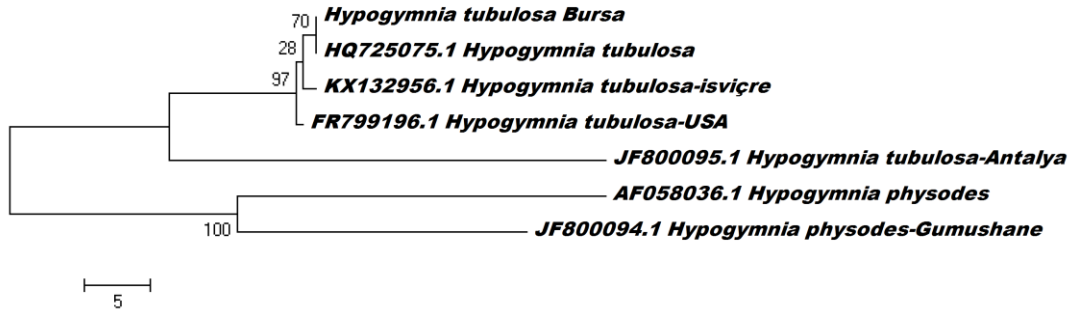
Hypogymnia cinsine ait Türkiye'den elde edilen diziler kendi içinde değerlendirilmiştir. Karşılaştırma amacıyla aynı türlere ait diğer ülkelerden GenBank'a kaydedilen dizilerde kullanılarak MEGA4 programında farklı algoritmalarla (NJ, MP) dendrogramlar çizilmiştir. MP ve NJ dendrogramları benzer bir gruplaşma göstermiştir. Dendrogramlara göre Bursa lokalitesinden toplanan *H. tubulosa*'nın kültüre alınması ile elde edilen mikobiyont örnekleri farklı ülkelerden toplanan *H. tubulosa* örnekleri ile gruplaşma göstermiştir. Antalya'dan toplanan *H. tubulosa* örneği ise gruptan ayrılarak genetik olarak uzaklaşmıştır (Şekil 3.23; Şekil 3.24).



Şekil 3.22. *Hypogymnia* cinsine ait Maksimum Parsimoni metodu ile oluşturulmuş dendrogram



Şekil 3.23. *H. tubulosa* türüne ait Neighbour - Joining ile oluşturulmuş dendrogram

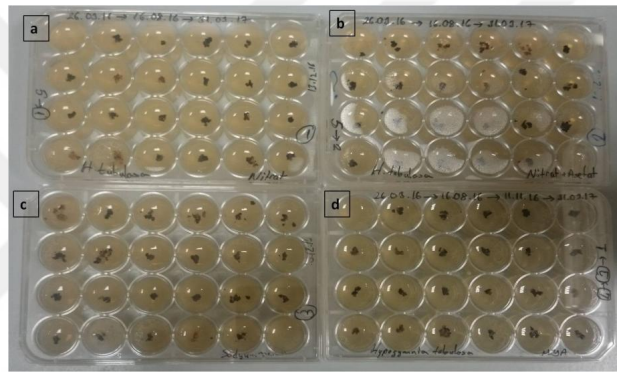


Şekil 3.24. *H. tubulosa* türüne ait Maksimum Parsimoni ile oluşturulmuş dendrogram

3.1.4. Kültürde çoğalan örneklerde metabolit üretiminin artırılması için stres uygulanması bulguları

3.1.4.1. Stres uygulanacak mikobiyont örneklerinin pasaj geçilmesi ve büyümelerinin sağlanması

H. tubulosa mikobiyontları strese maruz bırakılmak üzere yeni plakalara pasaj ge ilmi lerdir. Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılacak  rnekler Malt-yeast-agar besiyerine, nitrat-asetat stresine maruz bırakılacak örnekler ise 0,25 M potasyum nitrat ve % 0,25 sodyum asetat içeren farklı plakalara pasaj ge ilmi lerdir [164,165]. Pasaj geçilen *H. tubulosa* mikobiyontları test edilecek boyutlara ulaşması için 15 gün ve 30 gün süreyle 15  C'de soğutmalı inkübatörde b y t lm  lerdir ( ekil 3.25)



Şekil 3.25. *H. tubulosa* mikobiyontları strese maruz bırakılmak üzere nitrat (a)-nitrat asetat (b), asetat (c), kontrol (d) besiyerlerinde çoğaltılması

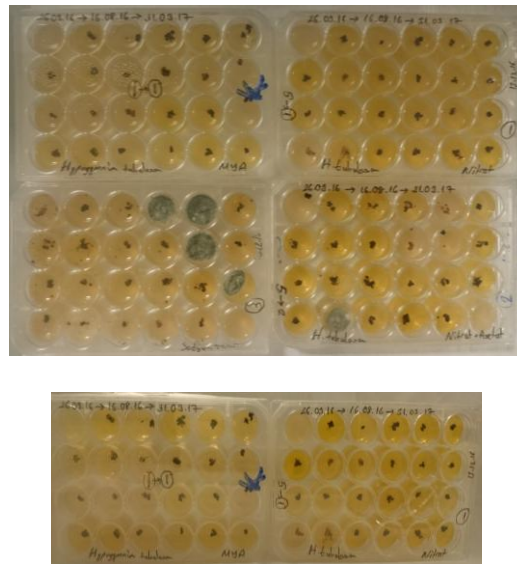
Bu süreçte bazı plakalarda besiyerinde sararma gözlenmiştir ( ekil 3.26). 15 günlük örneklerde çok fazla sararma olmazken, 30 günlük örneklerin besiyerinde renk değişimi daha fazla olmuştur. Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan örneklerde ise nitrat içeren besiyerinde en erken ve en fazla renk değişimi gözlenirken en yavaş ve az renk değişimi asetat içeren besiyerinde gerçekleşmiştir. Besiyerinde renk değişimi ile ilgili bulgular Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Pasaj geçilen örneklerde besiyerinde gözlenen renk değişimi

Kod	Besiyerinde renk değişimi	Renk değişim oranı	Büyüme Süresi
HK	-	-	30 gün
H1	-	-	15 gün
H2	-	-	15 gün
H3	-	-	15 gün

Tablo 3.2. devamı

H4	-	-	15 gün
H5	-	-	30 gün
H6	Var	Hızlı/Fazla	30 gün
H7	Var	Hızlı/Fazla	30 gün
H8	-	-	30 gün
H9	Var	Hızlı/Fazla	30 gün
H10	Var	Hızlı/Fazla	30 gün
H11	-	-	30 gün
H12	Var	Hızlı/Fazla	30 gün
H13	Var	Hızlı/Fazla	30 gün
H14	-	-	30 gün
H15	Var	Hızlı/Fazla	30 gün
H16	Var	Hızlı/Fazla	30 gün
HSK	Var	Yavaş/az	30 gün
HS1(Nitrat)	Var	Hızlı/Fazla	30 gün
HS2(Nitrat-Asetat)	Var	Yavaş/az	30 gün
HS3(Asetat)	Var	Çok az	30 gün

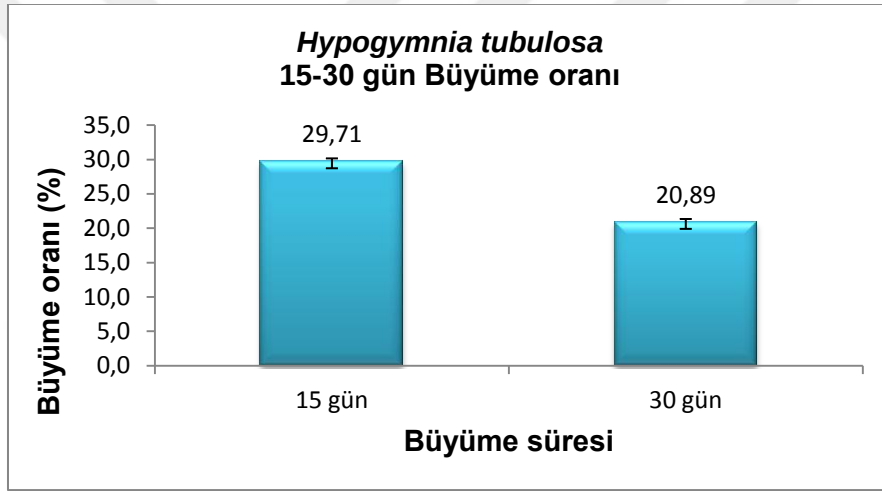


Şekil 3.26. *H. tubulosa* mikobiyontlarını içeren besiyerinde renk değişimi

3.1.4. 2. Kültürde çoğalan örneklerin büyüme oranları

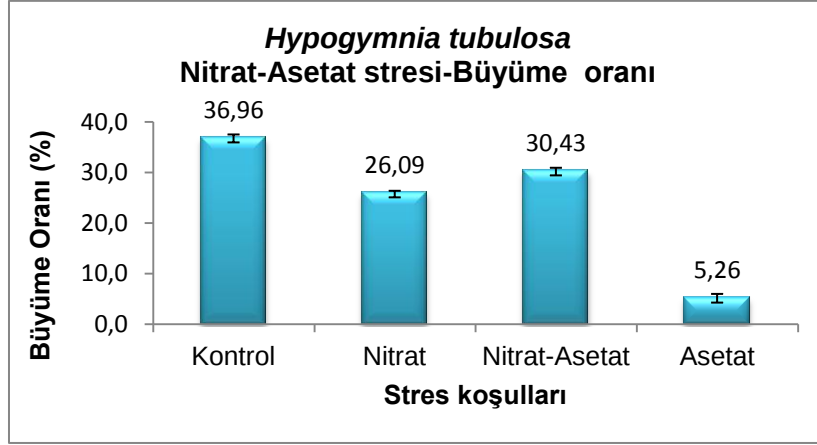
Liken mikobiyont kültürlerinin büyüme oranlarının hesaplanması için örnekler ilk gün ölçülmüş ve büyüme hızı ölçümler yapılarak takip edilmiştir. Örnekler 1 ay sonra tekrar ölçülmüştür. Ölçümler sırasında stereo mikroskop yardımıyla LC20 model kamera kullanılarak aynı büyütme ve zoom ile ölçümler yapılmıştır. Ölçümler kaydedilerek büyüme oranı hesaplanmıştır.

Liken mikobiyont kültür örneklerinden strese maruz bırakılacak toplam 300 örneğin 15 ve 30 gün sonundaki boyutları ölçülerek büyüme oranları hesaplanmıştır. Büyüme oranları incelendiğinde 15 günlük örneklerin büyüme oranlarının daha fazla olduğu gözlenmiştir ( ekil 3.27).



Şekil 3.27. 15 ve 30 günlük *H. tubulosa* mikobiyontlarının büyüme oranı

Büyüme oranı hesaplamalarına göre nitrat-asetat stresine maruz bırakılan örneklerde en fazla büyüme (% 36,96) kontrol grubunda gözlenmiştir. En az büyüme (% 5,26) ise asetat içeren besiyerinde yetiştirilen örneklerde tespit edilmiştir. Asetat içeren besiyerinde bulunan örneklerin bazılarında küçülme dahi gözlenmiştir ( ekil 3.28).



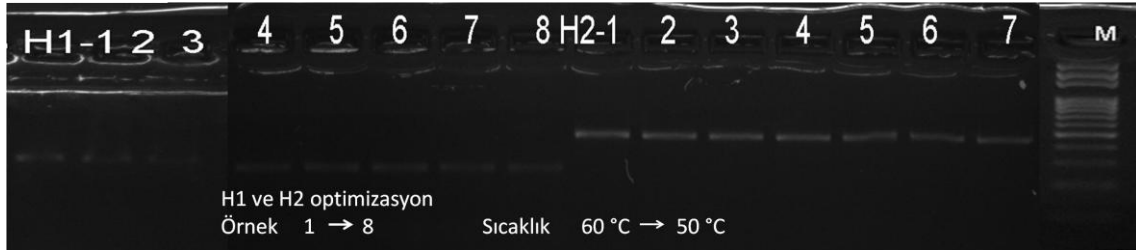
Şekil 3.28. Nitrat-asetat stresinde *H. tubulosa* mikobiyontlarının büyüme oranı

3.1.5. Kültürde çoğalan *Hypogymnia tubulosa* türünün PKS gen bölgesi

3.1.5.1. Primer dizaynı ve optimizasyonu

H. tubulosa mikobiyont örneklerinin sekonder metabolit üretiminde etkili PKS gen bölgelerini tespit etmek amacıyla GenBank'ta *Hypogymnia* cinsine ait diziler kullanılarak primerler dizayn edilmiştir. GenBank'ta *H.physodes* türüne ait diziler kullanılarak H1 ve H2 kodlu primerler elde edilmiştir. H1 primeri için GenBank'ta bulunan *H.physodes* JX067626.1 nolu PKS1 dizisi kullanılmıştır. H2 primeri ise *H.physodes* JX067627.1 nolu PKS2 dizisi kullanılarak dizayn edilmiştir. H1 ve H2 kodlu primerler kRT-PZR'da kullanılabilir olması açısından tercih edilmiştir.

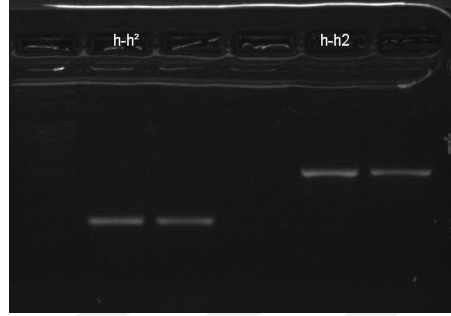
H1 ve H2 primerleri öncelikle PZR cihazında (MyCycler Personal Thermal Cycler Biorad) *H. tubulosa* örneklerinin genomik DNA'sı üzerinde test edilerek primerlerin optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon çalışması sonucu H1 primeri için Tm değeri 53 °C; H2 primeri için Tm değeri 59-60 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. PKS primerleri için PZR şartlarının optimizasyonu

3.1.5.2. *H. tubulosa* mikobiyontuna ait PKS gen bölgesinin dizisi ve dizilerin analiz bulguları

H. tubulosa mikobiyont örneklerine ait DNA H1 ve H2 primerleri ile PZR cihazında çoğaltılmıştır. PZR ürünleri jel elektroforezinde yürütülmüş ve belirgin bantlar elde edilmiştir (Şekil 3.30). Jeldeki belirgin bantlar pürifiye edilerek jelden geri kazanım sağlanmıştır.

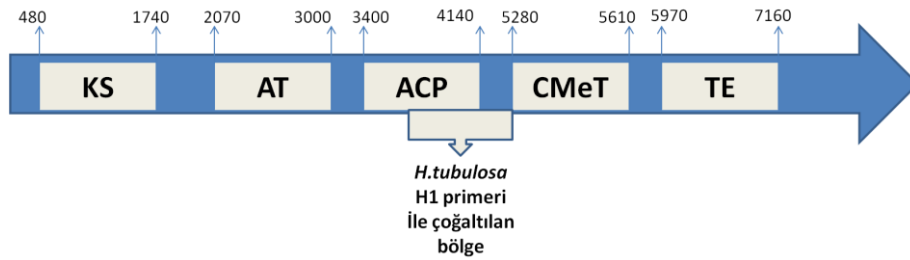


Şekil 3.30. H1 ve H2 primerleri ile çoğaltılan PKS bölgesinin jel görüntüsü

Geri kazanım sonucu elde edilen pürifikasyon ürünleri otomatik dizileme sistemi ile dizilenmiştir. H1 ve H2 primerleri ile çoğaltılan PKS1 ve PKS2 bölgesine ait diziler Şekil 3.31 ve Şekil 3.32'de verilmiştir. Diziler BioEdit vb. hizalama yöntemleri ile analiz edilmiş ve primerlerle çoğaltılan gen bölgeleri tespit edilmiştir. Dizilerin analiz sonucu *H. tubulosa* mikobiyont örneğinin *H. physodes* türünde varlığı bilinen PKS1 ve PKS2 gen bölgesine sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Böylece *H. tubulosa*'ya ait iki farklı Tip1 indirgemeyen (non-reducing) poliketid sentez gen bölgesinin varlığı tespit edilmiştir.

> *Hypogymnia tubulosa* PKS1 Bölgesinin kısmi dizisi

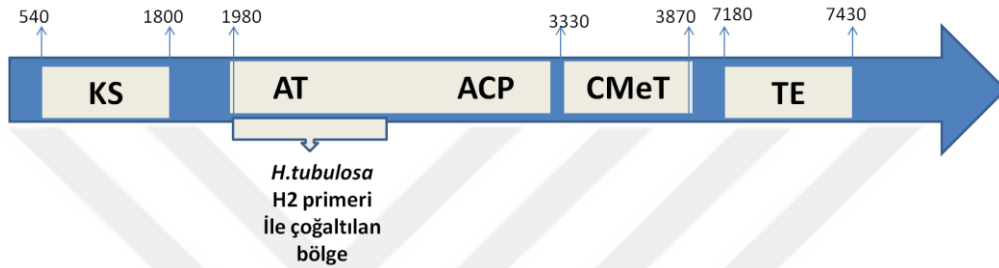
```
ATCGACAATGTCGGATAGCCTTTTGAGTCGACGTTTTGTGGTGTCTCTT
GACTCCTTAGAAAGCGACTGCCTAGACGTTTCCATTTGACTCCGTTGCG
GGGATTTATATGAAAACATTCCTGATGTTCCACTTCTCAGAATGACGTTG
GTGACATGCAATACGTTGAGGACTTCCGGCCATCCGACGTTTGCGCGTAT
TTTGGGAGAGCGGATCCATTGATCCAT
```



Şekil 3.31. H1 primeri ile çoğaltılan gen bölgesi ve dizisi

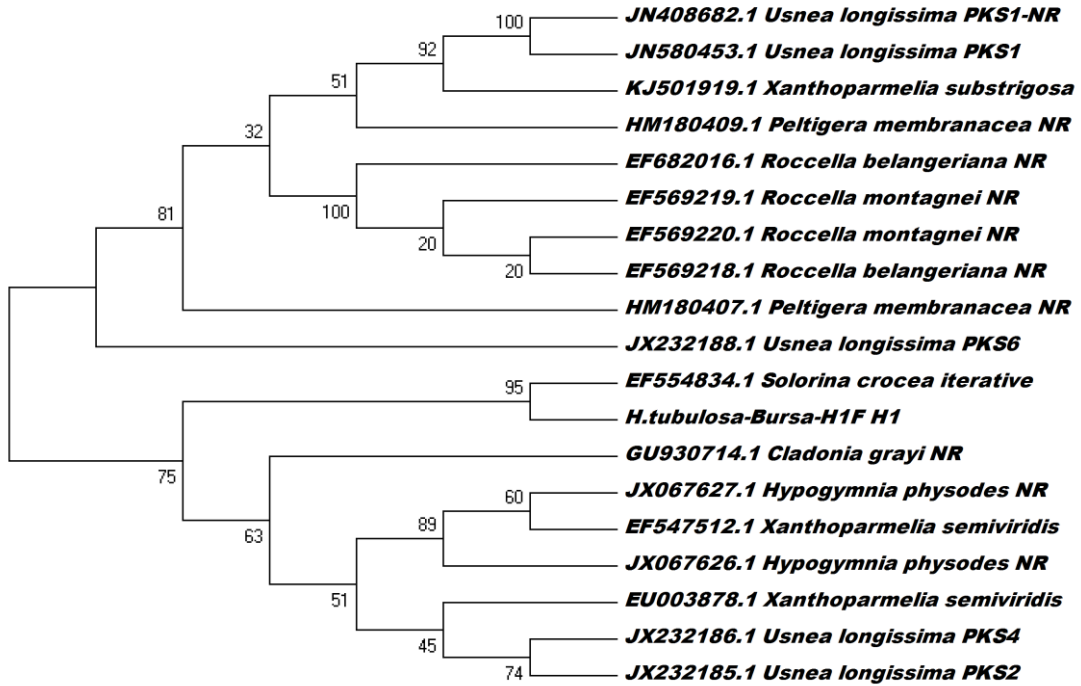
> *Hypogymnia tubulosa* PKS2 Bölgesinin kısmi dizisi

ATGAATTTTGGTTGCAGCTCGGTCTCAGACTTGGTATCAAAGCTGACAG
 CATTCAATTGACGGAGACAAGAGTCTCGCAGTGAAGTCAAAAAAGCCTCTC
 AGGCCAGTTATCTTGTGCTTCGGCGGTGACACATCCACATTTGTTGGATT
 AGACAGAAATGTATACGATGGTGTGACGCTACTGCGAAGTCATCTTGATC
 AATGCCATGCTATCCTCGAGTCATTAGGCCTCAGCGGAATTTATCCAGAT
 ATCTTTCAGAGAACGCCCATTTGAAGACCCGGTCAAGCTTCAGACGATGCT
 CTTTGCGATCCAGTACTCTTGTGCGAGCAGCTGGATTGACGCTGGCGTTC
 AGATTGCTGCTGTTGTGCGCCATAGCTTTGGCGAATTGACTGCCCTCTGC
 ATCAACGGTGTGTTTGGAGTTTGAAAGACACCATAAGAATAACTGCGGCTCG
 GGCCAAAATTGTGAGGGATTGCTGGGG



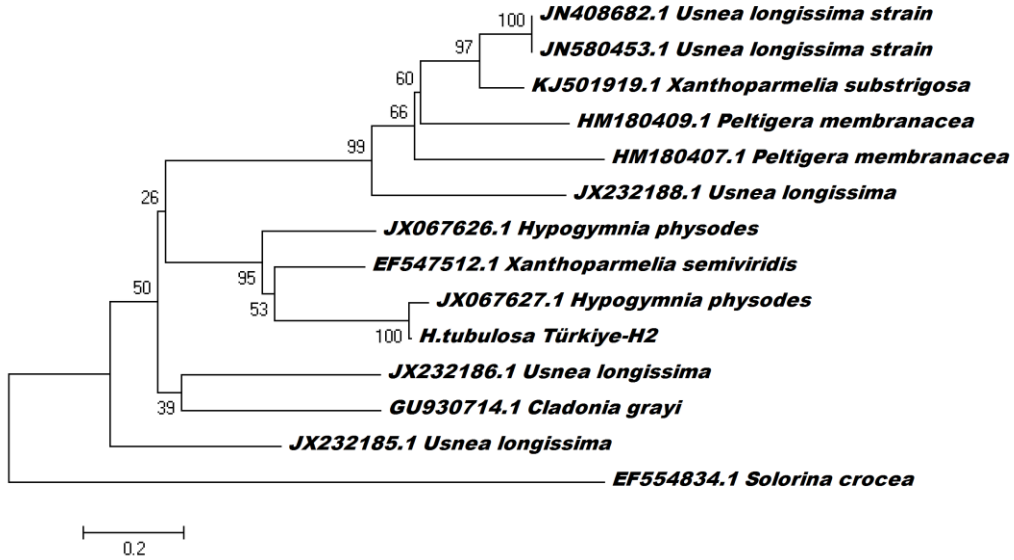
Şekil 3.32. H2 primeri ile çoğaltılan gen bölgesi ve dizisi

H1 primeri ile çoğaltılan bölge *Solorina crocea* türüne ait Tip I tekrarlayan gen bölgesi ile benzerlik göstermektedir. İndirgemeyen Tip I PKS genleriyle uyumlu olduğu tespit edilmiştir. *Hypogymnia physodes* türü ile aynı grup içinde yer almıştır (Şekil 3.33)



Şekil 3.33. H1 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesinin benzerlik dendrogramı

H2 primeri ile çoğaltılan bölge *Hypogymnia physodes* türü ile aynı grup içinde yer almıştır. İndirgemeyen Tip I PKS gen bölgesi ile benzerlik göstermektedir. (Şekil 3.34)

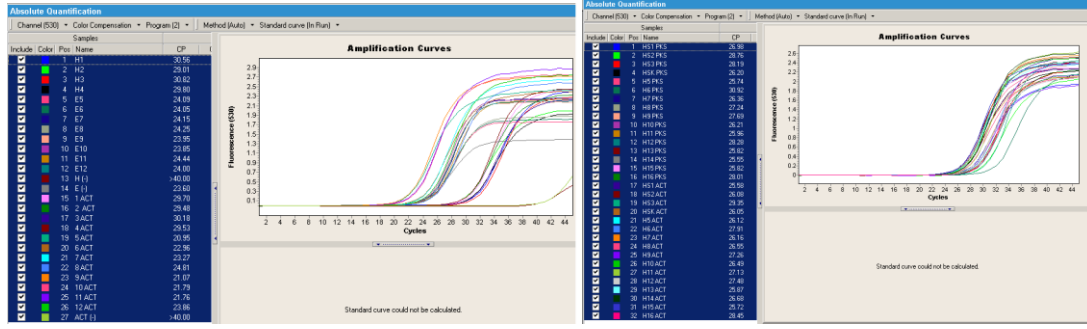


Şekil 3.34. H2 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesinin benzerlik dendrogramı

3.1.6. Kültürde çoğalan örneklerin stres koşullarında H1 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları

Hypogymnia tubulosa mikobiyont örneklerinden total RNA izolasyonu protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Cytation 3 (BioTek) cihazı kullanılarak 260/280 nm değerine göre izole edilen RNA'nın saflık derecesi ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu konsantrasyon değerlerine göre örnekler için dilüsyon oranları hesaplanmış ve her bir tüpte 50 ng/μl RNA olacak şekilde seyreltilmiştir. Total RNA'lardan cDNA sentezi Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. kRT-PZR uygulaması Light Cycler SYBR Green I Master kiti yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Roche Light Cycler 2.0 cihazı kullanılarak cDNA'ların çoğalma miktarı SYBR Green ile ölçülmüştür (Şekil 3.35).

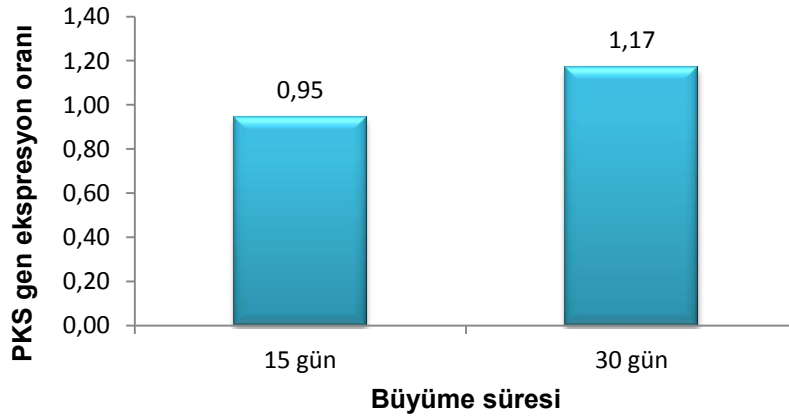
kRT-PZR sonucunda elde edilen "Eşik Değeri" (Crossing Threshold, Ct) değerleri ile hedef genin çoğalmaya başladığı döngüler belirlenebilmiştir. Düşük Ct değerine sahip bir örneğin, gen ekspresyon seviyesinin yüksek olduğunu ifade ettiği bilinmektedir. H1 primeri ile elde edilen Ct değerleri 25-30 aralığında değişiklik göstermektedir.



Şekil 3.35. H1 ve referans primeri ile *H. tubulosa* mikobiyont stres örneklerine kRT-PZR uygulaması

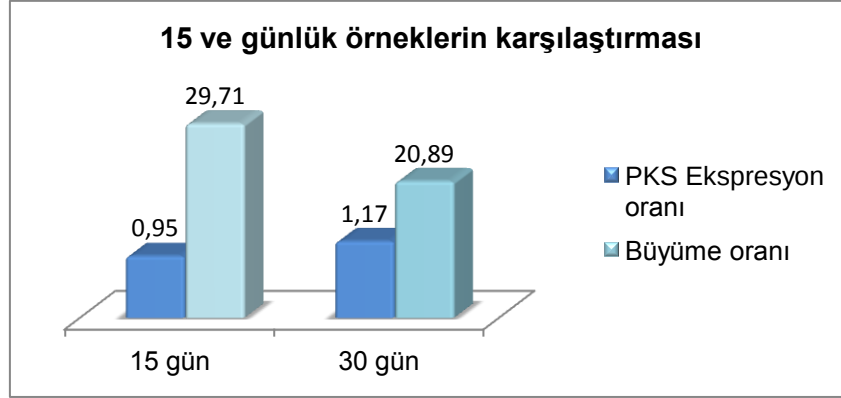
PKS hedef genlerine ait Ct değerleri, referans gen ekspresyonu ile karşılaştırılarak normalize edilmiş ve kontrol grubuna oranları Pfaffl yöntemine göre hesaplanmıştır. Normalizasyon sonucu elde edilen PKS gen ekspresyon oranları grafikte gösterilmiştir (Şekil 3.36).

15 ve 30 gün süresince büyütülen *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin H1 primeri kullanılarak kRT-PZR uygulaması ile PKS gen ekspresyon seviyesi ölçülmüştür. Normalizasyon sonucu 30 günlük örneklerin ortalama ekspresyon oranının, 15 günlük örneklerin ortalama ekspresyon oranından daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.36. H1 ve referans primeri ile 15 ve 30 günlük *H. tubulosa* mikobiyont örneklerine kRT-PZR uygulaması sonucu elde edilen gen ekspresyon oranları

15 ve 30 gün süresince büyütülen *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin büyüme oranları ve ekspresyon oranları karşılaştırıldığında büyüme oranının daha az olduğu 30 günlük örneklerde PKS gen ekspresyon oranının daha fazla olduğu gözlenmiştir. Büyüme ile gen ekspresyonunun ters orantılı olduğu görülmüştür (Şekil 3.37).



Şekil 3.37. *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin büyüme ve ekspresyon oranlarının karşılaştırılması

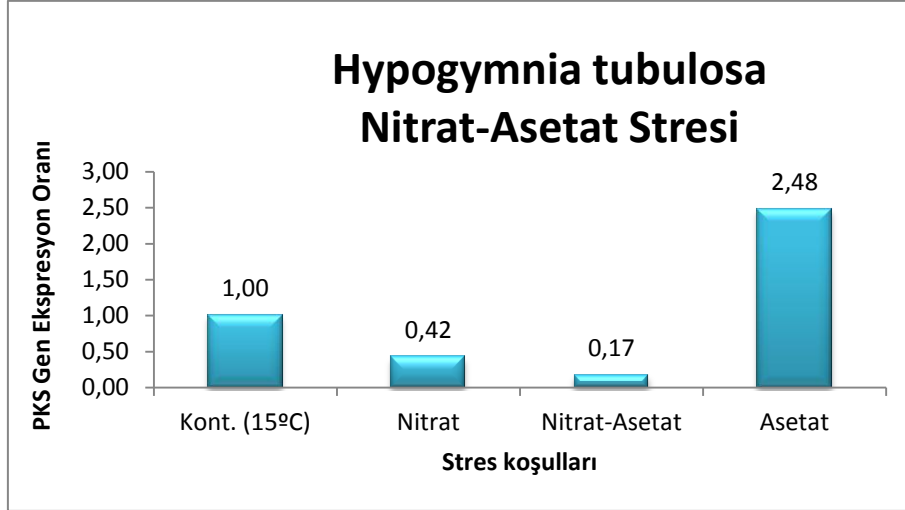
3.1.6.1. Nitrat-asetat stres koşullarında H1 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları

H. tubulosa mikobiyont örnekleri 30 gün süreyle nitrat, nitrat-asetat ve asetat içeren besiyerlerinde büyütülmüştür. Stres örneklerinin büyüme oranları ve 30 gün sonunda kRT-PZR cihazında SYBR Green ile PKS gen ekspresyon oranları ölçülmüştür. Örnekler asetat içeren besiyerinde daha yavaş büyüme gösterirken, nitrat içeren besiyerinde kontrole eş değer bir büyüme kaydedilmiştir.

Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan örneklerin PKS hedef genlerine ait Ct değerleri, referans gen ekspresyonu ile karşılaştırılarak normalize edilmiş ve kontrol grubuna oranları Pfaffl yöntemine göre hesaplanmıştır (Tablo 3.3). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyon oranları grafikte gösterilmiştir (Şekil 3.38). Bulgulara göre yavaş büyüme gösteren asetat örneklerinde ekspresyon oranı daha yüksek seviyededir.

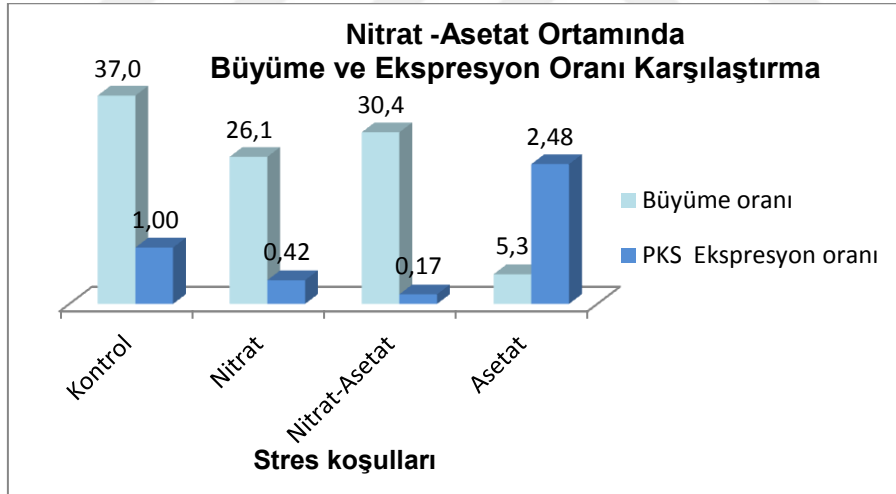
Tablo 3.3. Nitrat-asetat stresi örneklerinin kRT-PZR sonunda gözlenen Ct değerleri

Kod	Stres koşulu	Ct örnek	Ct referans
HSK	Kontrol	26,2	26,05
HS1	Nitrat	26,98	25,58
HS2	Nitrat-Asetat	28,76	26,05
HS3	Asetat	28,19	29,35



Şekil 3.38. H1 ve referans primeri ile strese maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerine kRT-PZR uygulaması sonucu elde edilen gen ekspresyon oranları

Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan örneklerin büyüme oranı düşük olan örneklerde gen ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Büyüme oranı ile gen ekspresyon seviyesi arasında genellikle ters orantı olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 3.39)



Şekil 3.39. Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin büyüme ve ekspresyon oranlarının karşılaştırılması

3.1.6.2. Sıcaklık ve ışık stres koşullarında H1 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları

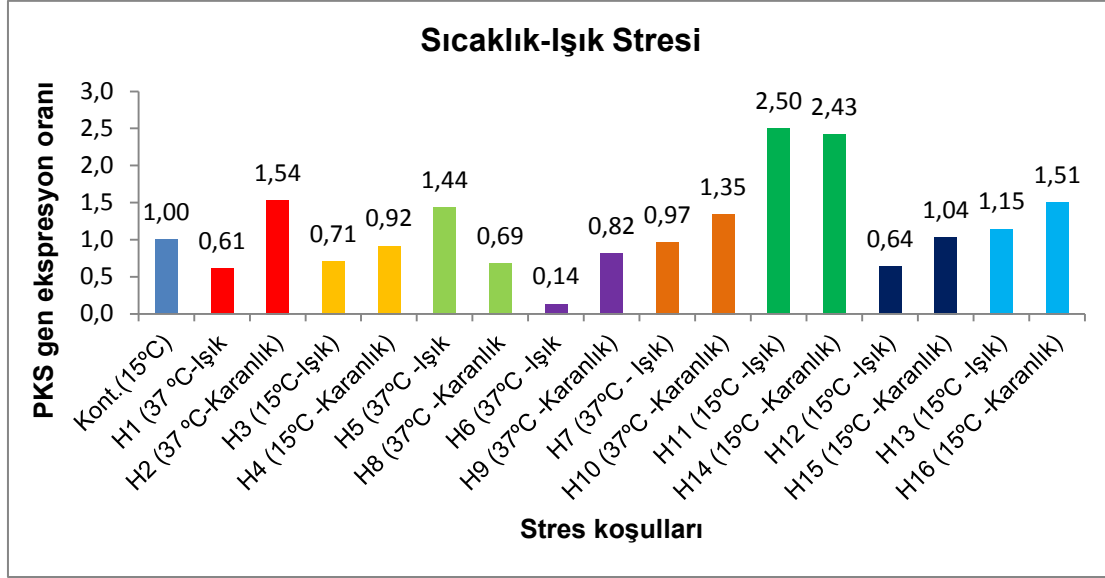
H. tubulosa mikobiyont örnekleri 15 ve 30 gün süreyle malt-yeast agar içeren besiyerlerinde büyütülmüştür. 15 ve 30 gün sonunda örneklerle 72 saat süreyle ışık ve farklı sıcaklık stresleri uygulanmıştır. Stresin PKS gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla örneklerden izole edilen total RNA'lar kullanılarak

cDNA sentezlenmiştir. kRT-PZR cihazında SYBR Green ile PKS gen ekspresyon oranları ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda elde edilen Ct değerleri Tablo 3.4'te verilmiştir. Ct değerlerinin kontrole göre normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyon oranları grafikte gösterilmiştir (Şekil 3.40). Aynı plakada büyüyen örnekler aynı renk ile gösterilmiştir.

Ekspresyon seviyesi 0,14'ten 2,5'e kadar farklı değerlerde tespit edilmiştir. Özellikle aynı plakada çoğaltılan H11 (15 °C-ışık) ve H14 (15 °C-karanlık) kodlu pigment oluşumu gözlenmeyen örnek gruplarının ekspresyon seviyesi kontrole göre oldukça yüksek bulunmuştur. Aynı plakada büyümüş ancak ekspresyon oranında çok fazla farklılık göstermiş olan H1-H2; H6-H9 ve H7-H10 kodlu örneklerde, 37 °C'de ışık varlığında ekspresyon oranı düşerken, karanlık durumda ekspresyon oranı artmıştır. Bu bulgular gen ekspresyonu açısından karanlık ortamın daha etkili olduğunu ve 37 °C'de karanlıkta ekspresyon oranının arttığını düşündürmektedir (Şekil 3.40). Ancak H5 (37 °C-ışık) ve H8 (37 °C-karanlık) kodlu gruplarda bu durumun aksi gözlenmektedir. Işık varlığında H5 örneği ekspresyon oranını artırmıştır.

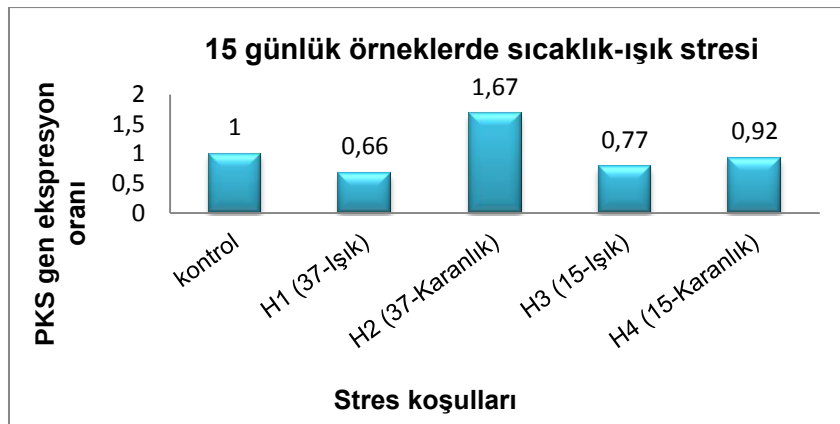
Tablo 3.4. Sıcaklık-ışık stresi örneklerinin H1 primeri ile kRT-PZR sonunda gözlenen Ct değerleri

Kod	Ct örnek	Ct referans
HK	26,2	26,05
H1	30,56	29,7
H2	29,01	29,48
H3	30,82	30,18
H4	29,8	29,53
H5	25,74	26,12
H6	30,92	27,91
H7	26,36	26,16
H8	27,24	26,55
H9	27,69	27,26
H10	26,21	26,49
H11	25,96	27,13
H12	28,28	27,48
H13	25,82	25,87
H14	25,55	26,68
H15	25,82	25,72
H16	28,01	28,45



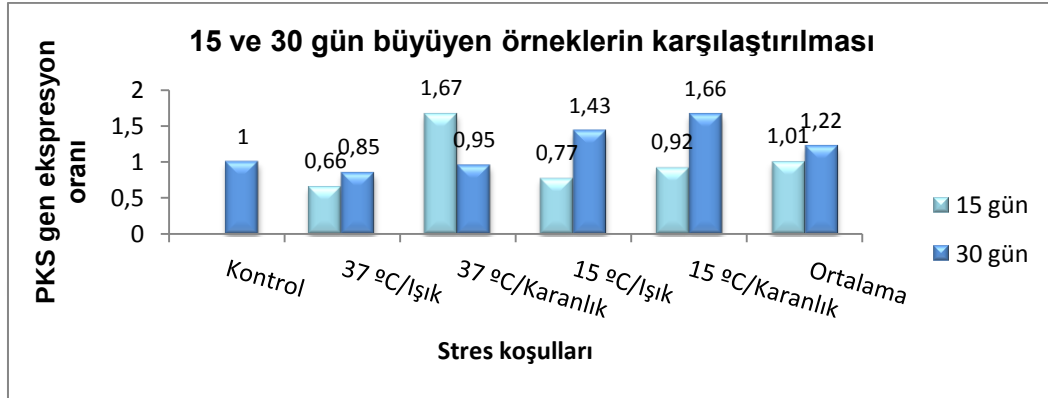
Şekil 3.40. Sıcaklık-Işık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları

H. tubulosa mikobiyontu 15 günlük kültür örnekleri ışık ve sıcaklık stresine maruz bırakılmıştır. H1-H2-H3-H4 kodlu örneklerin gen ekspresyon oranları karşılaştırıldığında 37 °C'de karanlıkta tutulan örneklerde ekspresyon oranının arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.41). 37 °C'de ışıklı ortamda tutulan örneklerin ise ekspresyon oranı kontrole göre düşüş göstermiştir. H4 kodlu örnek grubu kontrole aynı koşullarda olduğundan kontrole yakın ekspresyon oranı göstermiştir. 15 günlük örneklerde ekspresyon oranını artırmak için örneklerin 37 °C'de karanlıkta bekletilmesinin etkili olacağı düşünülmektedir.



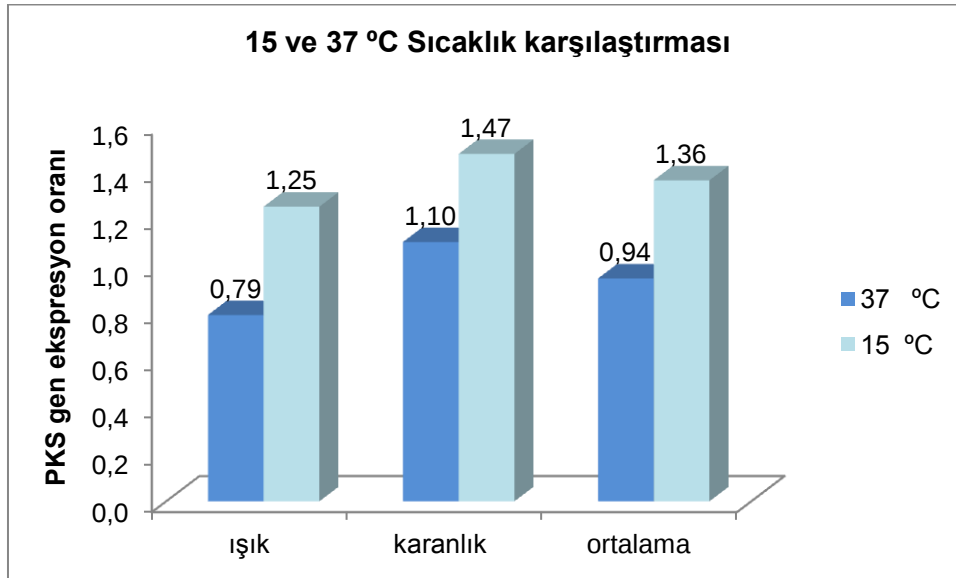
Şekil 3.41. Sıcaklık-ışık stresine maruz bırakılan 15 günlük *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları

15 ve 30 günlük *H. tubulosa* mikobiyont kültür örneklerinin ışıık ve sıcaklık stresine karşı PKS gen ekspresyon oranları incelendiğinde 15 günlük örneklerde 37 °C'de karanlık ortamda, 30 günlük örneklerde ise 15 °C'de karanlık ortamda PKS gen ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.42). Genel ortalamaya bakıldığında 30 günlük örneklerde gen ekspresyon oranının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



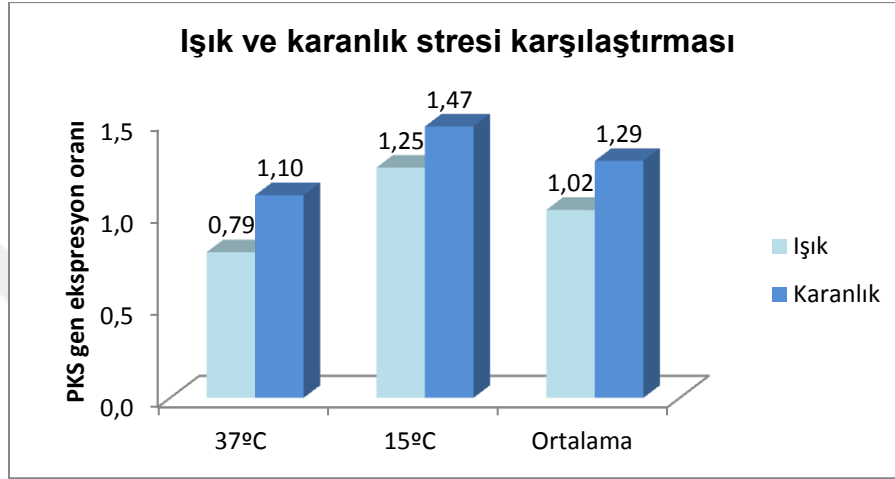
Şekil 3.42. Sıcaklık-Işıık stresine maruz bırakılan 15 ve 30 günlük *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları

H. tubulosa mikobiyont kültür örneklerinin sıcaklık stresine karşı PKS gen ekspresyon oranları incelendiğinde 37 °C'de karanlık ortamda ekspresyon oranı daha yüksektir. 15 °C'de yine karanlık ortamda PKS gen ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Genel ortalamaya bakıldığında 15 °C'de örneklerde gen ekspresyon oranının daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.43).



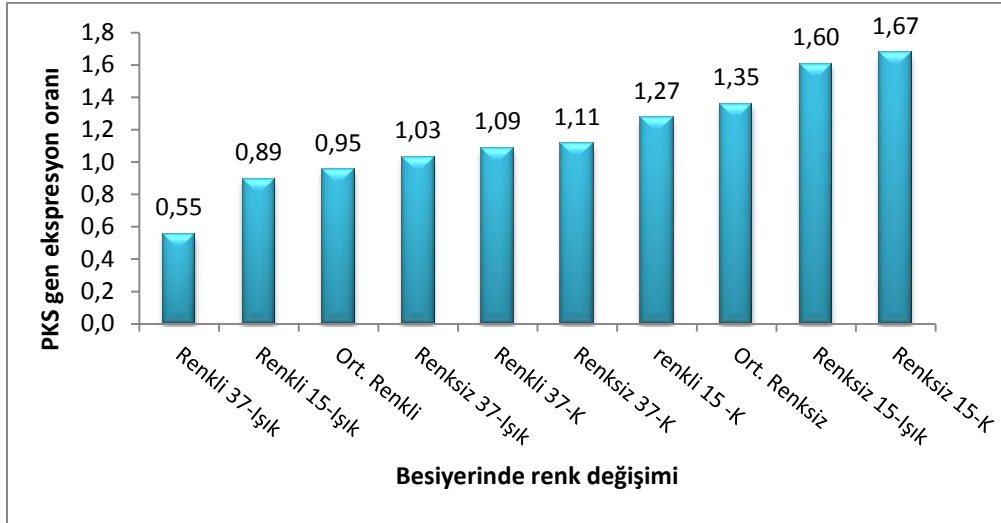
Şekil 3.43. Sıcaklık-ışıık stresine maruz bırakılan 15 °C ve 37 °C'de *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları

H. tubulosa mikobiyont kültür örneklerinin ışık stresine karşı PKS gen ekspresyon oranları incelendiğinde karanlık ortamda ekspresyon oranı daha yüksektir. 15 °C ve 37 °C'de karanlık ortamda PKS gen ekspresyonunun ışıklı ortama göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Genel ortalama bakıldığında karanlık ortamın örneklerde gen ekspresyonu oranını artırdığı tespit edilmiştir. 37 °C'de ışıklı ortamda ekspresyon oranı kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir (Şekil 3.44).



Şekil 3.44. Sıcaklık-ışık stresine maruz bırakılan ışık ve karanlık ortamda *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları

H. tubulosa mikobiyont kültür örneklerinin besiyerinde renk değişimi gözlenmesine göre örneklerin PKS gen ekspresyon oranları incelendiğinde renk oluşumu gözlenmeyen ortamda ekspresyon oranı daha yüksektir. 15 °C'de renk değişimi gözlenmeyen besiyerlerinde bulunan örneklerde en yüksek ekspresyon oranı gözlenmiştir. 37 °C'de yine renk değişimi olmayan besiyerlerinde bulunan örneklerde PKS gen ekspresyonu daha yüksek tespit edilmiştir. Besiyerinde renk değişimi gözlenen örneklerle ışık uygulandığında gen ekspresyonunun kontrole göre düştüğü görülmektedir (Şekil 3.45).



Şekil 3.45. Besiyerinde renk değişimi gözlenen *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin ekspresyon oranları

3.1.7. Kültürde çoğalan örneklerin stres koşullarında H2 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları

kRT-PZR sonucunda elde edilen Ct değerleri ile hedef genin çoğalmaya başladığı döngüler belirlenebilmiştir. Düşük Ct değerine sahip bir örneğin, gen ekspresyon seviyesinin yüksek olduğunu ifade ettiği bilinmektedir.

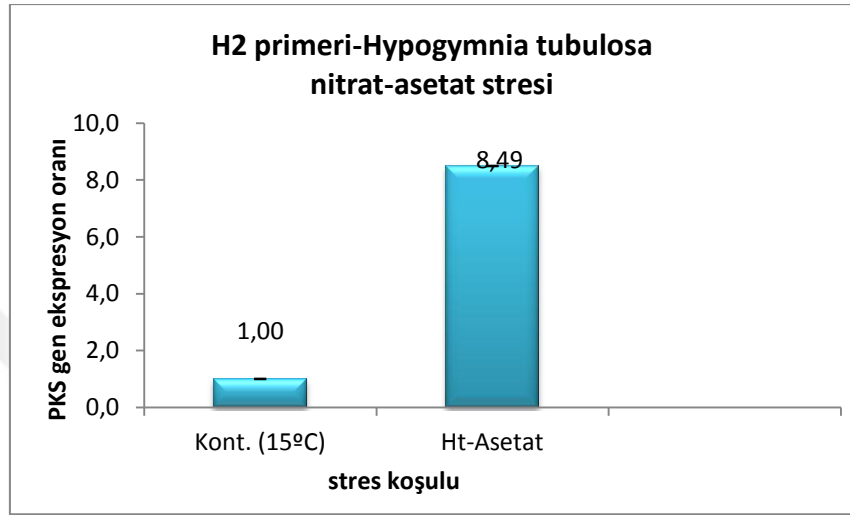
3.1.7.1. Nitrat-asetat stres koşullarında H2 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları

H. tubulosa mikobiyont örnekleri 30 gün süreyle nitrat, nitrat-asetat ve asetat içeren besiyerlerinde büyütülmüştür. Stres örneklerinin büyüme oranları ve 30 gün sonunda kRT-PZR cihazında SYBR Green ile PKS gen ekspresyon oranları ölçülmüştür. Örnekler asetat içeren besiyerinde daha yavaş büyüme gösterirken, nitrat içeren besiyerinde kontrole eş değer bir büyüme kaydedilmiştir.

Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan örneklerin PKS hedef genlerine ait Ct değerleri, referans gen ekspresyonu ile karşılaştırılarak normalize edilmiş ve kontrol grubuna oranları Pfaffl yöntemine göre hesaplanmıştır (Tablo 3.5). Normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyon oranları grafikte gösterilmiştir (Şekil 3.46). Bulgulara göre yavaş büyüme gösteren asetat örneklerinde ekspresyon oranı daha yüksek seviyededir. Nitrat ve nitrat-asetat içeren besiyerlerinde büyüyen örneklerde H2 primeri ile çoğalan bölgelerde ekspresyon gözlenmemiştir.

Tablo 3.5. Nitrat-asetat stresi örneklerinin H2 primeri ile kRT-PZR sonunda gözlenen Ct değerleri

Kod	Stres koşulu	Ct örnek	Ct referans
HSK	Kontrol	32,39	26,05
HS3	Asetat	33,57	29,35



Şekil 3.46. *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin nitrat-asetat stresinde H2 primeri kullanılarak belirlenen ekspresyon oranları

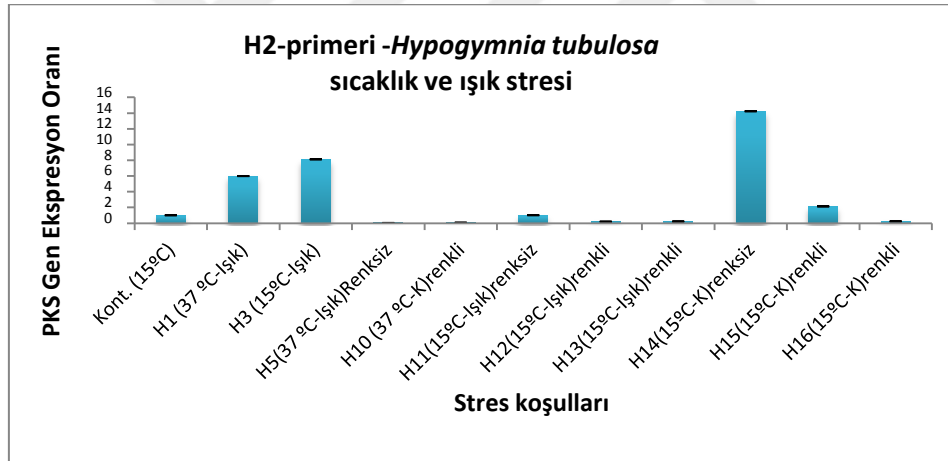
3.1.7.2. Sıcaklık ve ışık stres koşullarında H2 primeri ile çoğaltılan PKS bölgesi gen ekspresyon bulguları

H2 primeri ile elde edilen Ct değerleri 29-38 aralığında değişiklik göstermektedir (Tablo 3.6). Ct değerlerinin kontrole göre normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyon oranları grafikte gösterilmiştir (Şekil 3.47). H1 kodlu örnek gruplarının 37 °C'de ve H3 kodlu örneklerin 15 °C'de ışıklı ortamda ekspresyon oranı kontrole göre artış göstermiştir. 15 günlük örneklerde ışıklı ortamda H2 primeri ile çoğalan bölgede ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Özellikle aynı plakada çoğaltılan H11 ve H14 kodlu örnek gruplarının ekspresyon seviyesi kontrole göre yüksek bulunmuştur. H11 grubu ışıklı, H14 grubu karanlık ortamda tutulmuştur. H14 grubunun ekspresyon oranı H11'e göre çok daha yüksektir. Benzer şekilde aynı plakada büyüyen H12 ve H15 kodlu örneklerin ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında karanlık ortamda bulunan H15 örneklerinin ekspresyon seviyesi daha yüksektir. 30 günlük örneklerde 15°C'de karanlık ortamda H2 primeri ile çoğalan

bölgede ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. H2, H4, H6, H7, H8, H9 kodlu örneklerde H2 primeri ile çoğalan bölgede ekspresyon gerçekleşmemiştir (Şekil 3.47).

Tablo 3.6. Sıcaklık-ışık stresi örneklerinin H2 primeri ile kRT-PZR sonunda gözlenen Ct değerleri

Kod	Ct örnek	Ct referans
HK	32,39	26,05
H1	33,46	29,7
H3	33,5	30,18
H5	38,37	26,12
H10	37,15	26,49
H11	33,46	27,13
H12	36,26	27,48
H13	34,54	25,87
H14	29,19	26,68
H15	30,97	25,72
H16	37,01	28,45



Şekil 3.47. Sıcaklık-ışık stresi maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin H2 primeri ile ekspresyon oranları

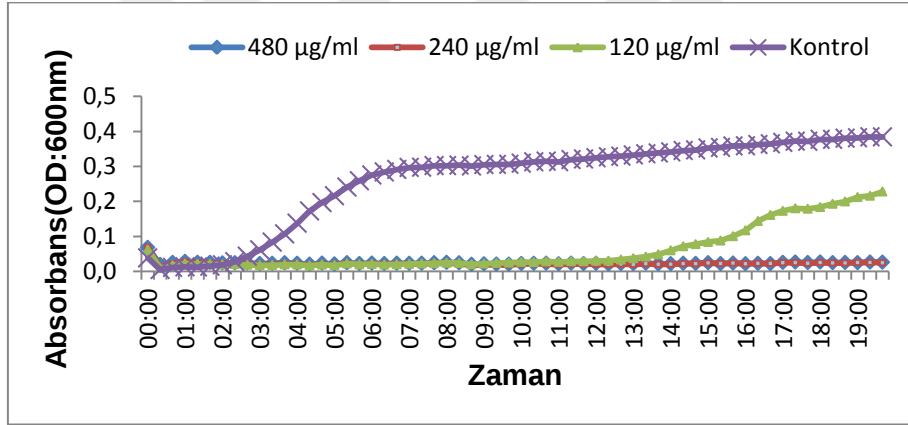
3.1.8. Stres koşullarında kültürde çoğalan *Hypogymnia tubulosa* mikobiyont örneklerinin bakterilerin büyüme eğrisi ve biyofilm formu üzerindeki aktivite bulguları

Doğadan toplanan *H. tubulosa* örnekleri kültüre alındıktan sonra strese maruz bırakılmışlardır. *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinden elde edilen aseton özütü kullanılarak *P. aeruginosa* PAO1 ve *S. aureus* suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine etkileri test edilmiştir.

3.1.8.1. Stres altındaki *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkileri

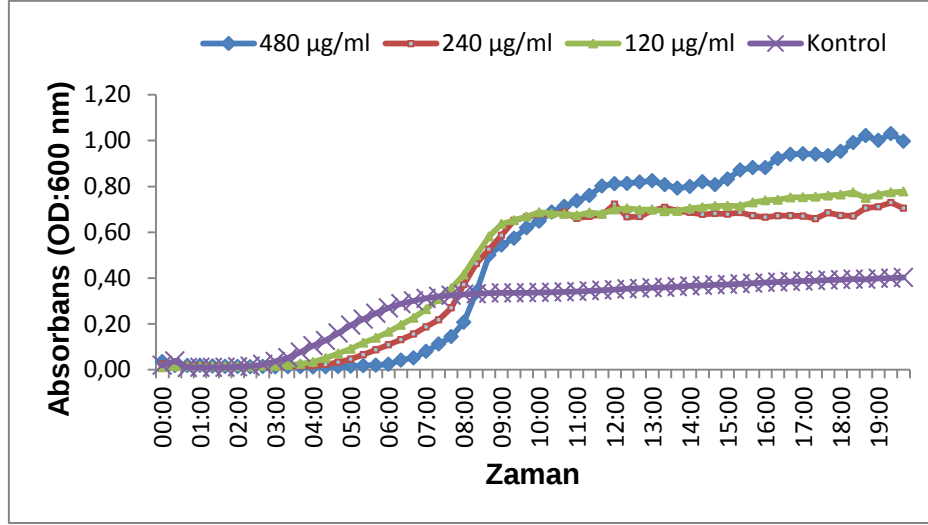
H. tubulosa mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden 480 µg/ml, 240 µg/ml, 120 µg/ml dozları bakteri suşları üzerine uygulanmıştır. 19 saat boyunca 20 dakikada bir alınan absorbans ölçümleri (OD: 600 nm) sonucunda elde edilen verilerle büyüme eğrisi grafikleri oluşturulmuştur. *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin büyümeyi inhibe eden dozları tespit edilmiştir.

Strese maruz bırakılmayan kontrol grubu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden 480 µg/ml, 240 µg/ml, 120 µg/ml dozları bakteri suşları üzerine uygulanmıştır. Tüm dozlarda *S.aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi inhibe ettiği gözlenmektedir. Ancak 120 µg/ml dozda örneklerde 13 saat sonra büyüme eğrisinde artış gözlenmiştir (Şekil 3.48).



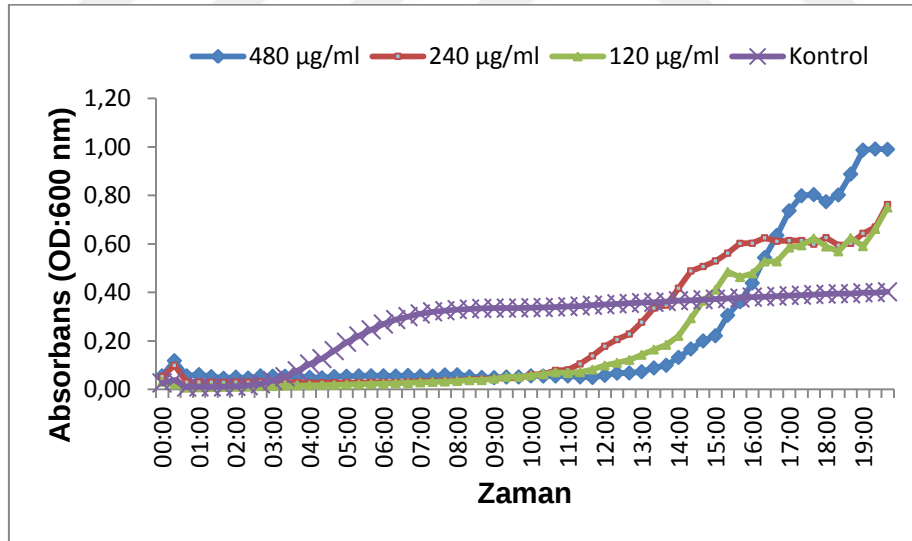
Şekil 3.48. Kontrol örneklerinin aseton özütünün *S.aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H1 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine ilk 6 saatte azaltıcı devamında ise artırıcı etkisi gözlenmiştir (Şekil 3.49).



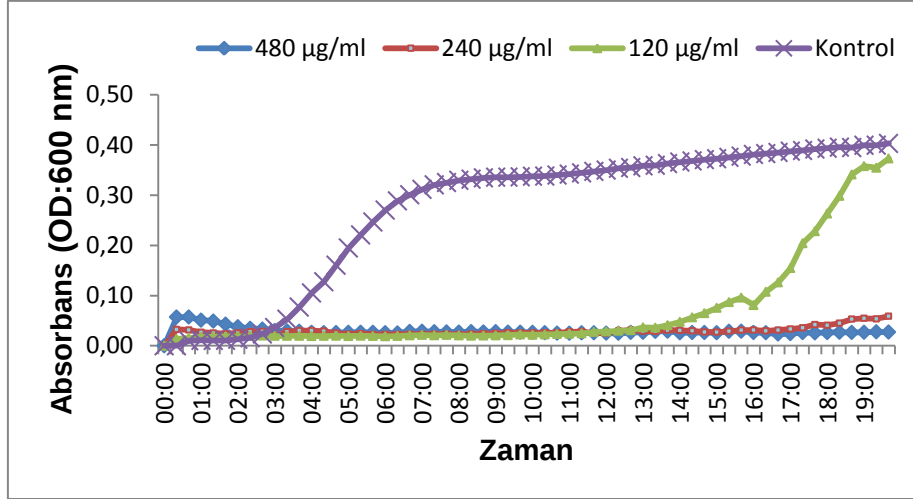
Şekil 3.49. H1 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H2 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine ilk 13 saatte azaltıcı, devamında ise artırıcı etkisi gözlenmiştir (Şekil 3.50).



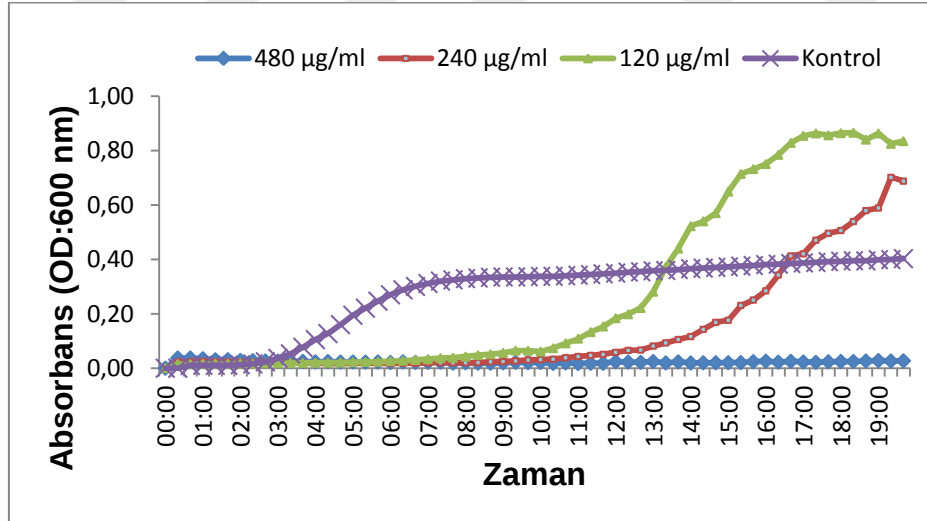
Şekil 3.50. H2 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H3 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine azaltıcı etkisi gözlenmiştir. Devamında ise özellikle 120 µg/ml dozda büyüme eğrisinde artış ortaya çıkmıştır (Şekil 3.51).



Şekil 3.51. H3 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

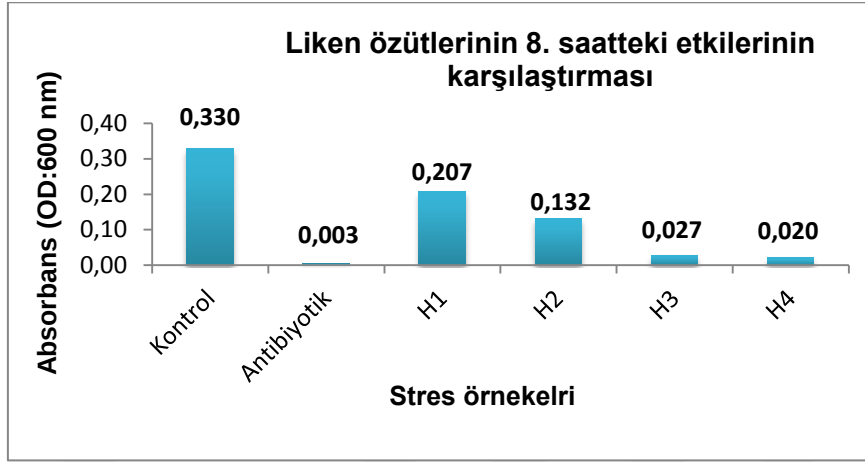
15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H4 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine azaltıcı etkisi gözlenmiştir. Özellikle 480 µg/ml dozda büyüme tamamen inhibe edilmiştir. Ancak 240 µg/ml, 120 µg/ml dozda büyüme eğrisinde 12 saat sonra artış ortaya çıkmıştır (Şekil 3.52).



Şekil 3.52. H4 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

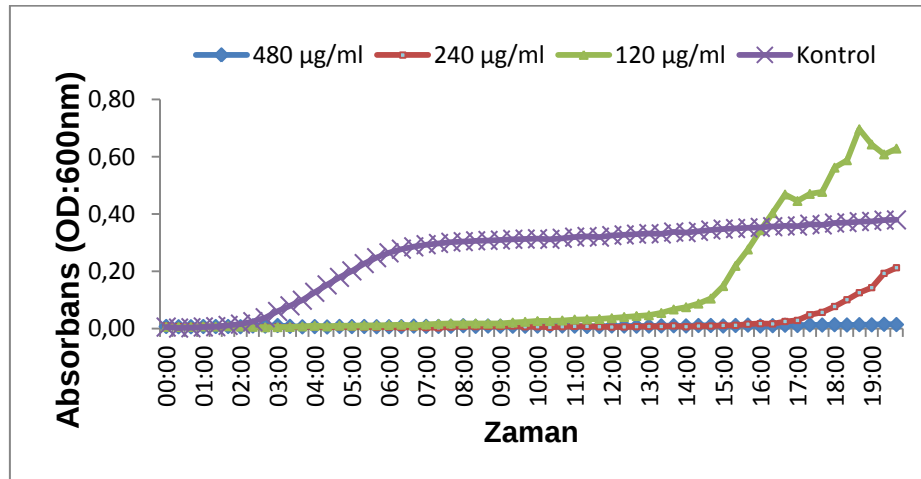
Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan 15 günlük H1, H2, H3 ve H4 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda tüm gruplar için *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine 8. saat sonundaki etkisi incelendiğinde tüm örneklerin büyümeyi inhibe ettiği ancak antibiyotik kadar etkili olmadığı gözlenmiştir

(Şekil 3.53). H3 ve H4 kodlu örneklerin daha etkili olduğu buna bağlı olarak 15 °C'nin etken madde üretimi yönünde daha etkili olabileceği görülmektedir.



Şekil 3.53. Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan 15 günlük örneklerin 480 µg/ml aseton özütünün 8. saatte *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması

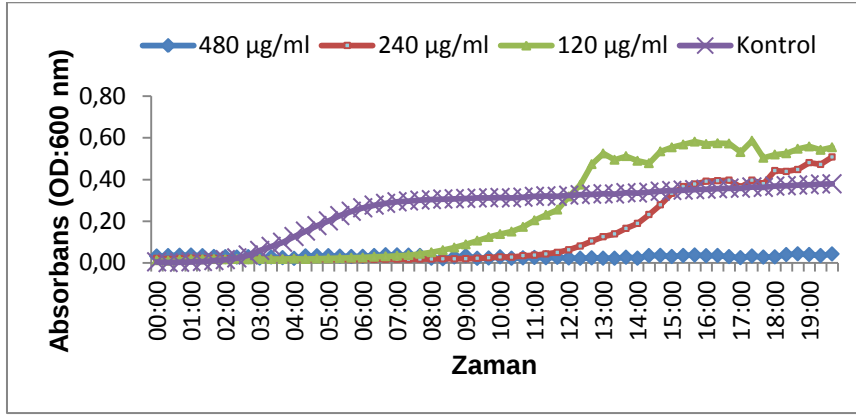
37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H5 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine azaltıcı etkisi gözlenmiştir. Özellikle 480 µg/ml dozda büyüme tamamen inhibe edilmiştir. Ancak 240 µg/ml, 120 µg/ml dozda büyüme eğrisinde daha sonra artış ortaya çıkmıştır (Şekil 3.54).



Şekil 3.54. H5 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

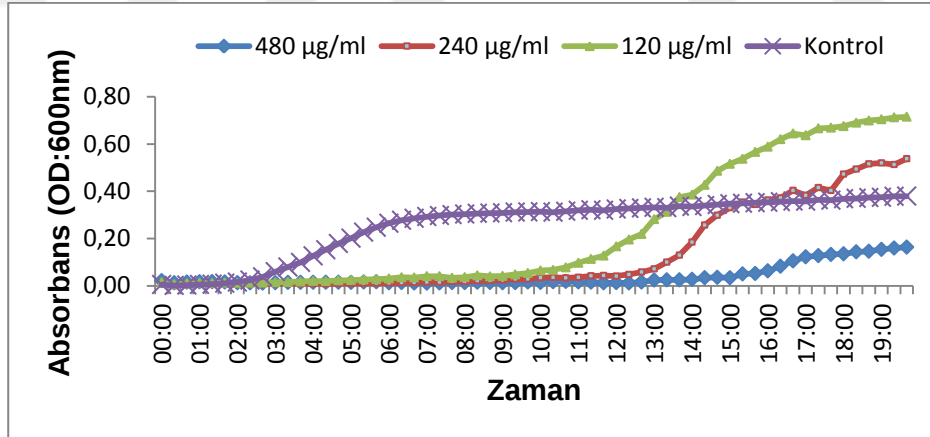
37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H6 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda ilk 8 saatte *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine azaltıcı etkisi gözlenmiştir. Özellikle 480 µg/ml dozda büyüme tamamen

inhibe edilmiştir. Ancak 240 µg/ml, 120 µg/ml dozda büyüme eğrisinde daha sonra artış ortaya çıkmıştır (Şekil 3.55).



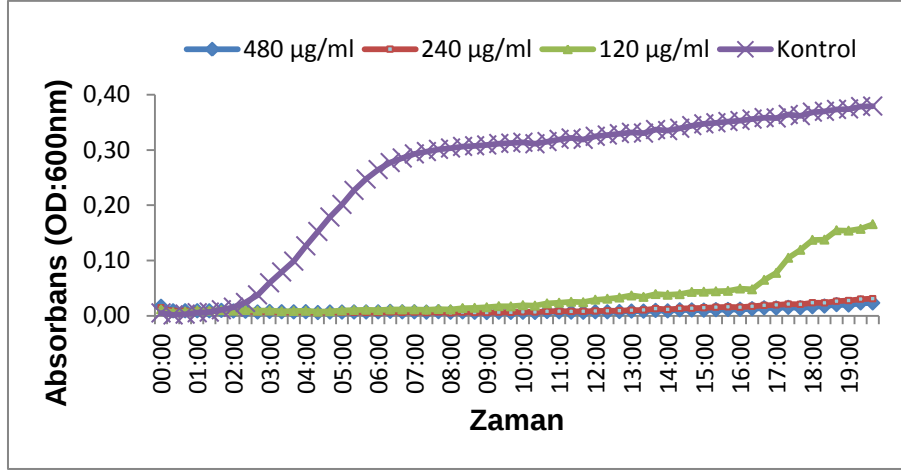
Şekil 3.55. H6 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H7 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S.aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine azaltıcı etkisi gözlenmiştir. Ancak büyüme eğrisinde daha sonra artış ortaya çıkmıştır (Şekil 3.56).



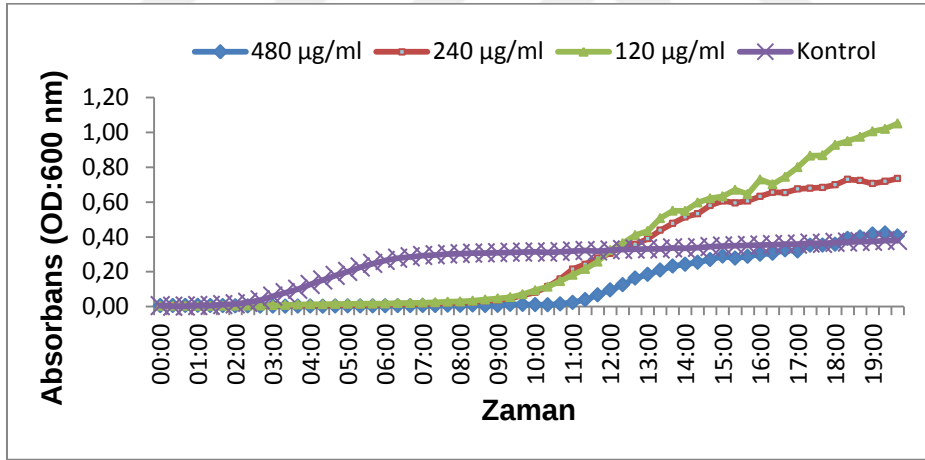
Şekil 3.56. H7 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H8 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine azaltıcı etkisi gözlenmiştir. Ancak büyüme eğrisinde daha sonra 120 µg/ml dozda artış ortaya çıkmıştır (Şekil 3.57).



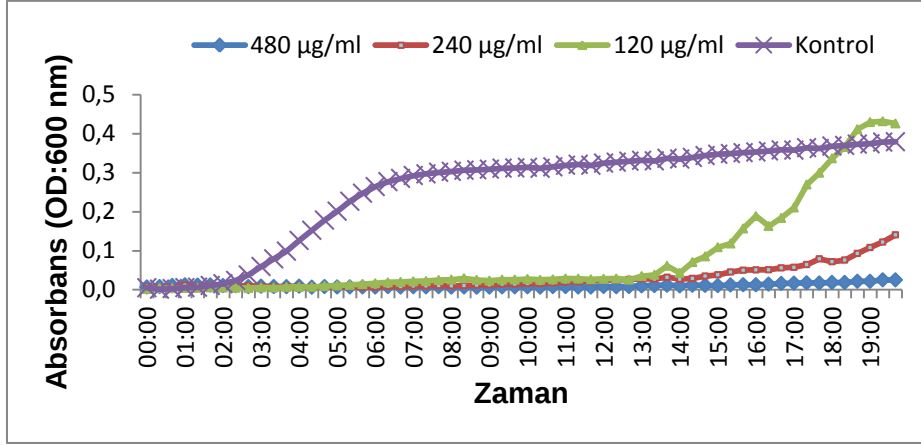
Şekil 3.57. H8 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H9 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine azaltıcı etkisi gözlenmiştir. Ancak büyüme eğrisinde daha sonra tüm dozlarda artış ortaya çıkmıştır (Şekil 3.58).



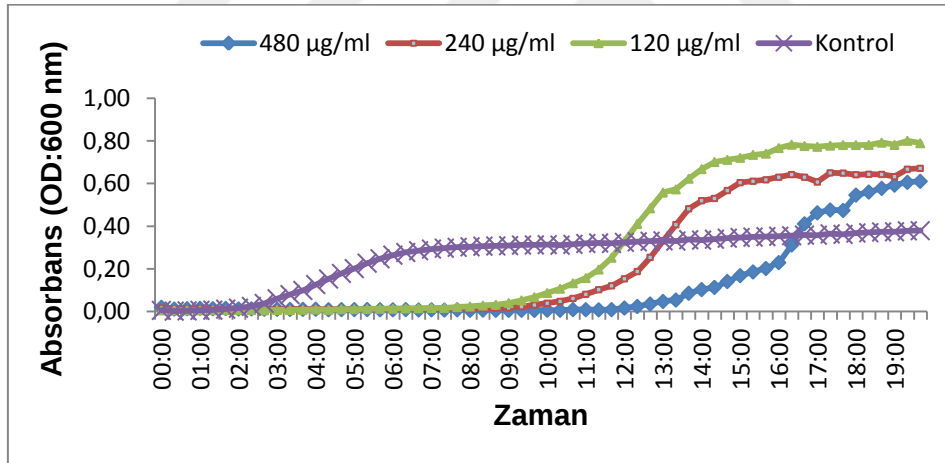
Şekil 3.58. H9 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H10 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyümeyi inhibe edici etkisi gözlenmiştir. Özellikle 480 µg/ml dozda büyüme tamamen inhibe edilmiştir. Ancak büyüme eğrisinde daha sonra diğer dozlarda artış ortaya çıkmıştır (Şekil 3.59).



Şekil 3.59. H10 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

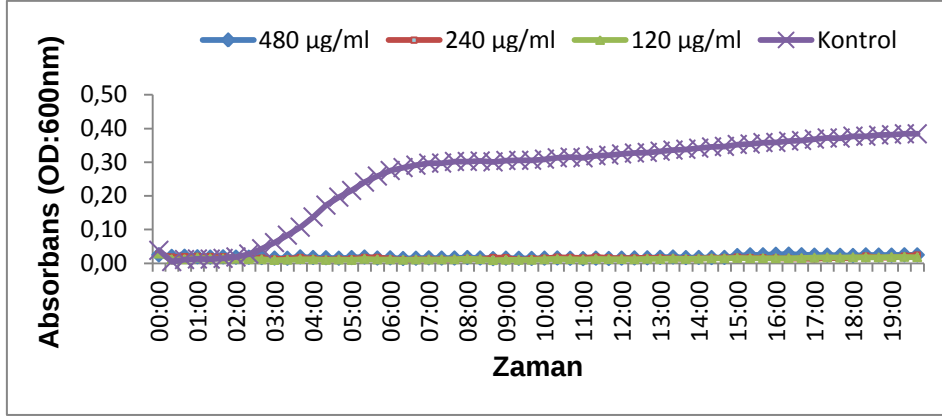
15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H11 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda ilk 9 saatte *S. aureus* suşunun büyümeyi inhibe edici etkisi gözlenmiştir. Ancak büyüme eğrisinde daha sonra tüm dozlarda artış ortaya çıkmıştır (Şekil 3.60).



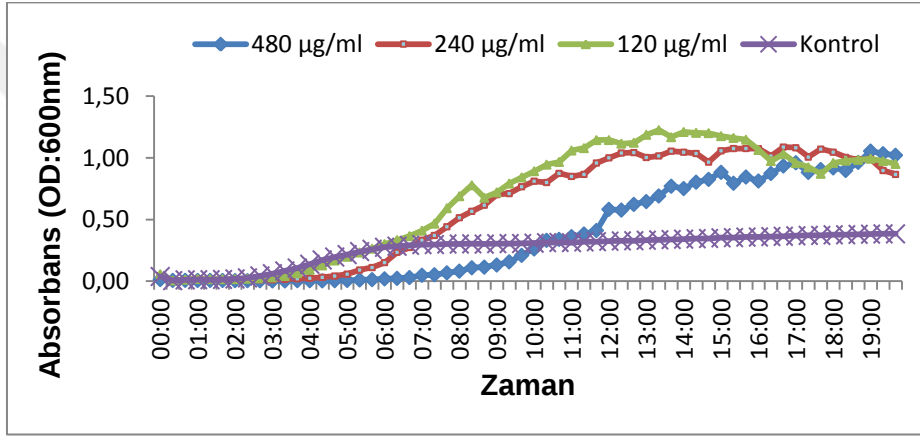
Şekil 3.60. H11 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H12 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyümeyi inhibe edici etkisi gözlenmiştir (Şekil 3.61).

15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H13 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda başlangıçta *S. aureus* suşunun büyümesi azalmıştır. Ancak devamında tüm dozlarda büyümeyi artırıcı etki gözlenmiştir (Şekil 3.62).

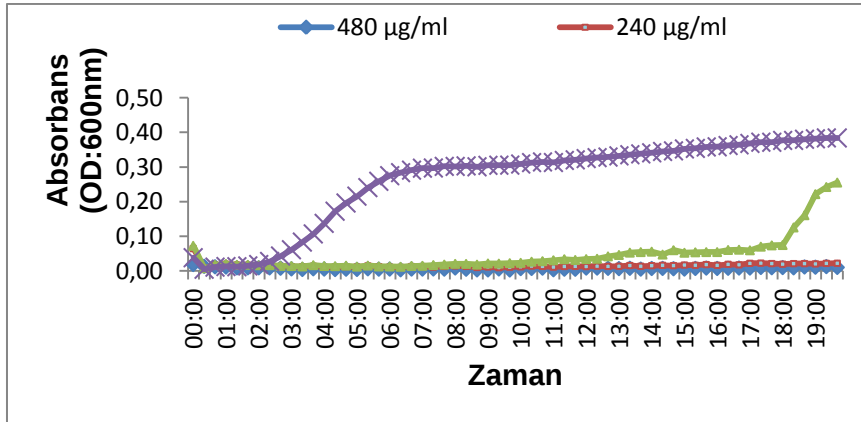


Şekil 3.61. H12 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi



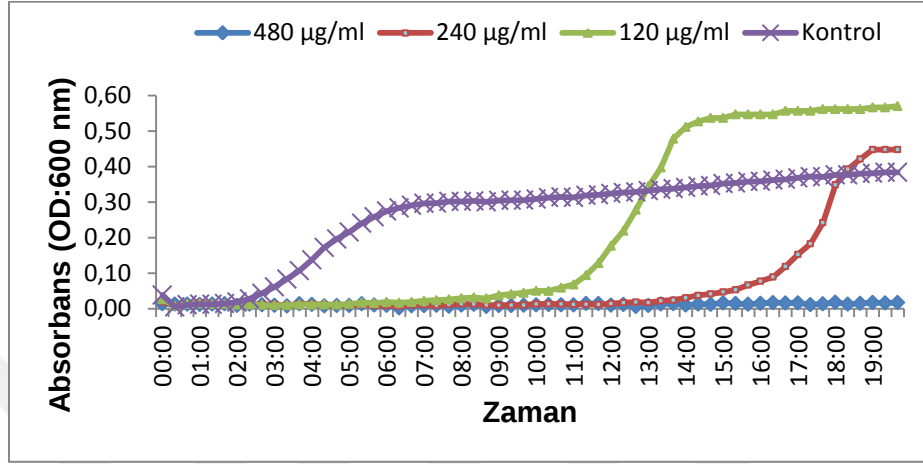
Şekil 3.62. H13 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H14 kodlu mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyümesini inhibe etmiştir (Şekil 3.63).



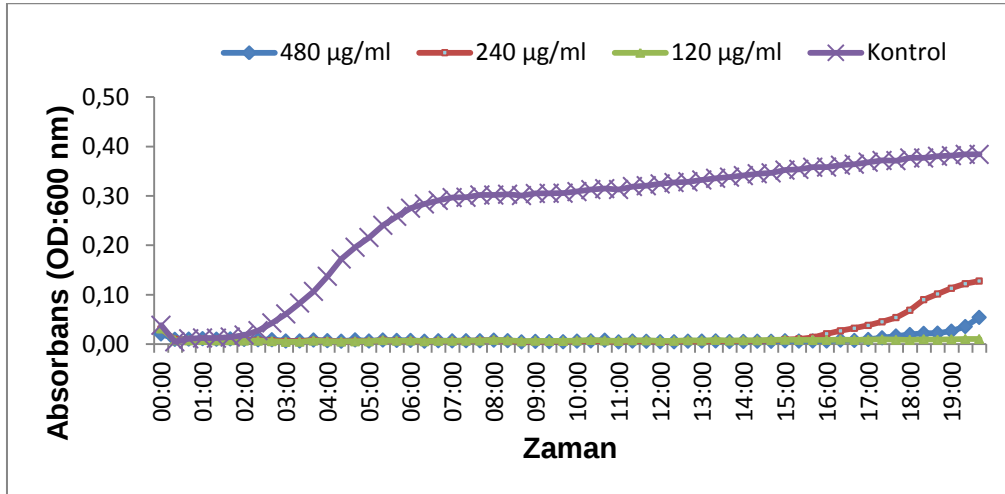
Şekil 3.63. H14 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H15 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyümeyi inhibe ettiği belirlenmiştir. Ancak 240 µg/ml, 120 µg/ml dozda büyüme eğrisinde daha sonra artış ortaya çıkmıştır (Şekil 3.64).



Şekil 3.64. H15 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

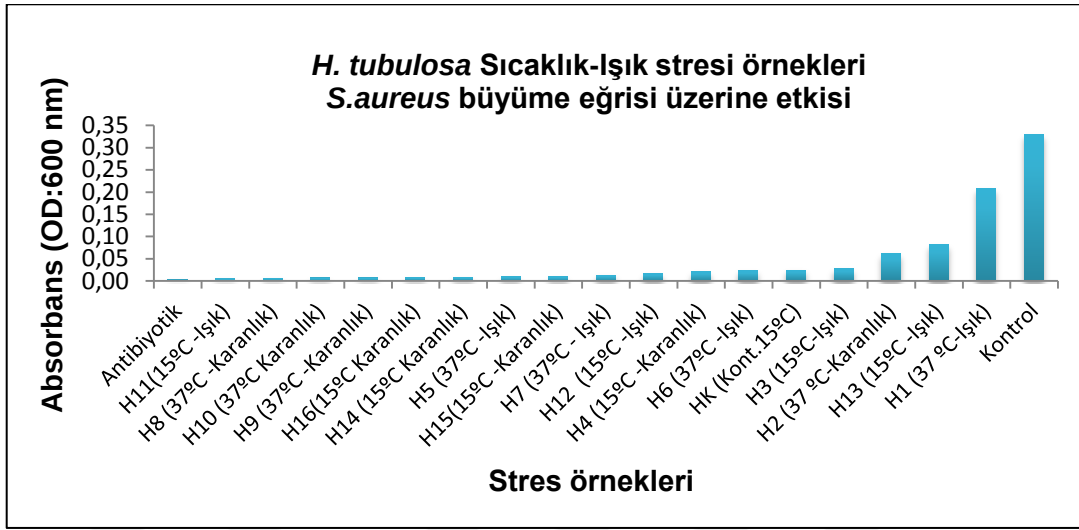
15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H16 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyümeyi inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.65).



Şekil 3.65. H16 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda tüm gruplar için *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine 8. saat sonundaki etkisi incelendiğinde tüm örneklerin büyümeyi inhibe ettiği

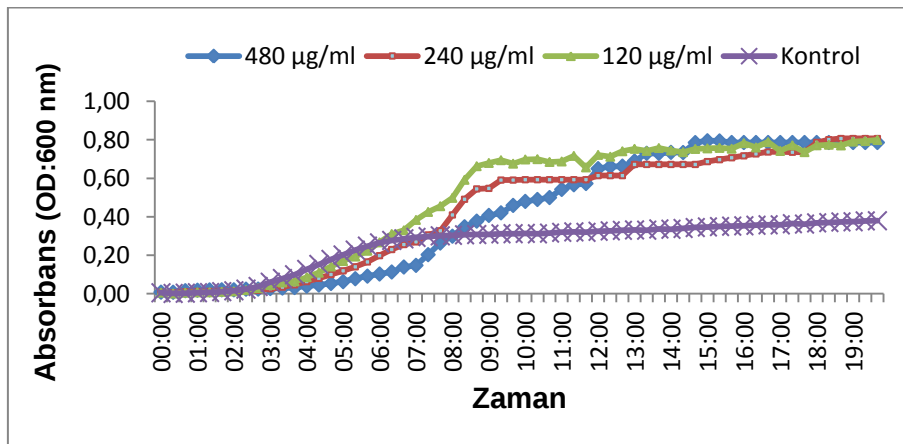
ancak antibiyotik kadar etkili olmadığı gözlenmiştir. 8. saatte en etkili örnek grubunun H11 olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.66).



Şekil 3.66. Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan örneklerin 480 µg/ml aseton özütünün 8. saatte *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması

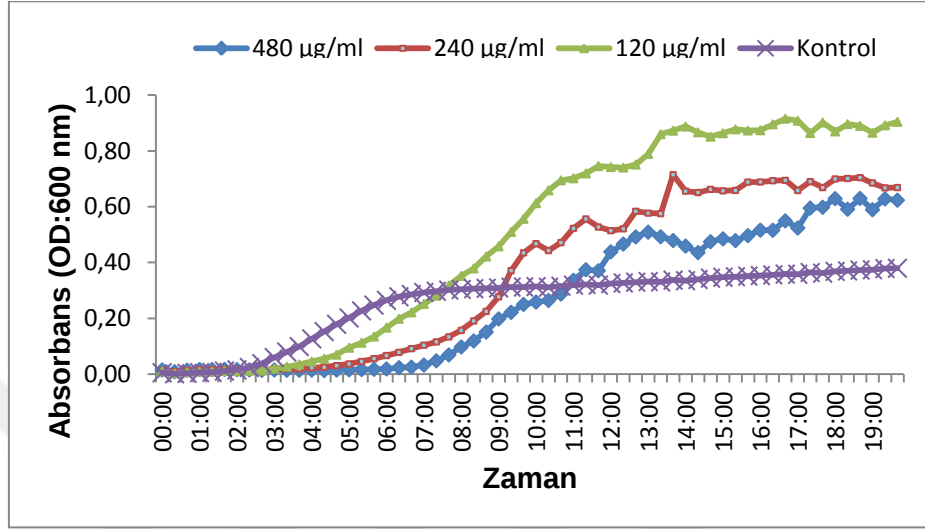
Aynı plakada büyüyen örneklerde ekspresyon seviyesi yüksek olan örneklerin *S.aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki aktivitesinin de daha yüksek olduğu gözlenmiştir. En yüksek ekspresyon seviyesine sahip H11 örneği en yüksek inhibisyonu göstermiştir. Ortalamaya göre karanlık ortamda ekspresyon yüksektir. *S.aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki aktivite yönünden de karanlık ortam daha etkili bulunmuştur.

Nitrat stresine maruz bırakılan HS1 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S.aureus* suşunun büyümesini artırdığı belirlenmiştir (Şekil 3.67).



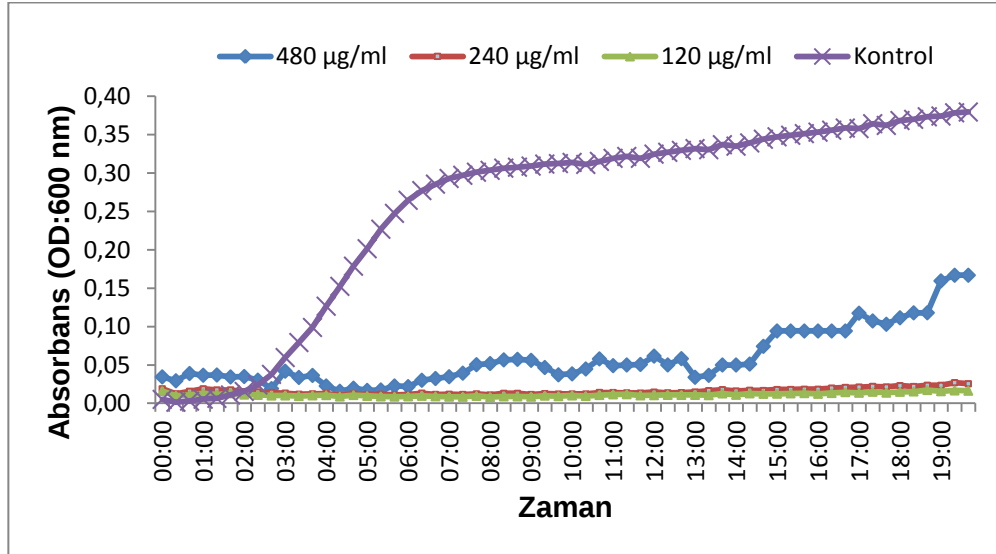
Şekil 3.67. HS1 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan HS2 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda önce *S. aureus* suşunun büyümesinin azaldığı ancak zamanla büyümenin arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.68).



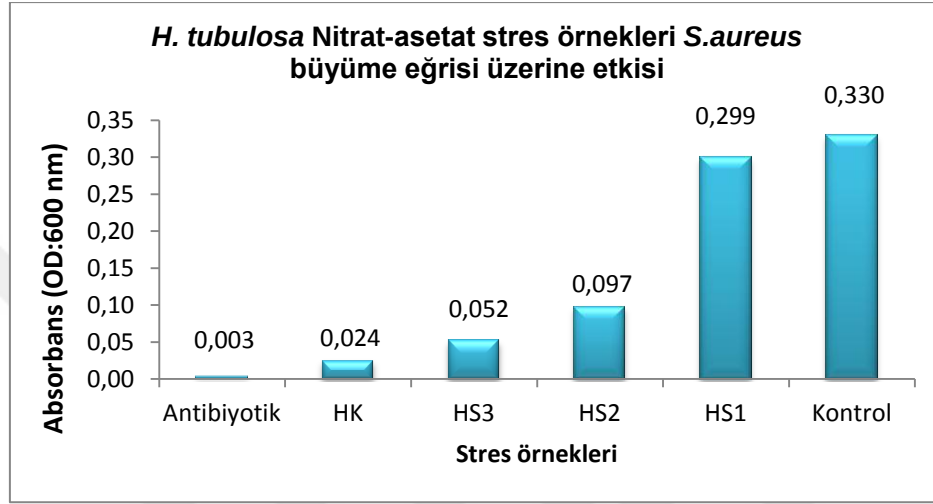
Şekil 3.68. HS2 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

Asetat stresine maruz bırakılan HS3 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozlarda *S. aureus* suşunun büyümesinin azaldığı tespit edilmiştir. Ancak 480 µg/ml dozda zamanla büyüme gözlenmiştir (Şekil 3.69).



Şekil 3.69. HS3 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda tüm gruplar için *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerine 8. saat sonundaki etkisi incelendiğinde tüm örneklerin büyümeyi inhibe ettiği ancak antibiyotik kadar etkili olmadığı gözlenmiştir. Strese maruz bırakılmayan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin büyüme eğrisi üzerine inhibe edici etkisinin daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 3.70).



Şekil 3.70. Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan 15 günlük örneklerin 480 µg/ml aseton özütünün 8. saatte *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması

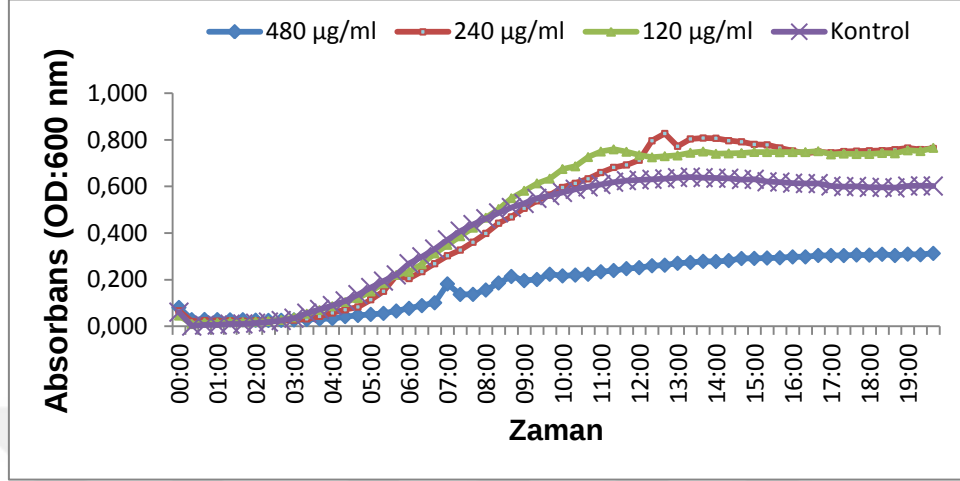
Asetat stresine maruz bırakılan HS3 kodlu örneklerin gen ekspresyon seviyesi ve *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi üzerindeki aktivitesi diğer stres koşullarına göre daha yüksektir. Bu bulgular gen ekspresyon seviyesi ile aktivite arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

3.1.8.2. Stres altındaki *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkileri

H. tubulosa mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden 480 µg/ml, 240 µg/ml, 120 µg/ml dozları *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine uygulanmıştır. 19 saat boyunca 20 dakikada bir alınan absorbans ölçümleri (OD: 600 nm) sonucunda elde edilen verilerle büyüme eğrisi grafikleri oluşturulmuştur. *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin büyümeyi inhibe eden dozları tespit edilmiştir.

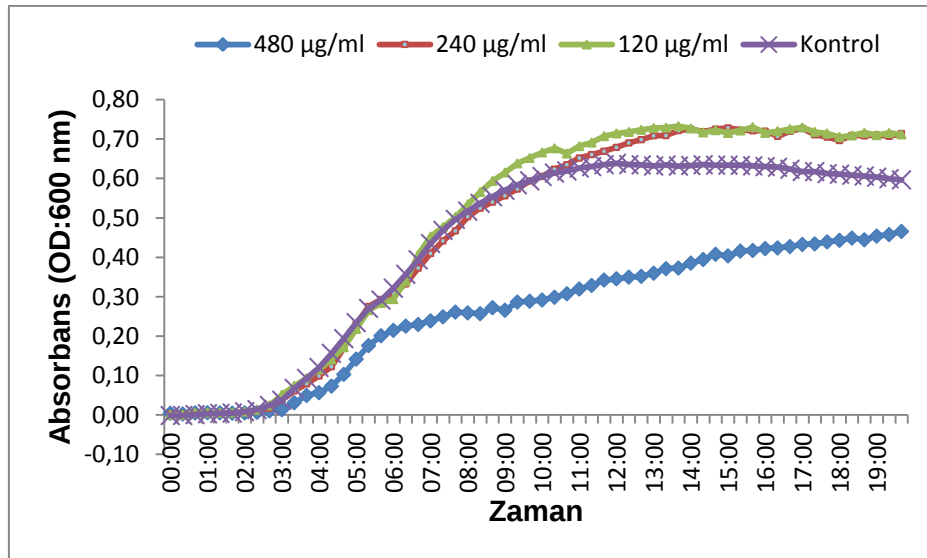
Strese maruz bırakılmayan kontrol grubu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin

aseton özütlerinden 480 µg/ml, 240 µg/ml, 120 µg/ml dozları *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine uygulanmıştır. 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmektedir (Şekil 3.71).



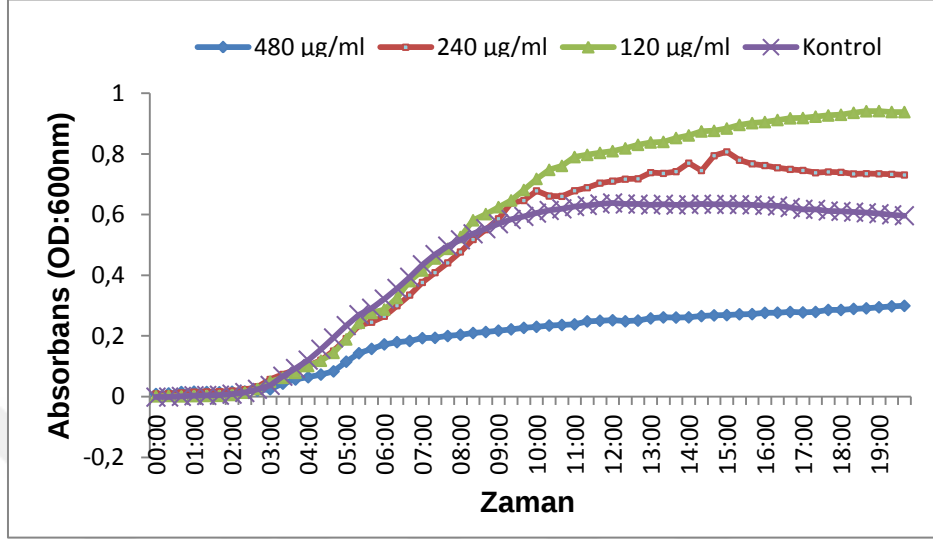
Şekil 3.71. HK kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H1 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.72).



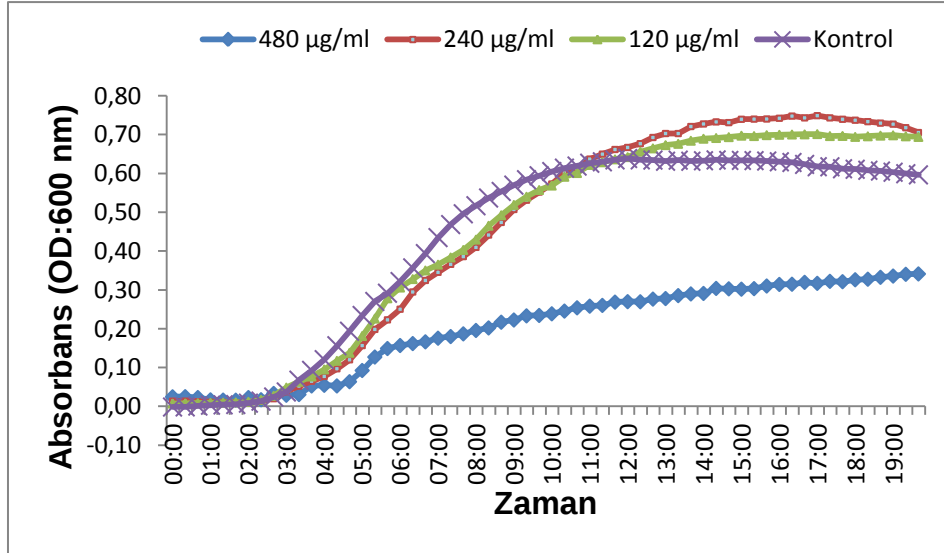
Şekil 3.72. H1 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H2 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.73).



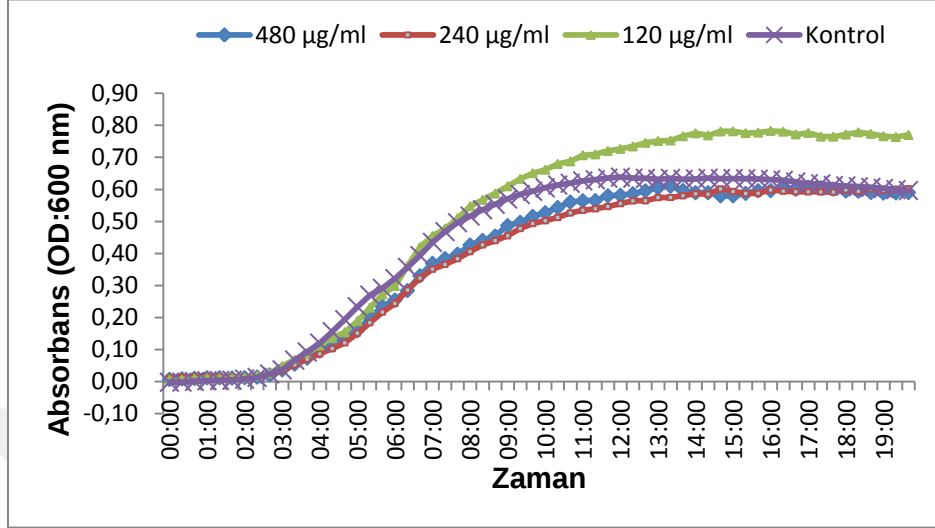
Şekil 3.73. H2 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H3 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.74).



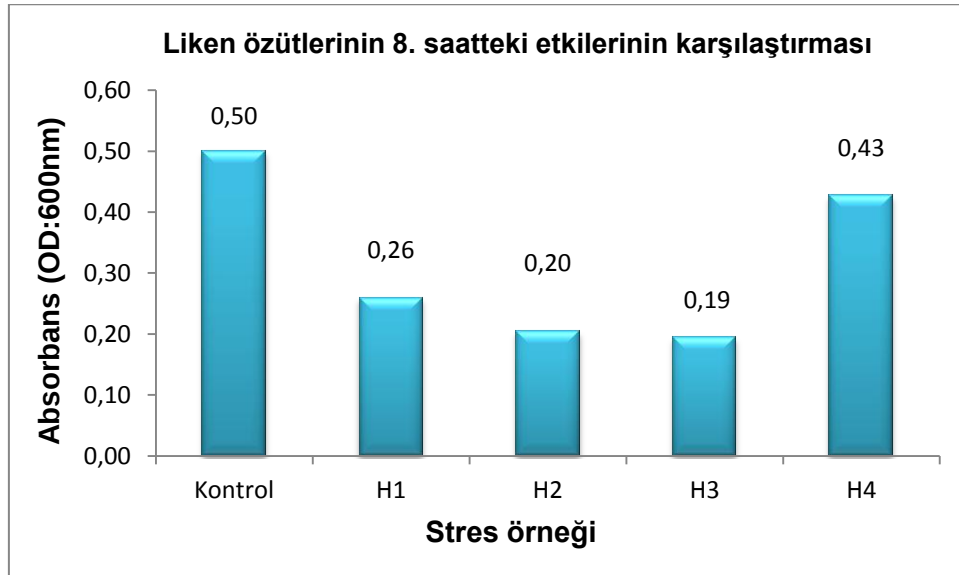
Şekil 3.74. H3 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H4 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 ve 240 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.75).



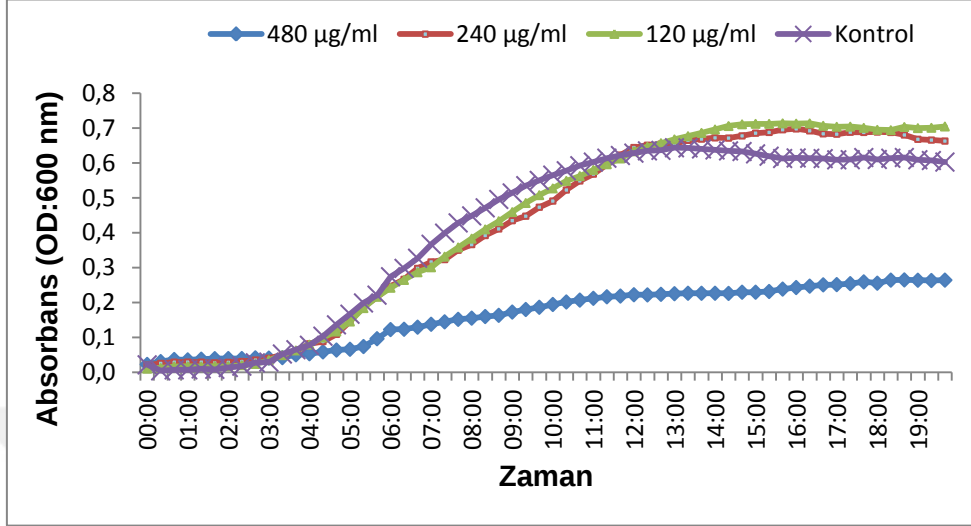
Şekil 3.75. H4 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan 15 günlük H1, H2, H3 ve H4 kodlu *H.tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda tüm gruplar için *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine 8. saat sonundaki etkisi incelendiğinde tüm örneklerin büyümeyi inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 3.76).



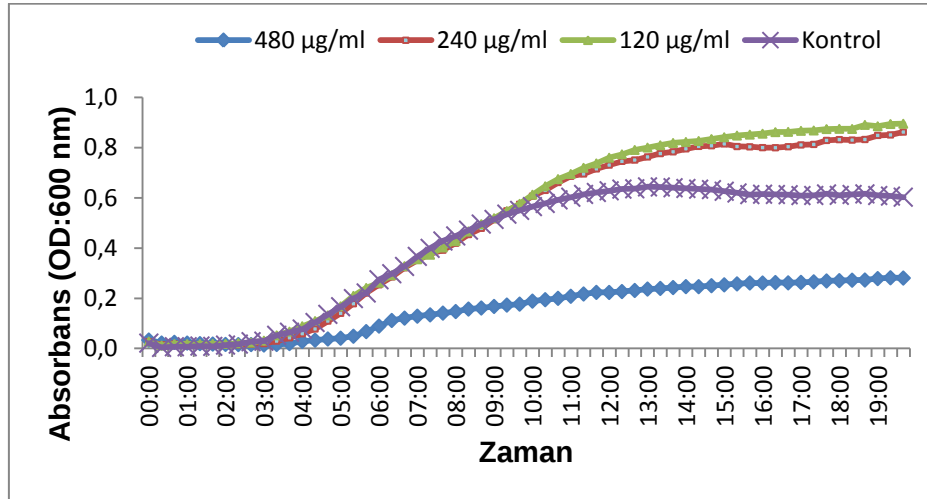
Şekil 3.76. Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan 15 günlük örneklerin 480 µg/ml aseton özütünün 8. saatte *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması

37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H5 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.77).



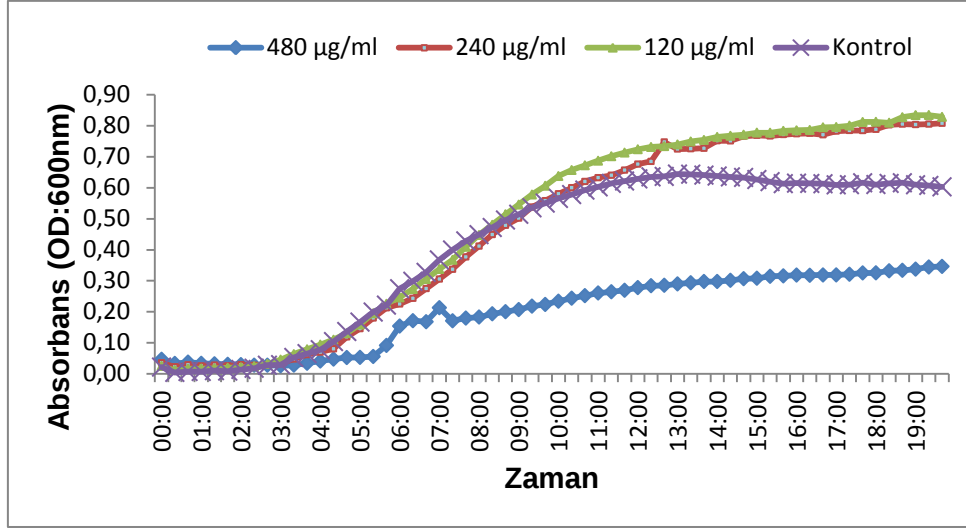
Şekil 3.77. H5 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H6 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.78).



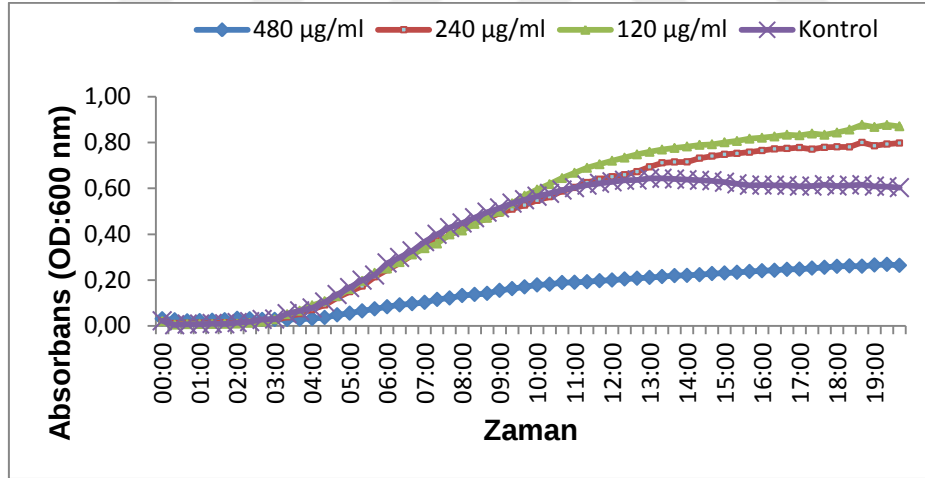
Şekil 3.78. H6 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H7 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.79).



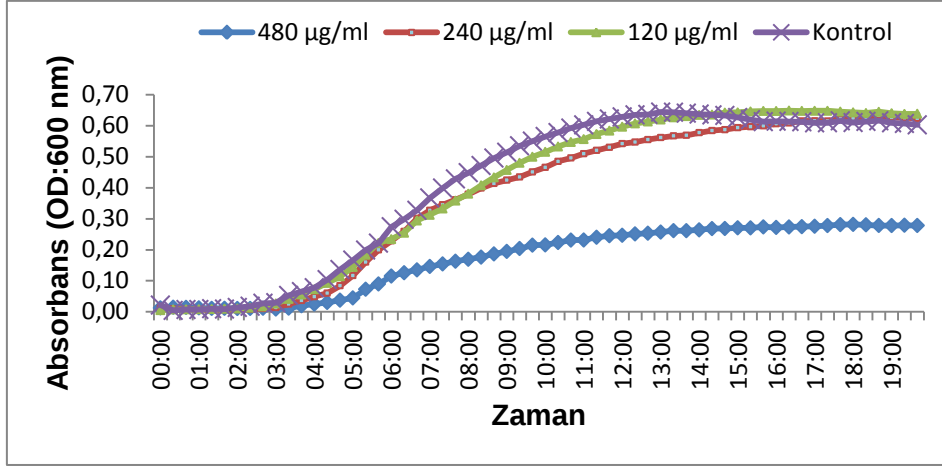
Şekil 3.79. H7 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H8 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.80).



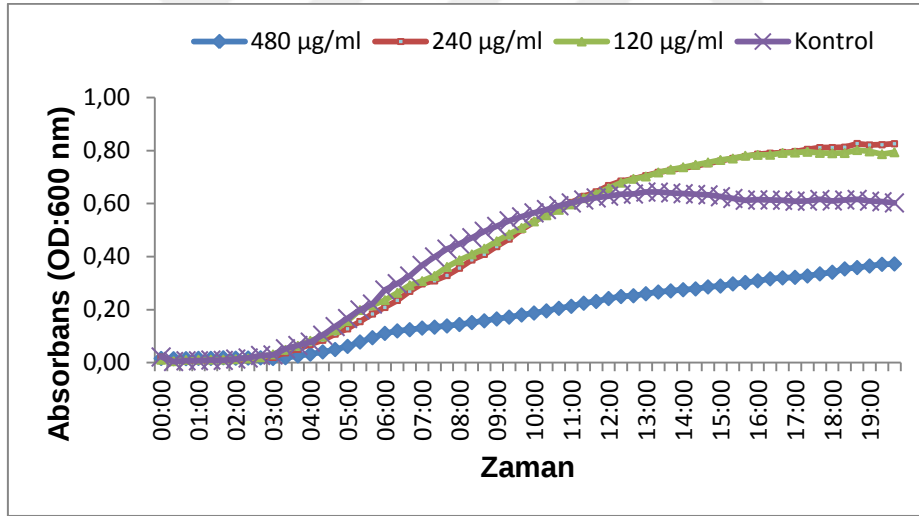
Şekil 3.80. H8 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H9 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.81).



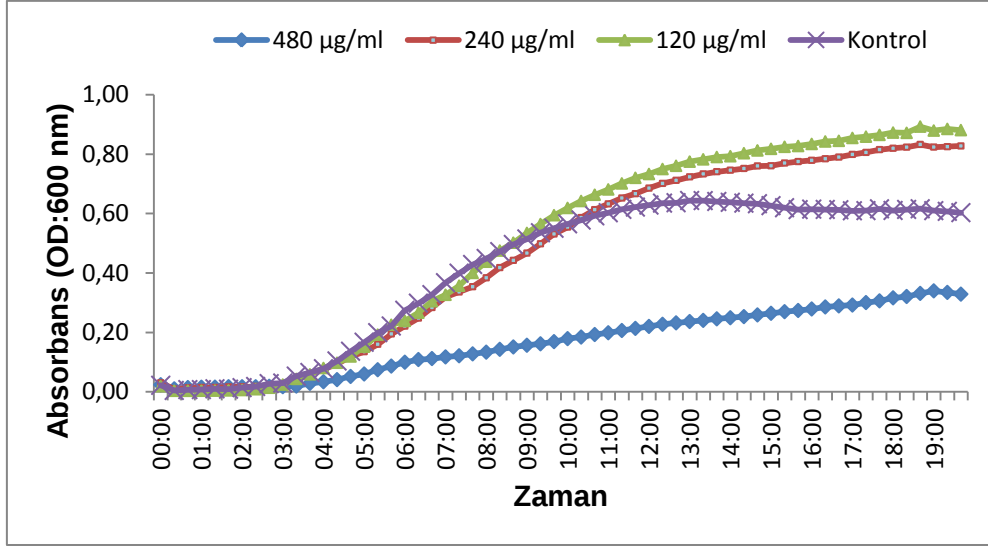
Şekil 3.81. H9 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H10 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyüme azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.82).



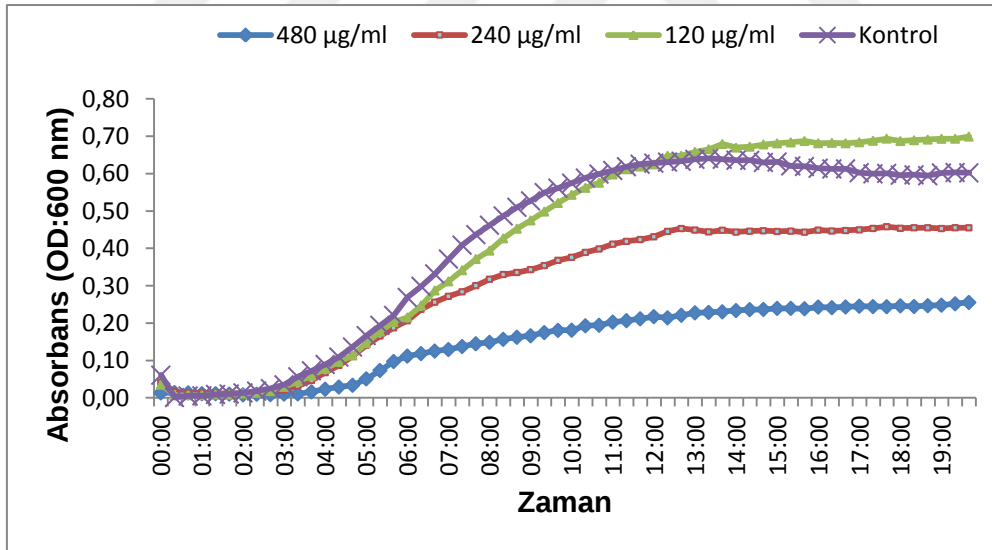
Şekil 3.82. H10 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H11 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyüme azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.83).



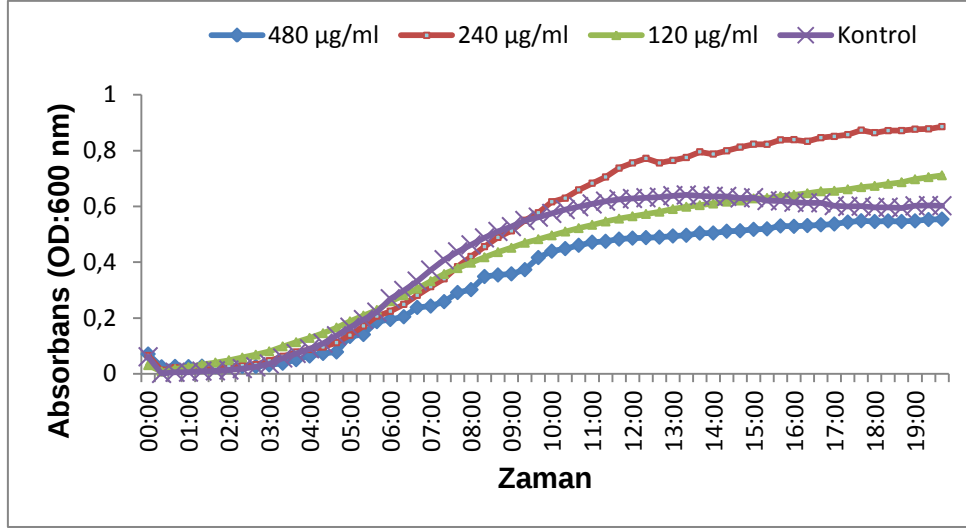
Şekil 3.83. H11 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H12 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 ve 240 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.84).



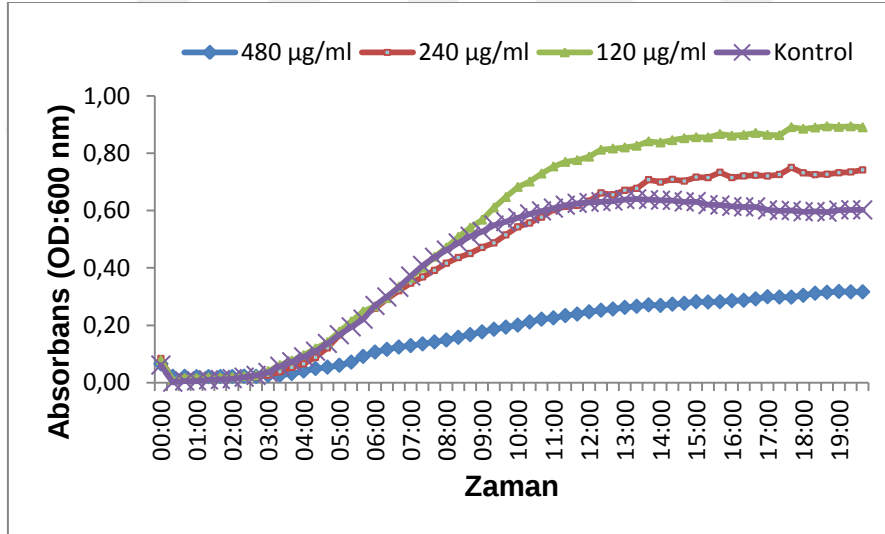
Şekil 3.84. H12 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan H13 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozunun *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.85).



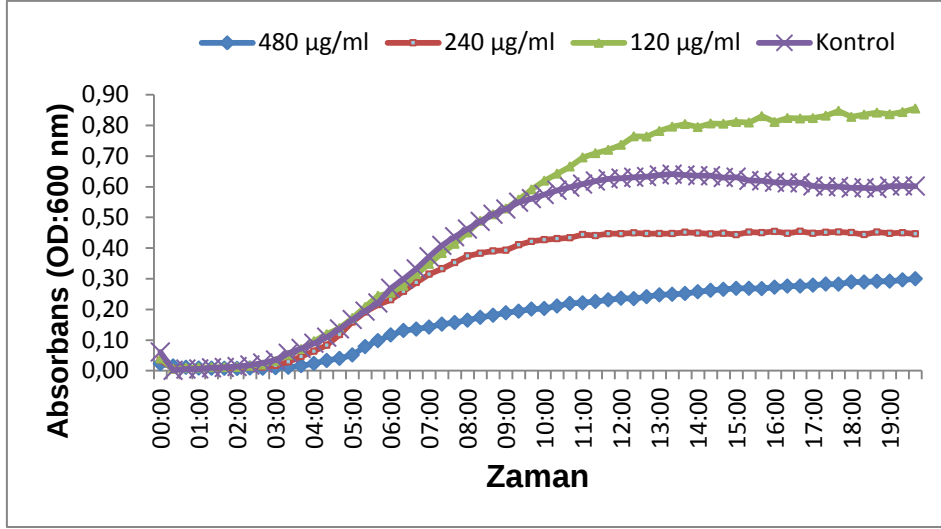
Şekil 3.85. H13 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H14 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.86).



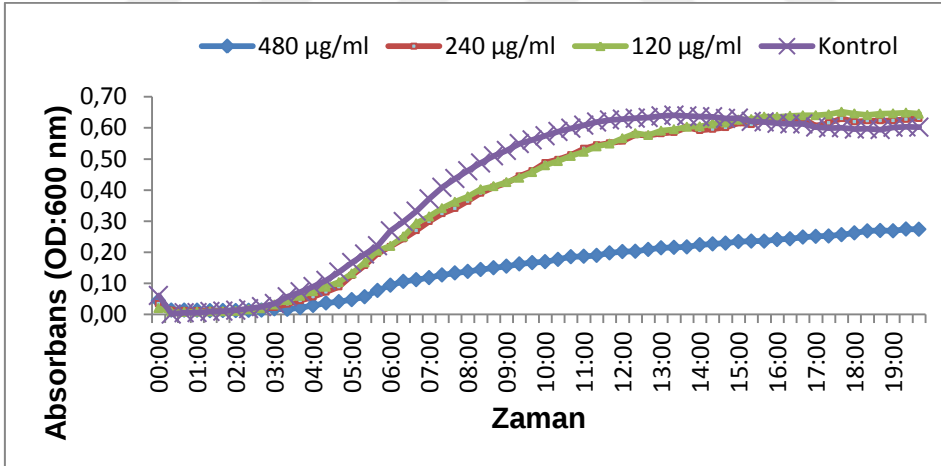
Şekil 3.86. H14 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H15 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.87).



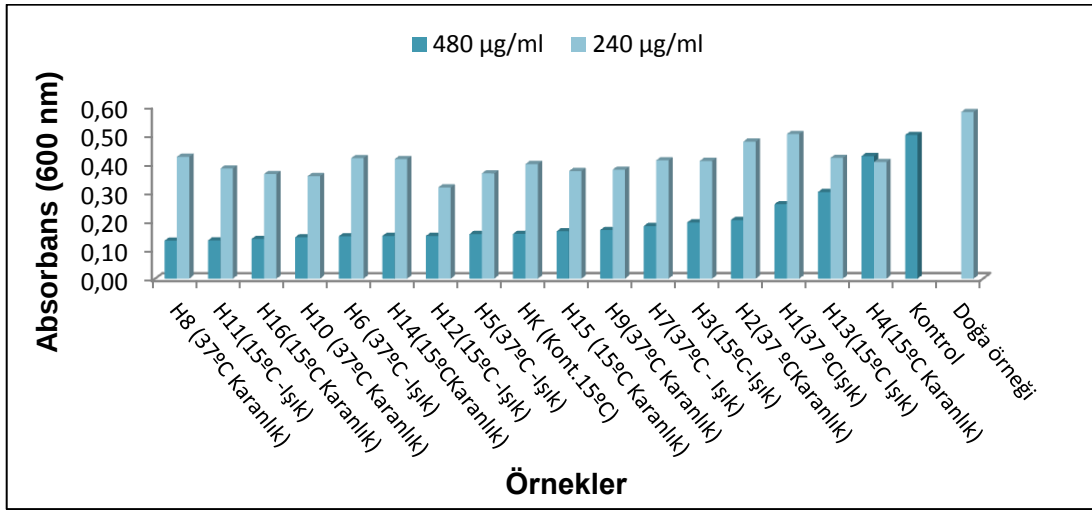
Şekil 3.87. H15 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan H16 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.88).



Şekil 3.88. H16 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

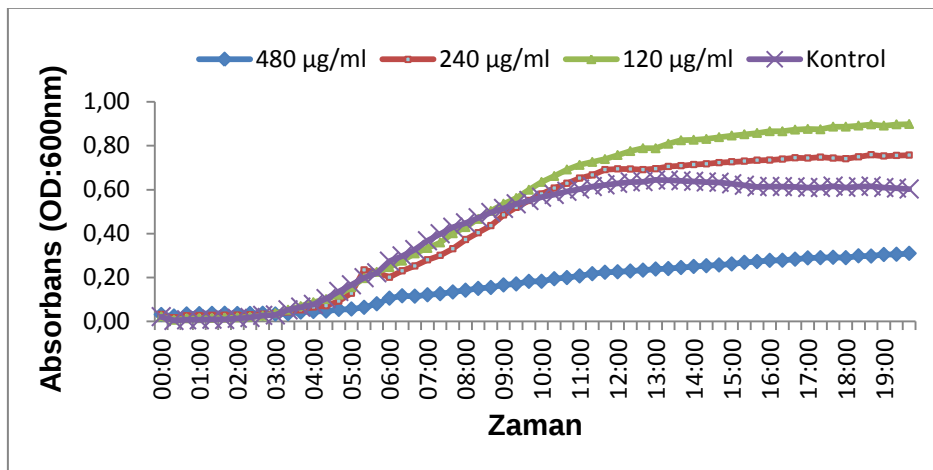
Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 ve 240 µg/ml dozda tüm gruplar için *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine 8. saat sonundaki etkisi incelendiğinde tüm örneklerin büyümeyi inhibe ettiği gözlenmiştir. Doğa örneği ile karşılaştırıldığında 240 µg/ml dozda tüm örneklerin 8. saatte daha etkili olduğu tespit edilmiştir. 480 µg/ml dozda en etkili örnek grubunun H8 olduğu görülmüştür (Şekil 3.89).



Şekil 3.89. Doğa örneğinin 240 µg/ml, sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan örneklerin 240 ve 480 µg/ml aseton özütünün 8. saatte *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması

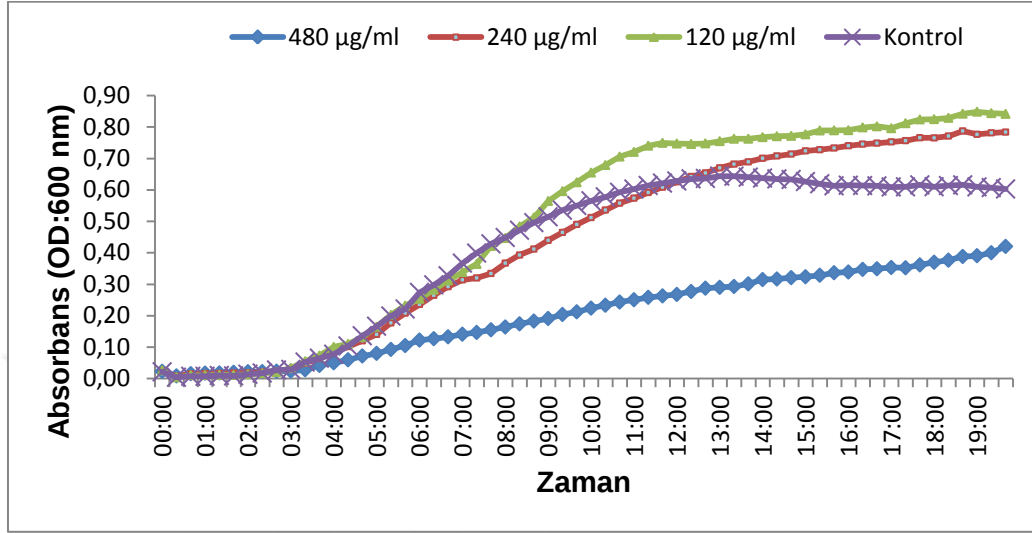
Ortalamaya göre karanlık ortamda ekspresyon seviyesi daha yüksek belirlenmiştir. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki aktivite incelendiğinde karanlık ortama maruz bırakılan örneklerin aktivitesinin genellikle daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Nitrat stresine maruz bırakılan HS1 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.90).



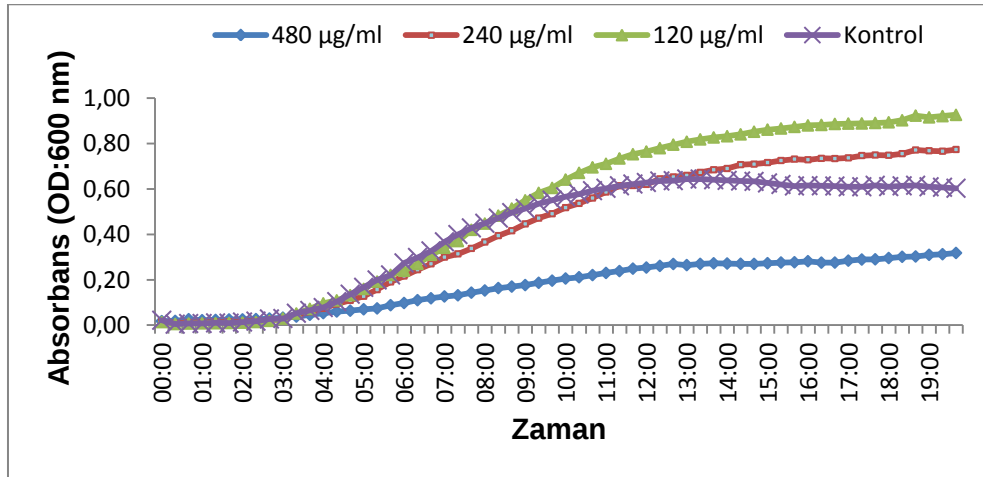
Şekil 3.90. HS1 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan HS2 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.91).



Şekil 3.91. HS2 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

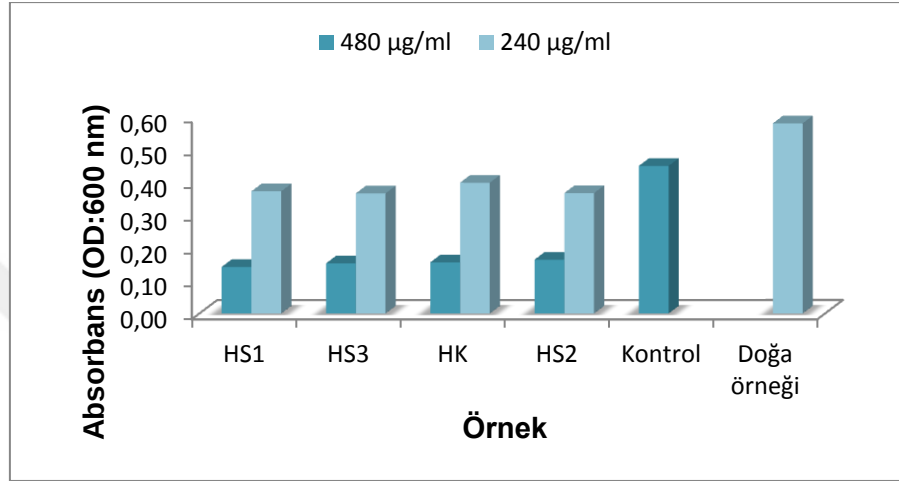
Asetat stresine maruz bırakılan HS3 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine etki ederek büyümeyi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.92).



Şekil 3.92. HS3 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisi

Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 ve 240 µg/ml dozda tüm gruplar için *P. aeruginosa* PAO1 suşunun

büyüme eğrisi üzerine 8. saat sonundaki etkisi incelendiğinde tüm örneklerin büyüme eğrisi üzerine inhibe ettiği gözlenmiştir. Strese maruz bırakılmayan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin büyüme eğrisi üzerine inhibe edici etkisinin diğer örneklerden çok farklı olmadığı belirlenmiştir. Doğa örneğinin 240 µg/ml dozda büyüme eğrisi üzerine inhibe etmediği hatta artırdığı gözlenirken nitrat-asetat stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin büyüme eğrisi üzerine az da olsa azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.93).

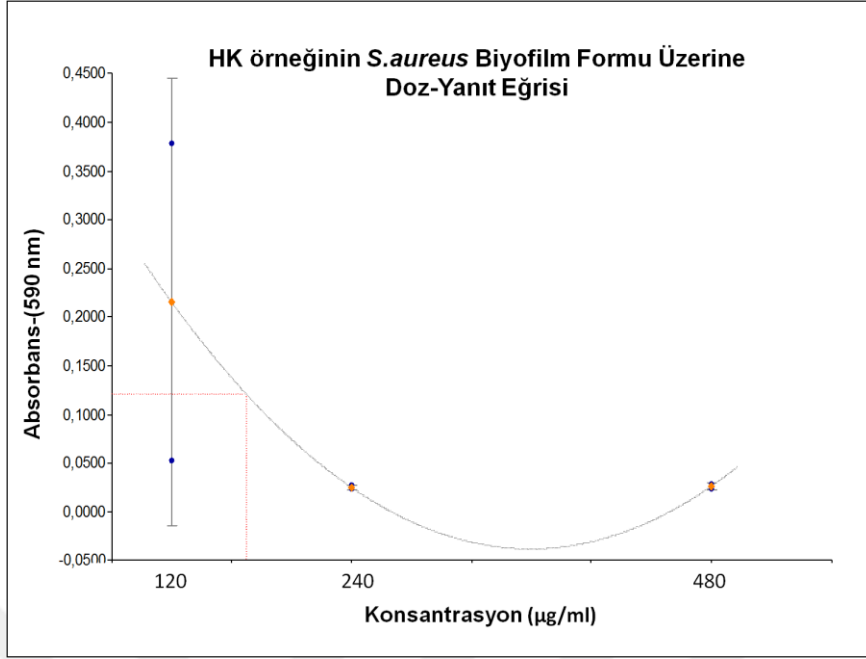


Şekil 3.93. Nitrat-Asetat stresine maruz bırakılan örneklerin 240 ve 480 µg/ml aseton özütünün 8. saatte *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerindeki etkisinin karşılaştırması

3.1.8.3. Stres altındaki *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin *S.aureus* suşlarının üzerindeki anti-biyofilm etkileri

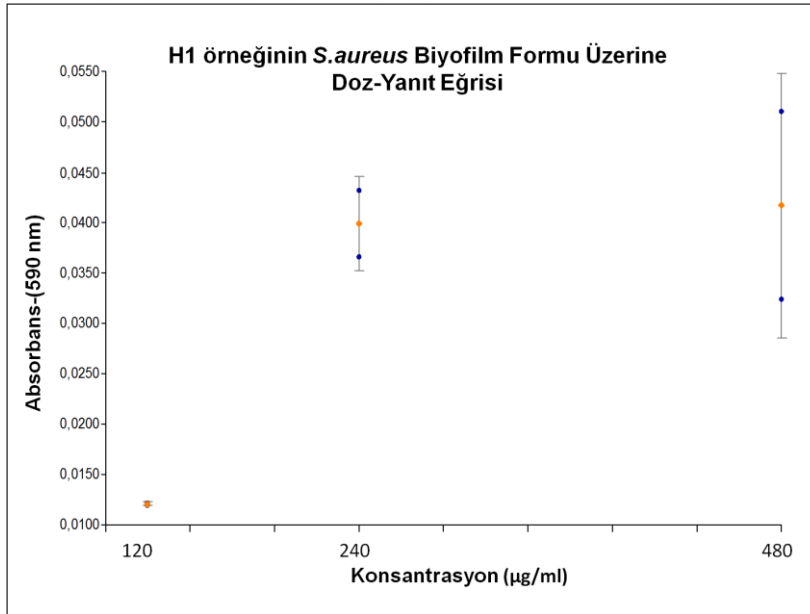
Stres altındaki *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün *S.aureus* suşunun biyofilm formu üzerine etkisini incelemek için büyüme eğrisi üzerine etkisinin incelendiği testlerde tercih edilen dozlar uygulanmıştır. Hazırlanan plakalar 24 saat inkübe edildikten sonra kontrol grupları ile aseton özütü içeren grupların bulunduğu kuyucuklardaki biyofilm oluşumu Cytation 3 (BioTek) cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları kullanılarak biyofilm inhibisyon grafikleri oluşturulmuştur.

Strese maruz bırakılmayan kontrol grubu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden 480 µg/ml, 240 µg/ml, 120 µg/ml dozları bakteri suşları üzerine uygulanmıştır. Tüm dozlarda *S.aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ancak en etkili doz 480 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 3.94).



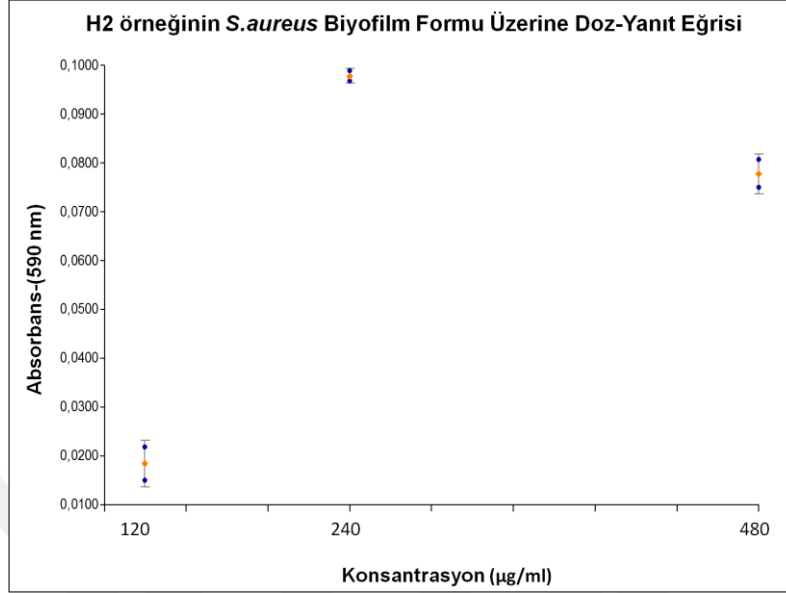
Şekil 3.94. HK kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H1 kodlu, 37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin tüm dozlarda *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ancak en etkili doz 120 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 3.95).



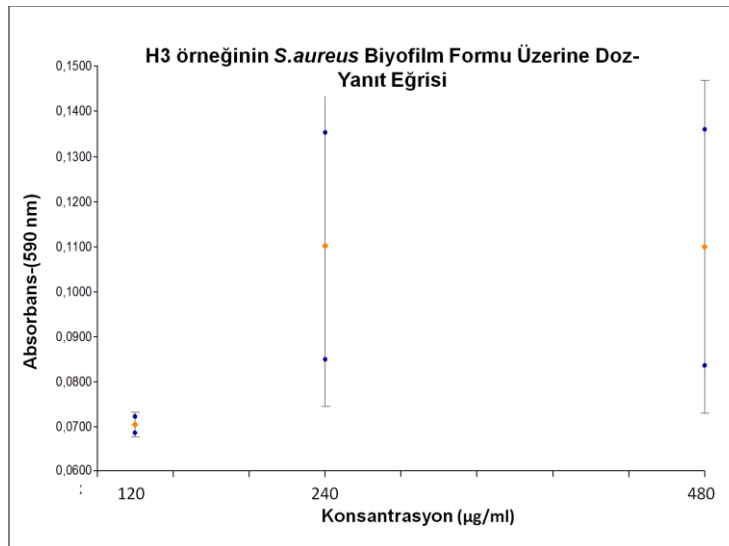
Şekil 3.95. H1 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H2 kodlu, 37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin tüm dozlarda *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ancak en etkili doz 120 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 3.96).



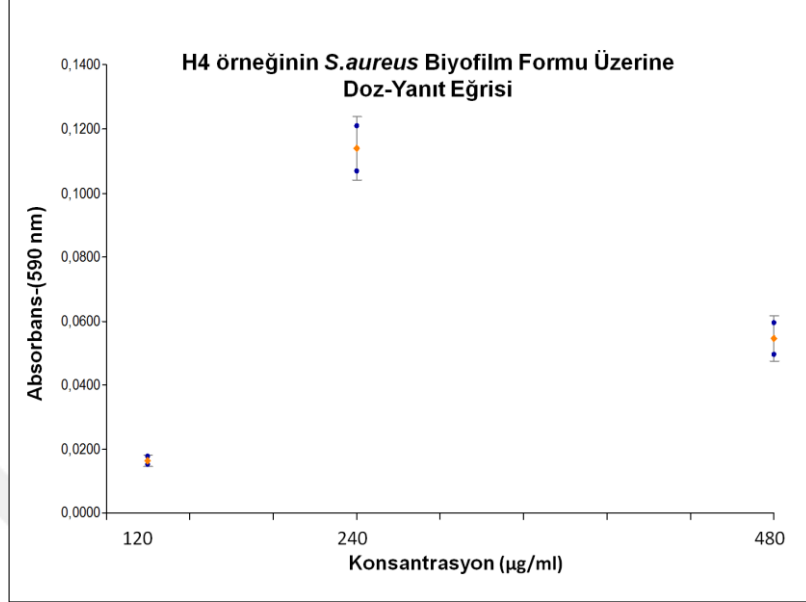
Şekil 3.96. H2 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H3 kodlu, 15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin tüm dozlarda *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ancak en etkili doz 120 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 3.97).



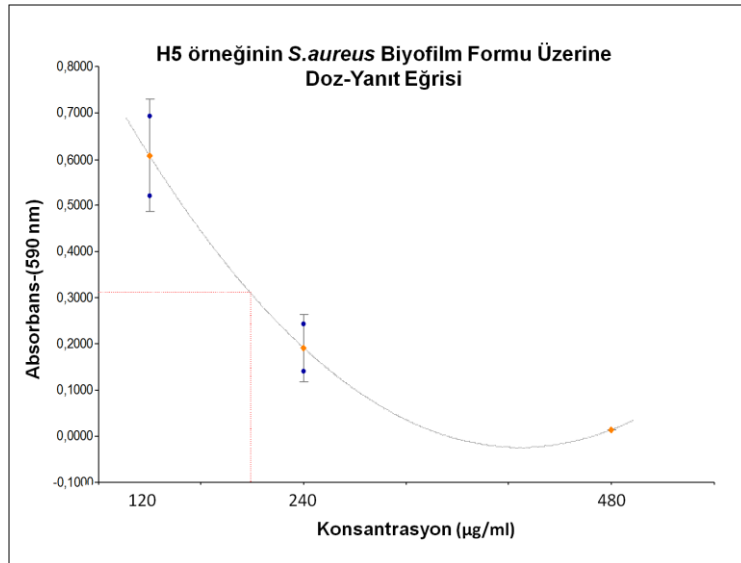
Şekil 3.97. H3 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H4 kodlu, 15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin tüm dozlarda *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ancak en etkili doz 120 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 3.98).



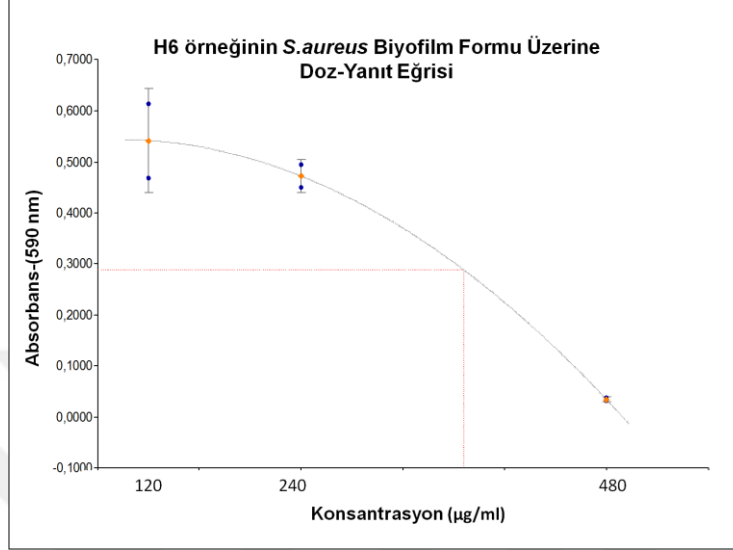
Şekil 3.98. H4 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H5 kodlu, 37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 ve 240 µg/ml dozlarda *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ancak en etkili doz 480 µg/ml olarak belirlenmiştir. 120 µg/ml dozda biyofilm oluşumu artmıştır (Şekil 3.99).



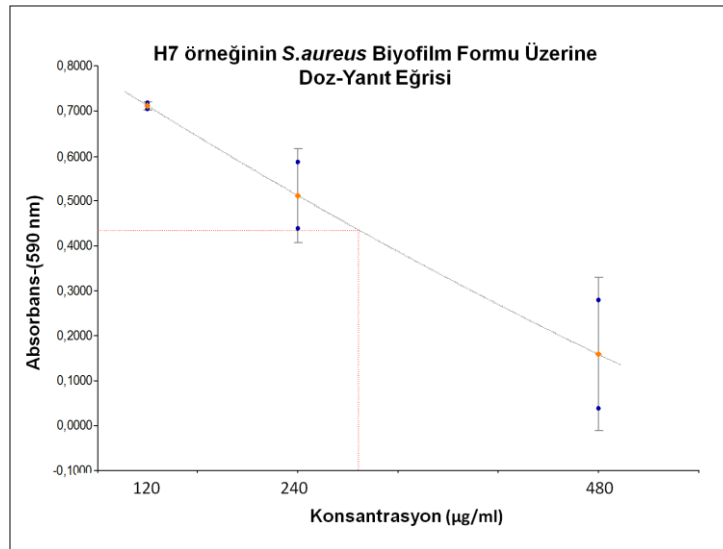
Şekil 3.99. H5 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H6 kodlu, 37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozda *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ancak 240 ve 120 µg/ml dozda biyofilm oluşumu artış göstermiştir (Şekil 3.100).



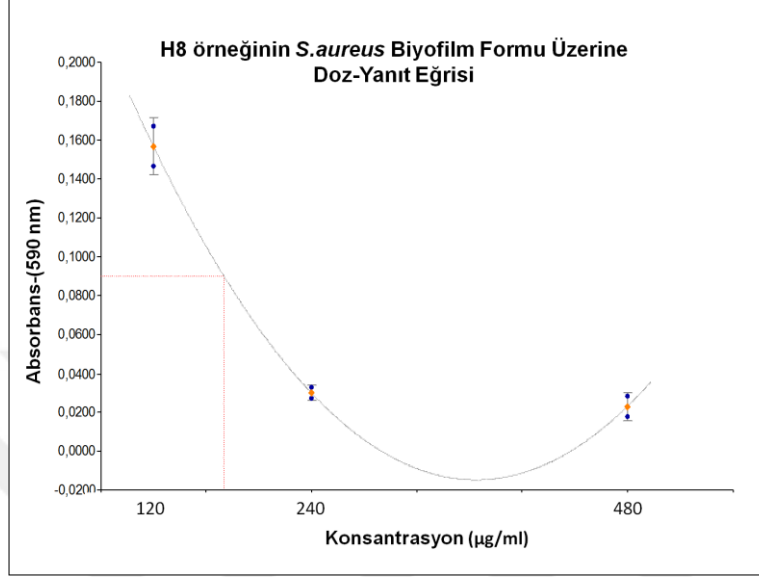
Şekil 3.100. H6 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H7 kodlu, 37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozlarda *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ancak 240 ve 120 µg/ml dozda biyofilm oluşumu artış göstermiştir (Şekil 3.101).



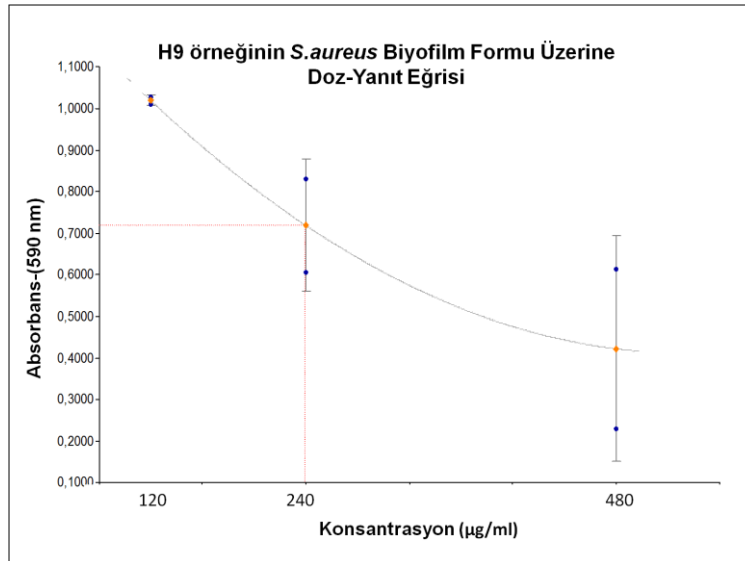
Şekil 3.101. H7 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H8 kodlu, 37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 ve 240 µg/ml dozda *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ancak 120 µg/ml dozda biyofilm oluşumu artış göstermiştir (Şekil 3.102).



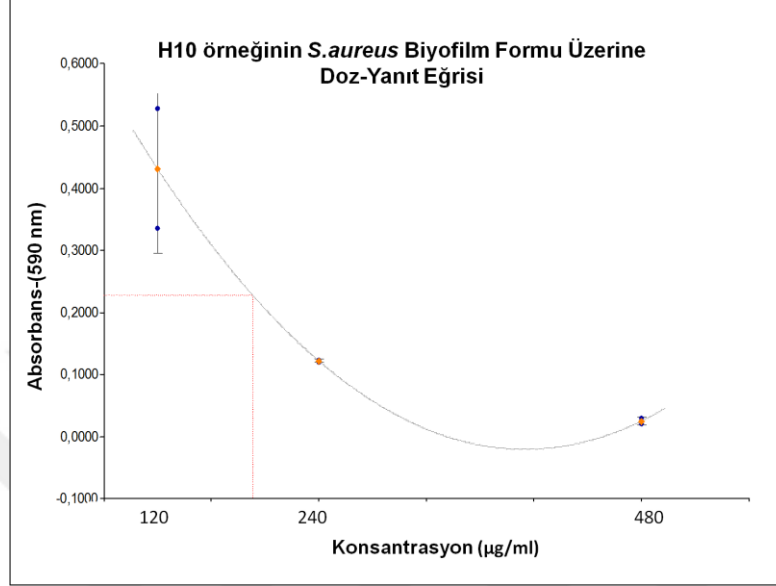
Şekil 3.102. H8 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H9 kodlu, 37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin tüm dozları *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır (Şekil 3.103).



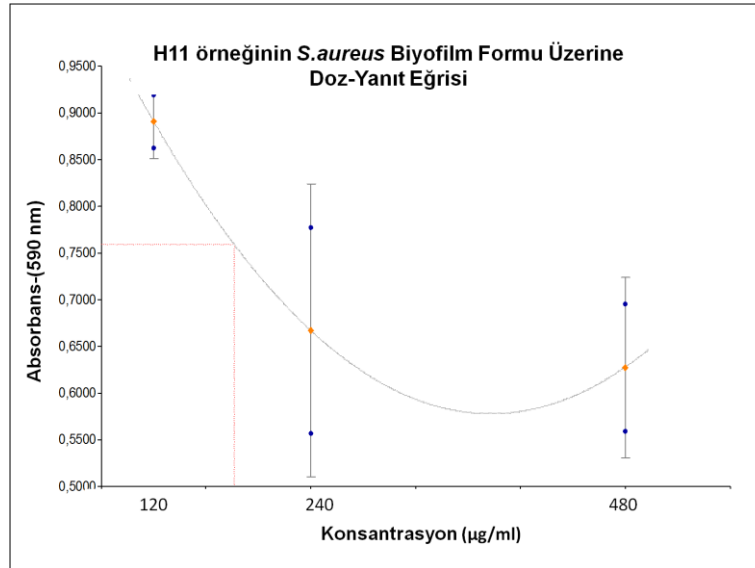
Şekil 3.103. H9 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H10 kodlu, 37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 ve 240 µg/ml dozda *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ancak 120 µg/ml dozda biyofilm oluşumu artış göstermiştir (Şekil 3.104).



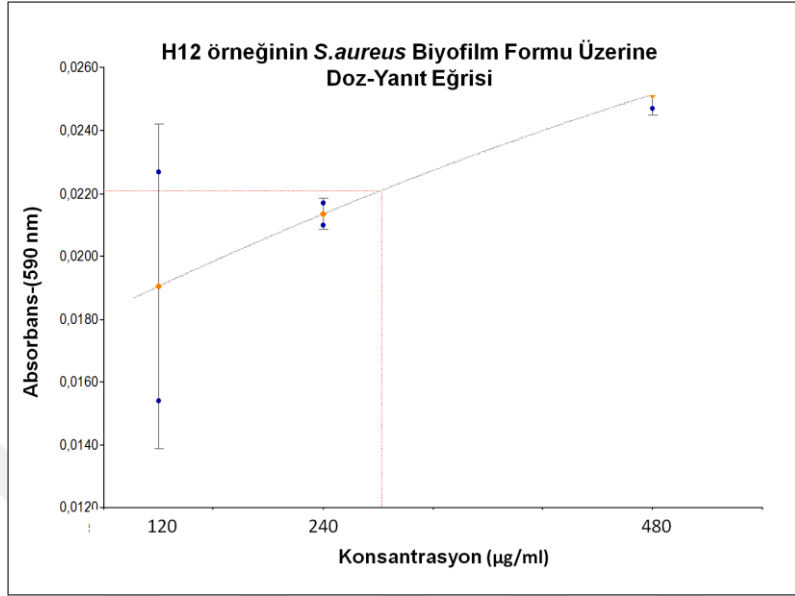
Şekil 3.104. H10 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H11 kodlu, 15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin tüm dozları *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır (Şekil 3.105).



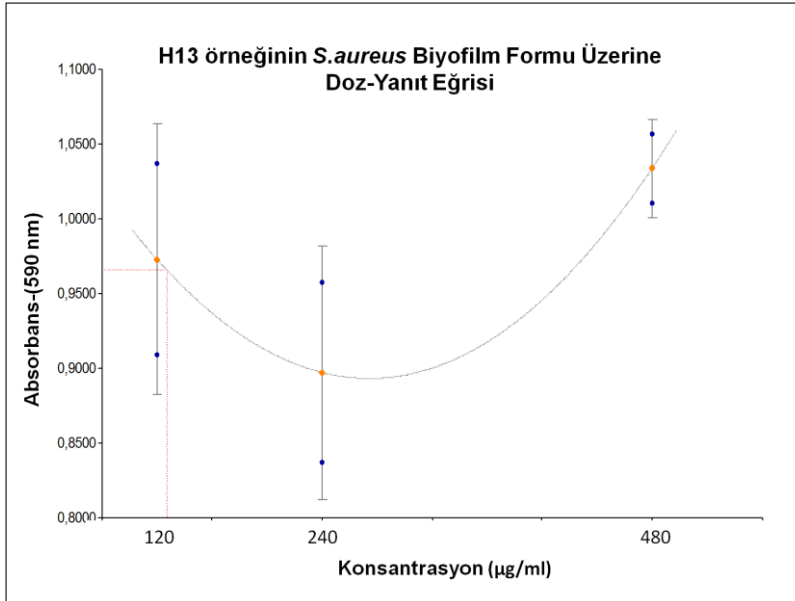
Şekil 3.105. H11 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H12 kodlu, 15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin tüm dozlarının biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.106).



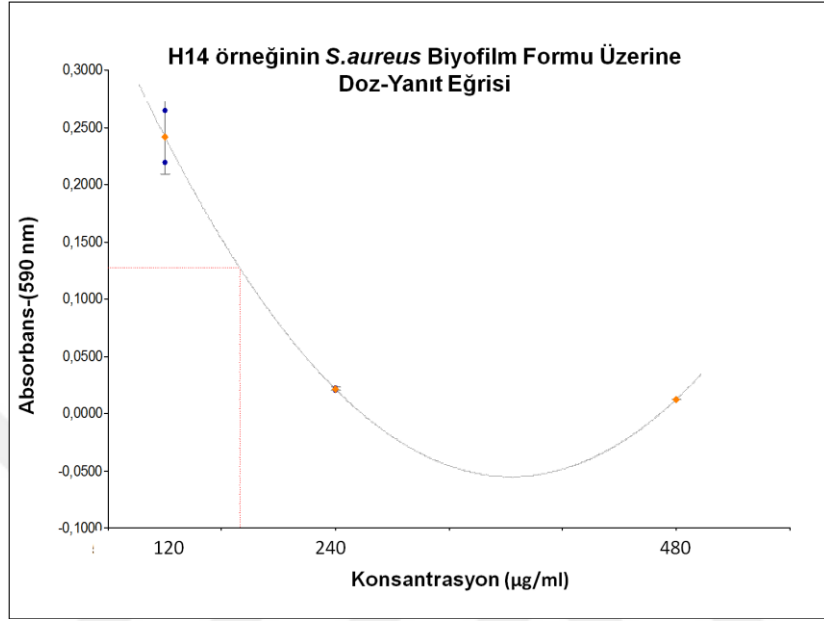
Şekil 3.106. H12 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H13 kodlu, 15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin tüm dozları *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır (Şekil 3.107).



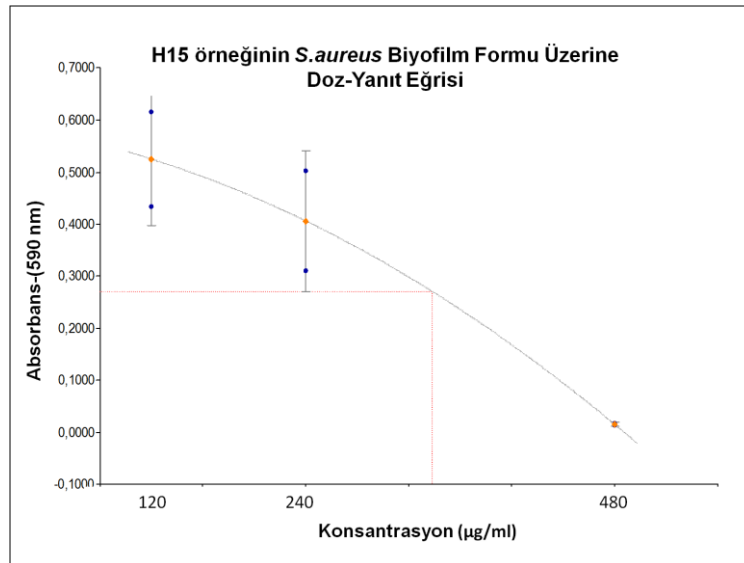
Şekil 3.107. H13 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H14 kodlu, 15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin tüm dozları *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azaltmıştır. Ancak 480 ve 240 µg/ml dozlarının daha etkili olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.108).



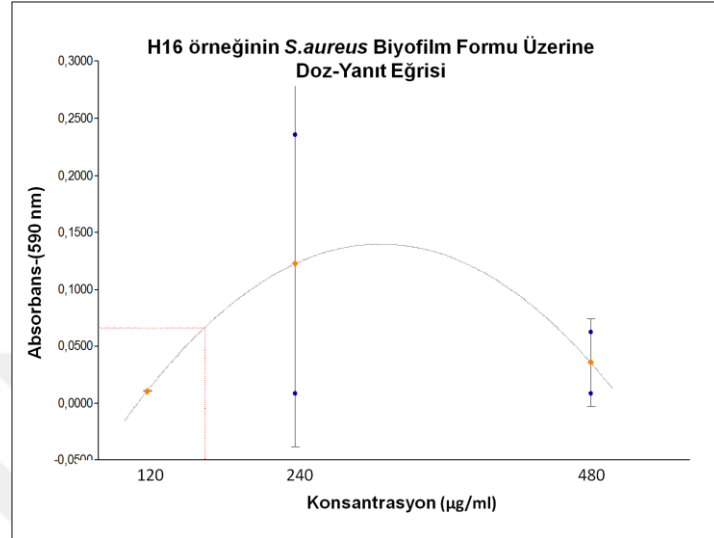
Şekil 3.108. H14 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H15 kodlu, 15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml dozu *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.109).



Şekil 3.109. H15 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

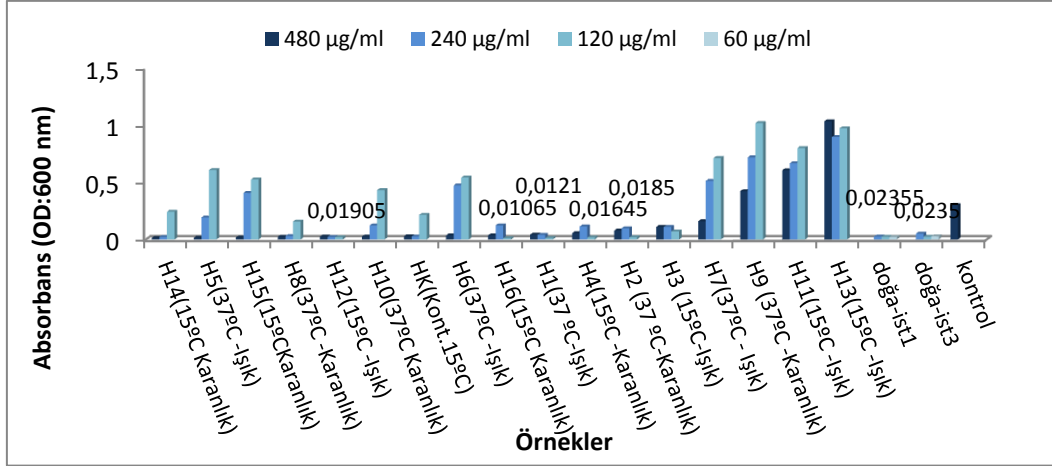
H16 kodlu, 15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin tüm dozları *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azaltmıştır. Ancak 480 ve 120 µg/ml dozlarının daha etkili olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.110).



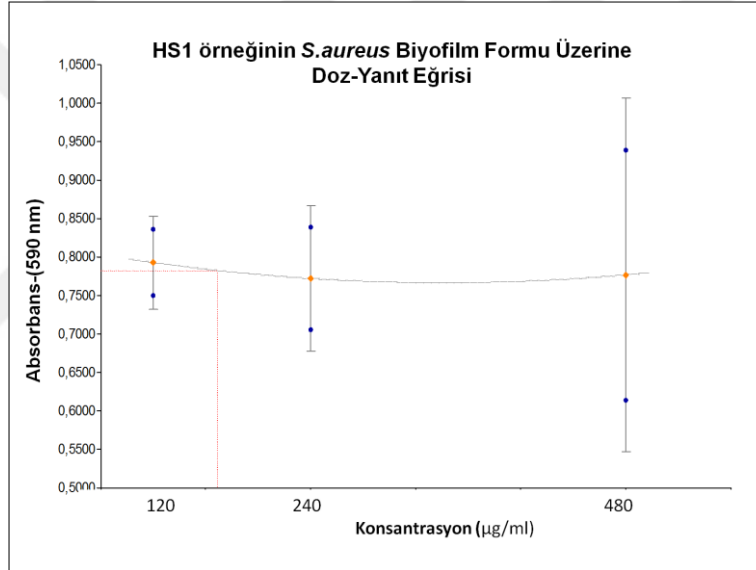
Şekil 3.110. H16 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480, 240 ve 120 µg/ml dozlarının *S. aureus* suşunun biyofilm formu üzerine etkileri incelendiğinde H13, H11, H9 kodlu örneklerin dışında kalan tüm grupların anti-biyofilm etkileri tespit edilmiştir (Şekil 3.111). 480 µg/ml dozdaki anti-biyofilm etkinliklerine göre sıralandığında H14 en etkili grup olarak sıralanmıştır. Doğadan toplanan örneklerin daha düşük dozlarda dahi etki ettiği gözlenmiştir. Ancak tüm türler incelendiğinde 120 µg/ml dozda H1, H2, H4, H12 ve H16 örnekleri doğadan toplanan örneklerden daha fazla etkinlik göstermiştir. Şekil 3.111'de 120 µg/ml dozda H1, H2, H4, H12 ve H16 antibiyofilm etkinliklerini gösteren değerler verilmiştir.

Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480 µg/ml, 240 µg/ml, 120 µg/ml dozları *S. aureus* suşu üzerine uygulanmıştır. Ölçüm sonuçları kullanılarak biyofilm inhibisyon grafikleri oluşturulmuştur. Nitrat stresine maruz bırakılan HS1 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden 480 µg/ml, 240 µg/ml, 120 µg/ml dozları bakteri suşları üzerine uygulanmıştır. Tüm dozlar *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır (Şekil 3.112).

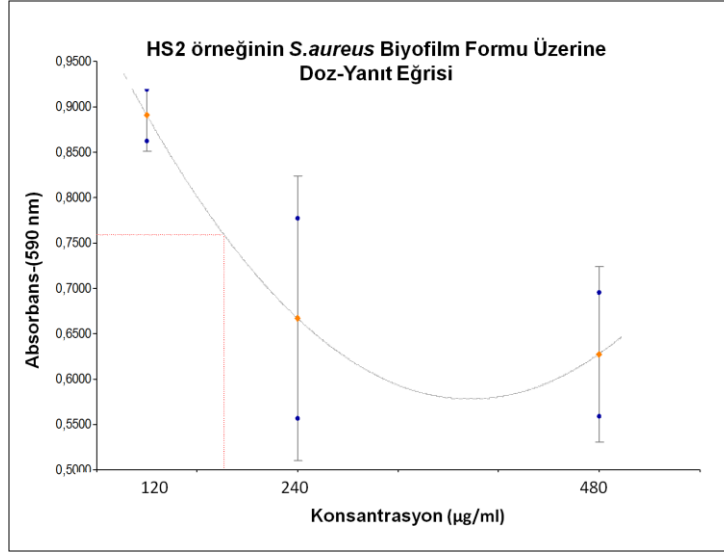


Şekil 3.111. Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan örneklerin aseton özütlerinin *S.aureus* suşunun biyofilm formu üzerine antibiyofilm etkilerinin karşılaştırması



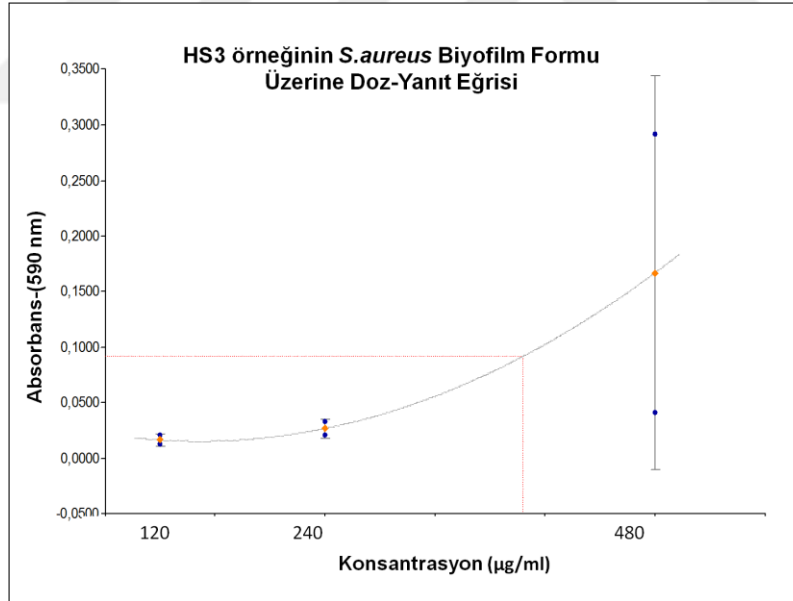
Şekil 3.112. HS1 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan HS2 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden uygulanan tüm dozlar *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır (Şekil 3.113).



Şekil 3.113. HS2 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

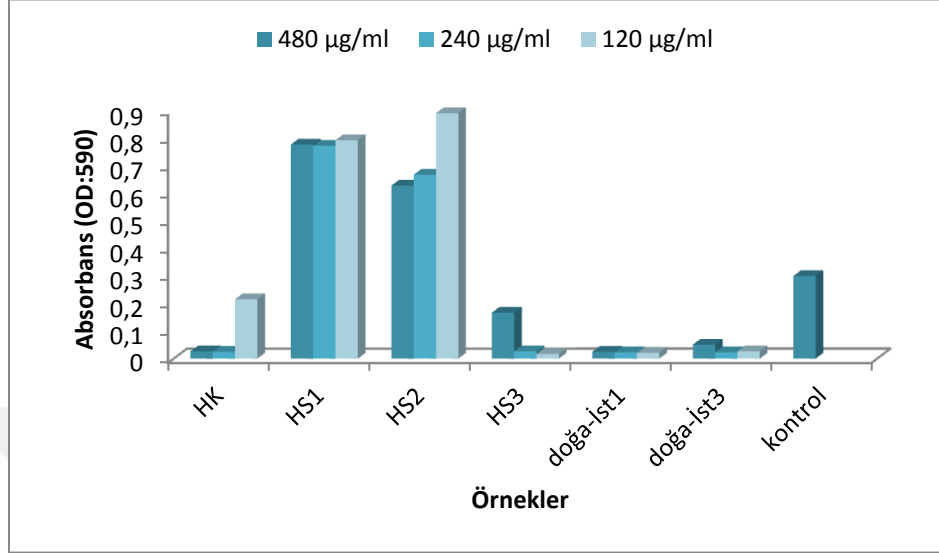
Asetat stresine maruz bırakılan HS3 kodlu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden uygulanan tüm dozları *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumunu azaltmıştır. 240 $\mu\text{g/ml}$, 120 $\mu\text{g/ml}$ dozları daha etkili olmuştur (Şekil 3.114).



Şekil 3.114. HS3 kodlu örneklerin aseton özütünün *S. aureus* suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin *S. aureus* suşunun biyofilm formu üzerine etkileri incelendiğinde HS1 ve HS2 kodlu örneklerin biyofilm oluşumunu artırdığı, HS3 kodlu örneklerin ise biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Doğal örneklerin yüksek antibiyofilm etkisi tespit

edilmiştir (Şekil 3.115). PKS gen ekspresyon oranı daha yüksek olan asetat stresinin anti-biyofilm etkinliği de daha yüksektir.

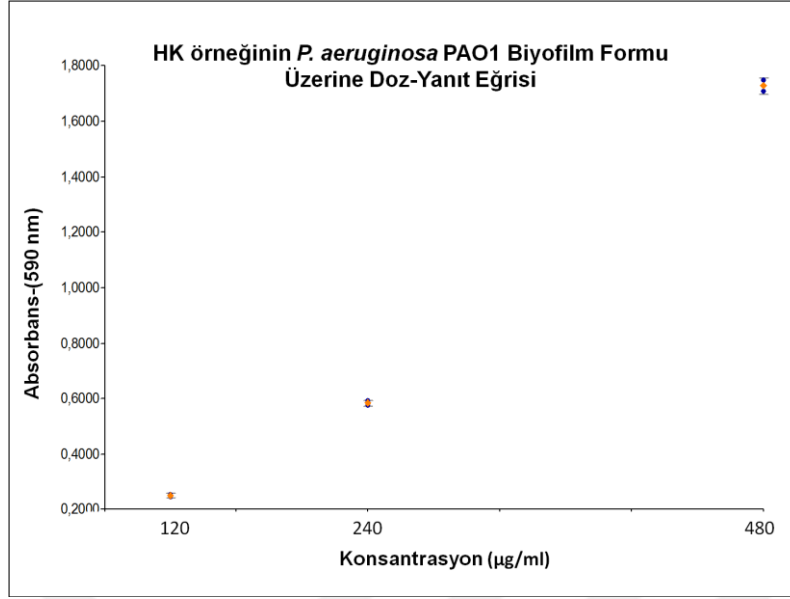


Şekil 3.115. Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan örneklerin aseton özütlerinin *S. aureus* suşunun biyofilm formu üzerine antibiyofilm etkilerinin karşılaştırması

3.1.8.4. Stres altındaki *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerindeki anti-biyofilm etkileri

Strese maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont aseton özütlerinin *P. aeruginosa* PAO1 bakteri suşunun biyofilm formu oluşumu üzerine etkisini incelemek için 480 µg/ml, 240 µg/ml, 120 µg/ml özüt dozları uygulanmıştır. Hazırlanan plakalar 24 saat inkübe edildikten sonra kontrol grupları ile aseton özütü içeren grupların bulunduğu kuyucuklardaki biyofilm oluşumu Cytation 3 (BioTek) cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları kullanılarak biyofilm inhibisyon grafikleri oluşturulmuştur. *H. tubulosa* aseton özütlerinin *P. aeruginosa* PAO1 bakteri suşunun biyofilm formu üzerindeki etkinlikleri analiz edilmiştir.

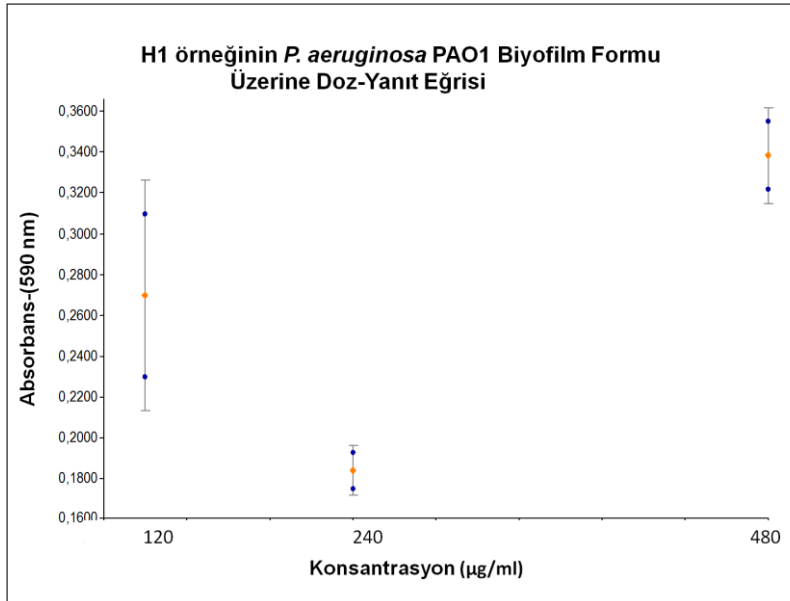
Strese maruz bırakılmayan kontrol grubu *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden 480 µg/ml, 240 µg/ml, 120 µg/ml dozları *P. aeruginosa* PAO1 bakteri suşunun üzerine uygulanmıştır. 480 µg/ml dozu biyofilm oluşumunu artırırken, 240 ve 120 µg/ml dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.116).



Şekil 3.116. HK kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

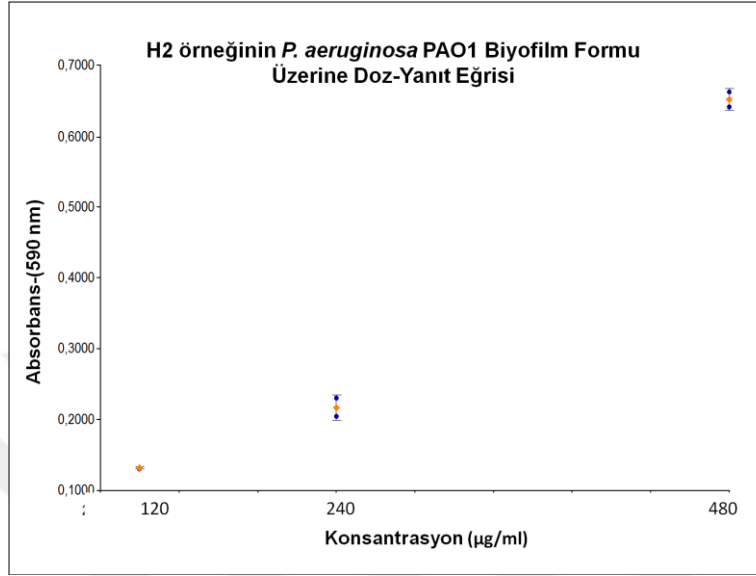
Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan örneklerin aseton özütlerinden *P.aeruginosa* PAO1 bakteri suşunun biyofilm formu üzerindeki etkileri sırasıyla verilmiştir.

H1 kodlu, 37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden tüm dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır. En yüksek etki 240 µg/ml dozunda gözlenmiştir (Şekil 3.117).



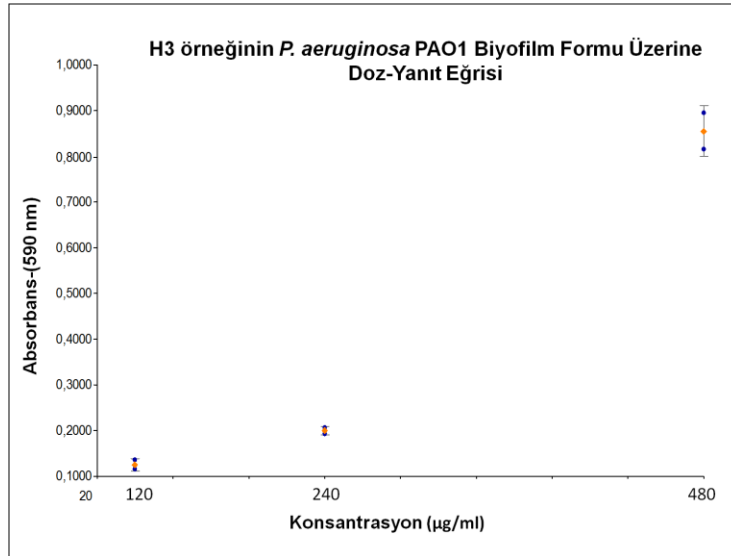
Şekil 3.117. H1 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H2 kodlu, 37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden 240 ve 120 µg/ml dozları *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu azaltmıştır. En yüksek etki 120 µg/ml dozunda gözlenmiştir (Şekil 3.118).



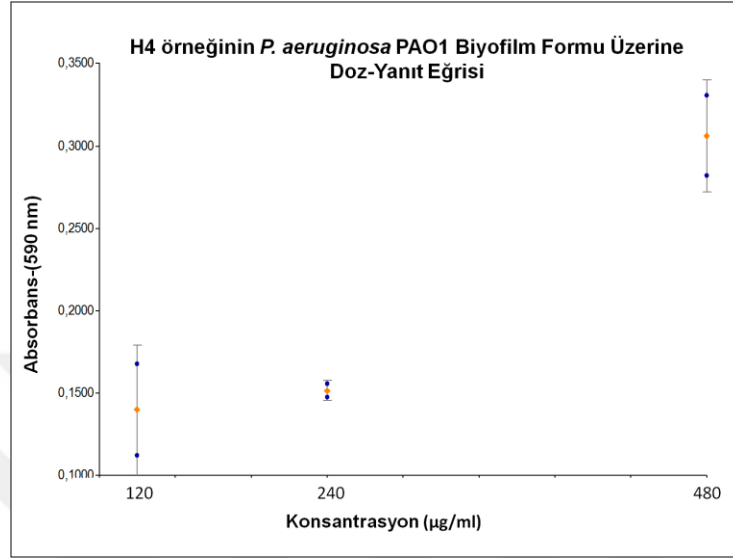
Şekil 3.118. H2 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H3 kodlu, 15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinden 240 ve 120 µg/ml dozları *P. aeruginosa* PAO1 suşu biyofilm oluşumunu azaltmıştır. En yüksek etki 120 µg/ml dozunda gözlenmiştir (Şekil 3.119).



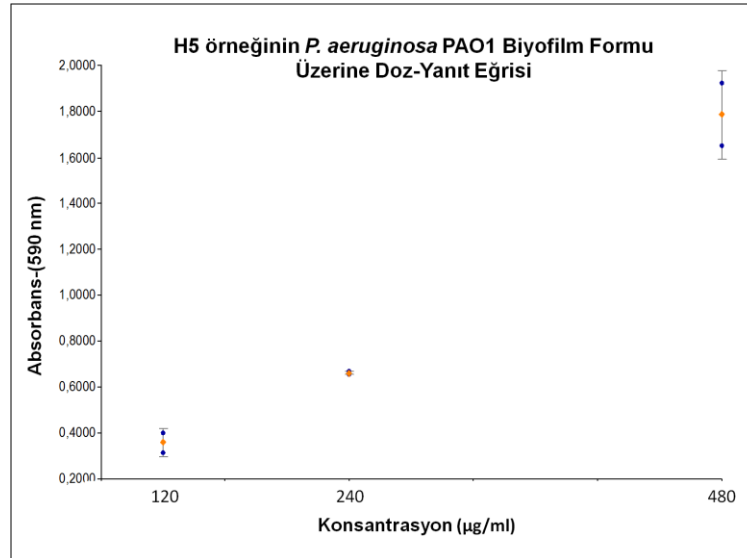
Şekil 3.119. H3 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H4 kodlu, 15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun aseton özütünün tüm dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozlarının daha etkili olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.120).



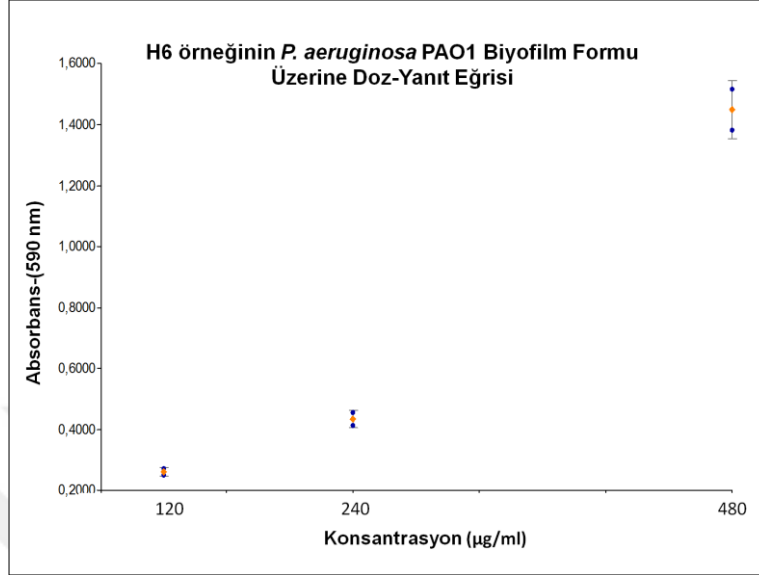
Şekil 3.120. H4 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H5 kodlu, 37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 ve 240 µg/ml dozları *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 120 µg/ml dozunun biyofilmi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.121).



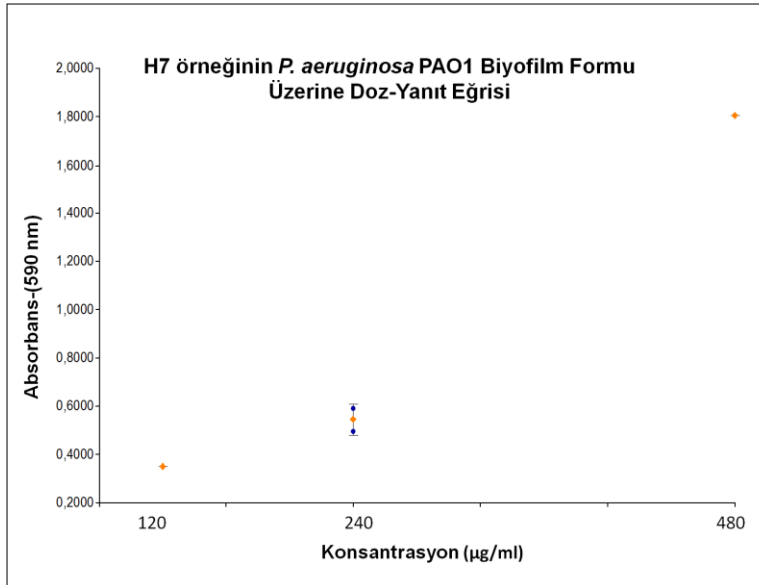
Şekil 3.121. H5 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H6 kodlu, 37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 120 µg/ml dozunun biyofilmi azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.122).



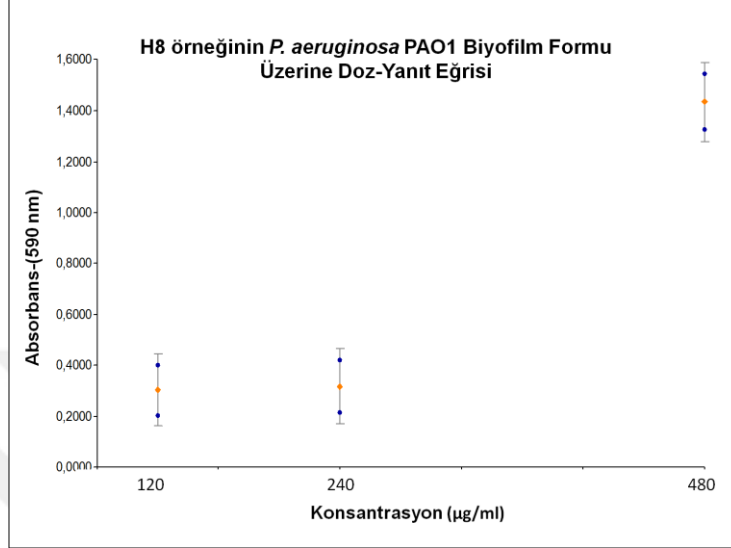
Şekil 3.122. H6 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H7 kodlu, 37 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozlarının biyofilmi azalttığı ve 120 µg/ml dozunun daha etkili olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.123).



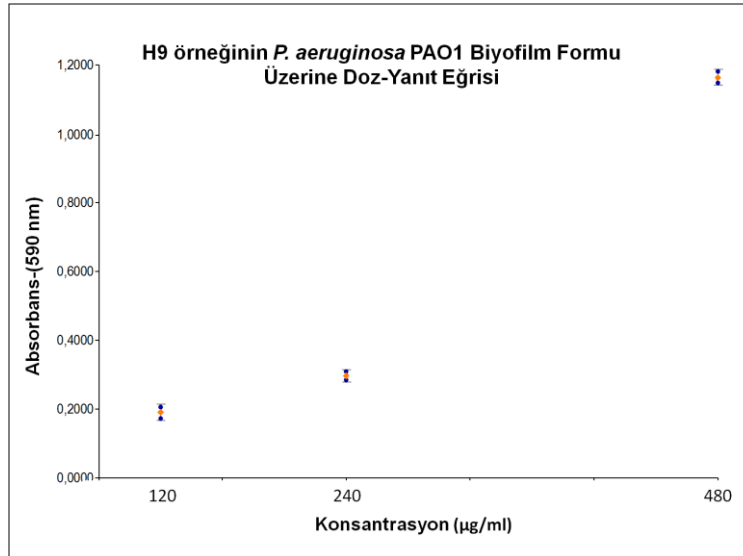
Şekil 3.123. H7 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H8 kodlu, 37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.124).



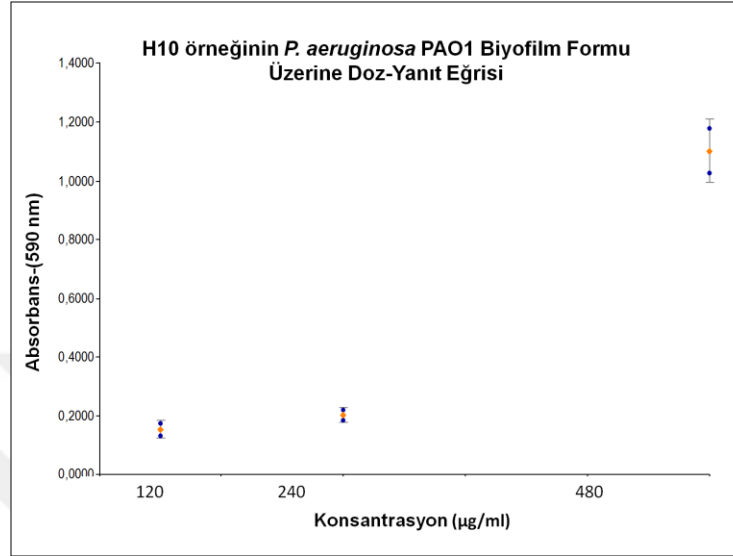
Şekil 3.124. H8 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H9 kodlu, 37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozları *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.125).



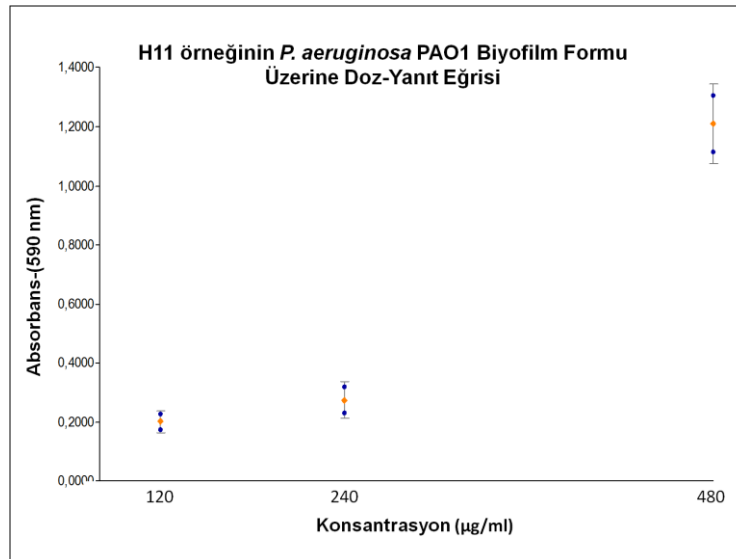
Şekil 3.125. H9 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H10 kodlu, 37 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.126).



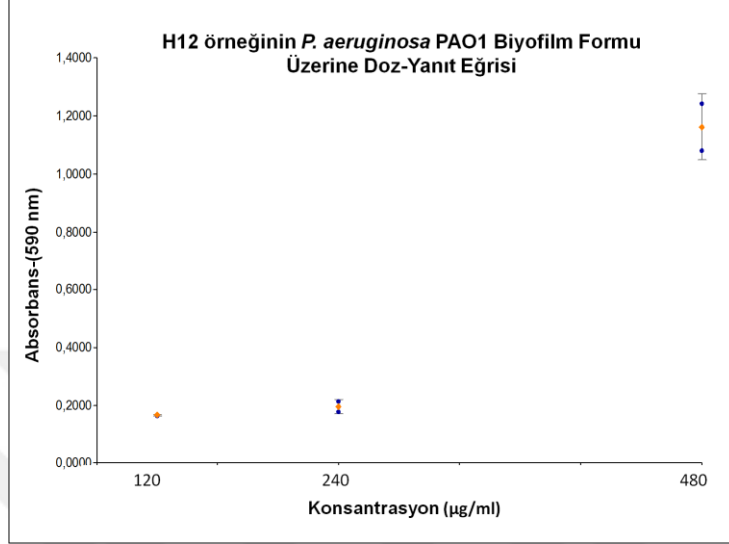
Şekil 3.126. H10 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H11 kodlu, 15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.127).



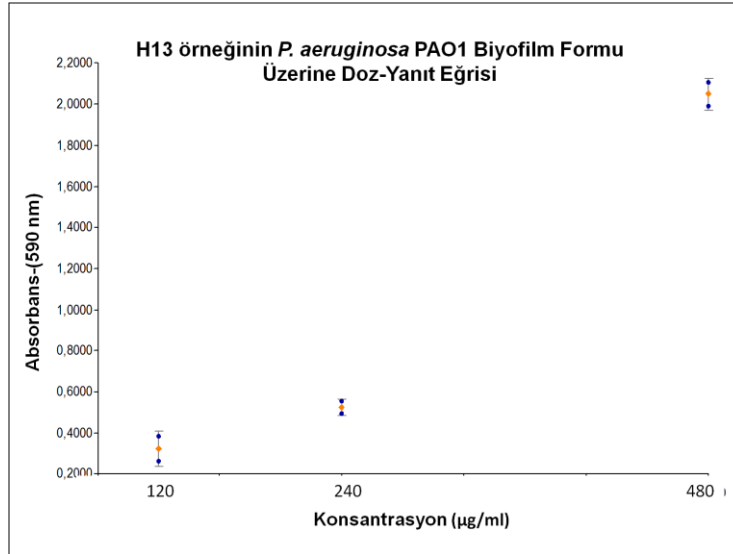
Şekil 3.127. H11 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H12 kodlu, 15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.128).



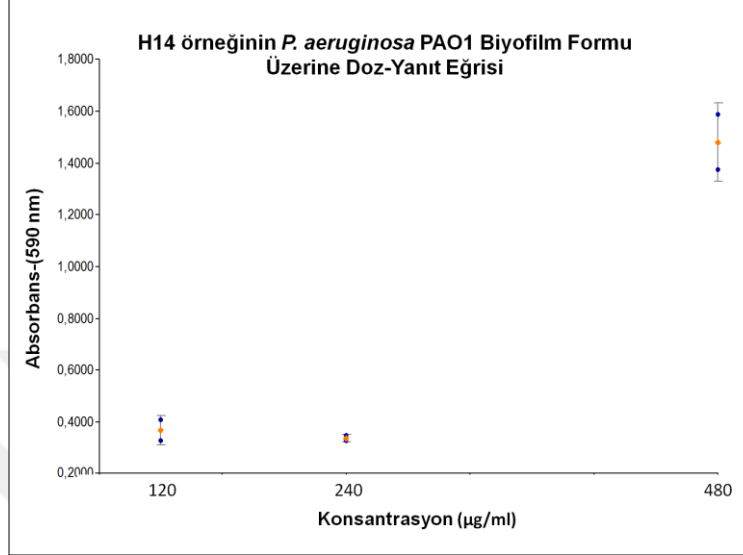
Şekil 3.128. H12 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H13 kodlu, 15 °C ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.129).



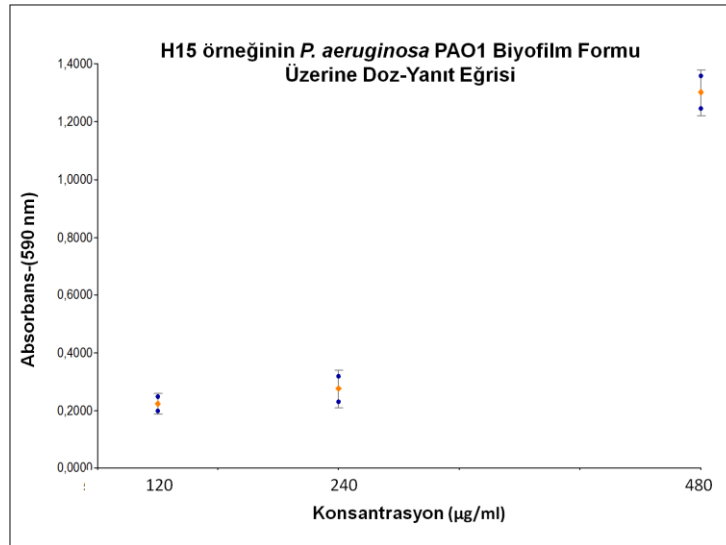
Şekil 3.129. H13 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H14 kodlu, 15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.130).



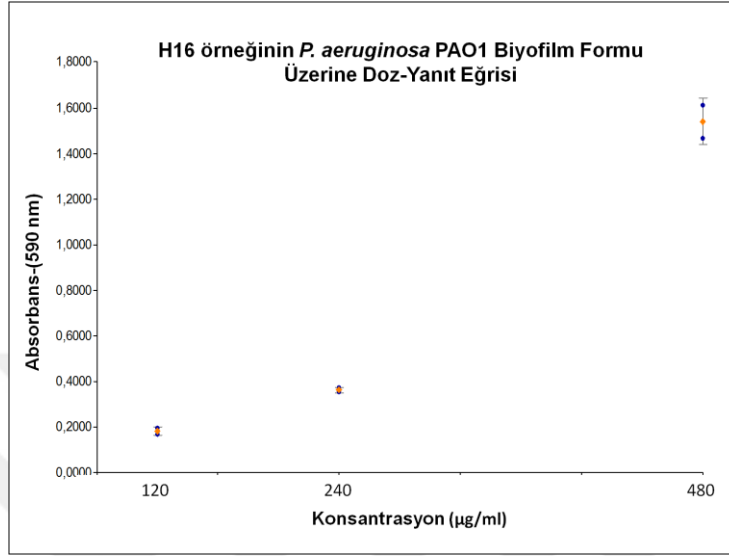
Şekil 3.130. H14 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H15 kodlu, 15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.131).



Şekil 3.131. H15 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

H16 kodlu, 15 °C ve karanlık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.132).

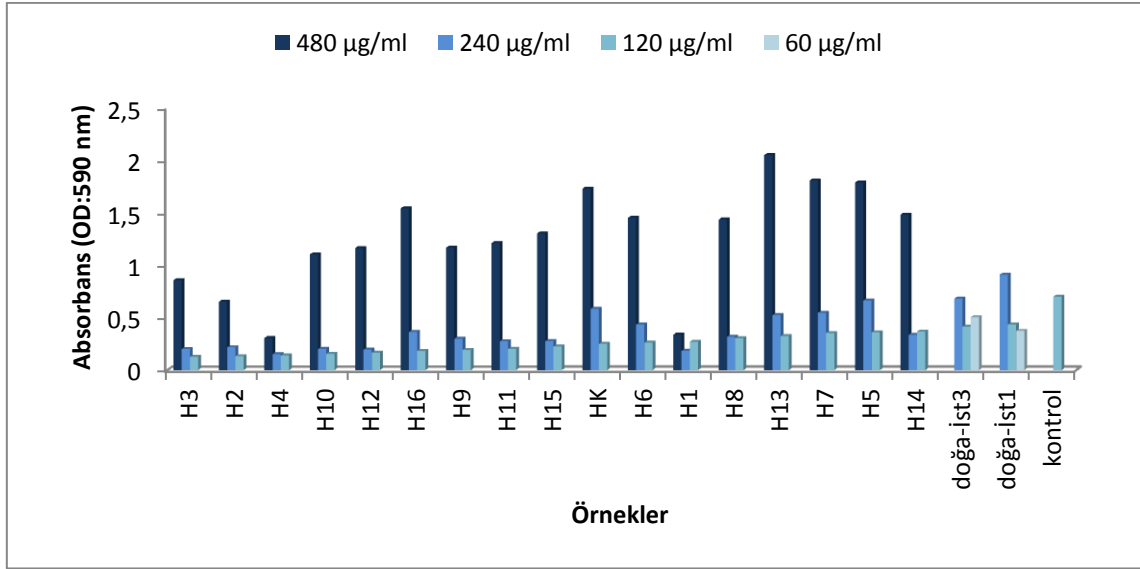


Şekil 3.132. H16 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

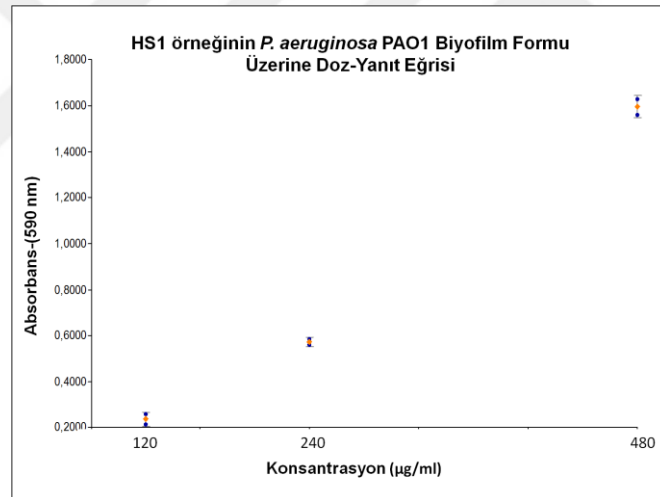
Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin 480, 240 ve 120 µg/ml dozlarının *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm formu üzerine etkileri incelendiğinde tüm grupların anti-biyofilm etkileri tespit edilmiştir. 120 µg/ml dozdaki anti-biyofilm etkinliklerine göre sıralandığında H3 en etkili tür olarak sıralanmıştır. Kültür örnekleri doğadan toplanan örneklere göre daha etkili olmuştur (Şekil 3.133). 480 µg/ml dozda ise genellikle biyofilm oranı artmıştır. Bakterilerin yüksek dozda strese girerek daha fazla biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir.

Nitrat ve asetat içeren besiyerinde nitrat-asetat stresine maruz bırakılan örneklerin aseton özütlerinden *P. aeruginosa* PAO1 bakteri suşunun biyofilm formu üzerindeki etkileri sırasıyla verilmiştir.

HS1 kodlu, nitrat stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.134).

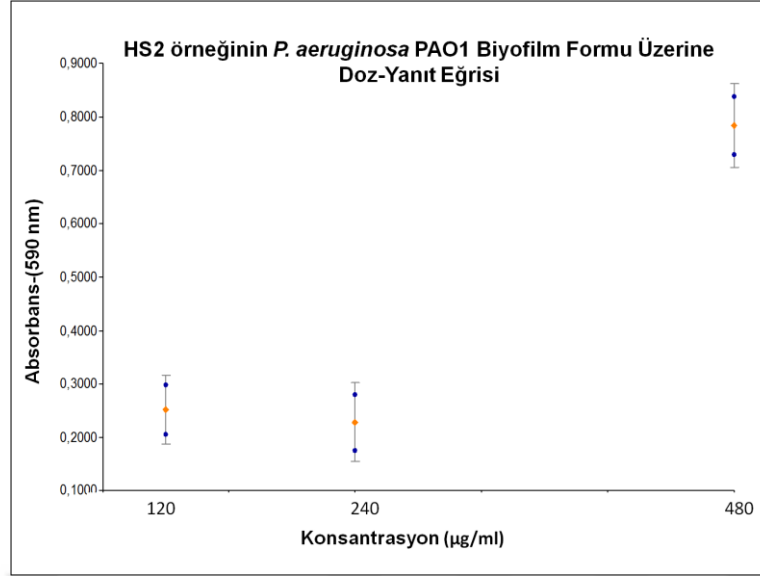


Şekil 3.133. Sıcaklık ve ışık stresine maruz bırakılan örneklerin aseton özütlerinin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm formu üzerine antibiyofilm etkilerinin karşılaştırması



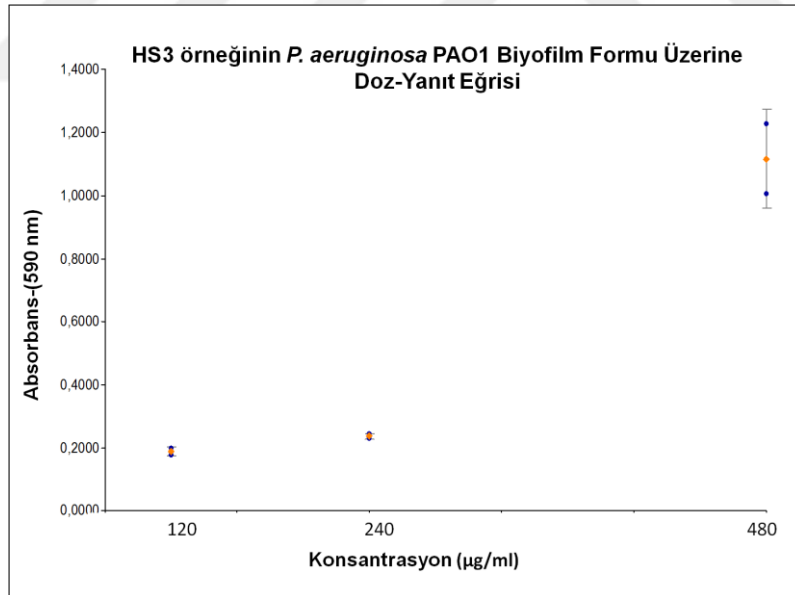
Şekil 3.134. HS1 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

HS2 kodlu, nitrat ve asetat stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozları biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.135).



Şekil 3.135. HS2 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

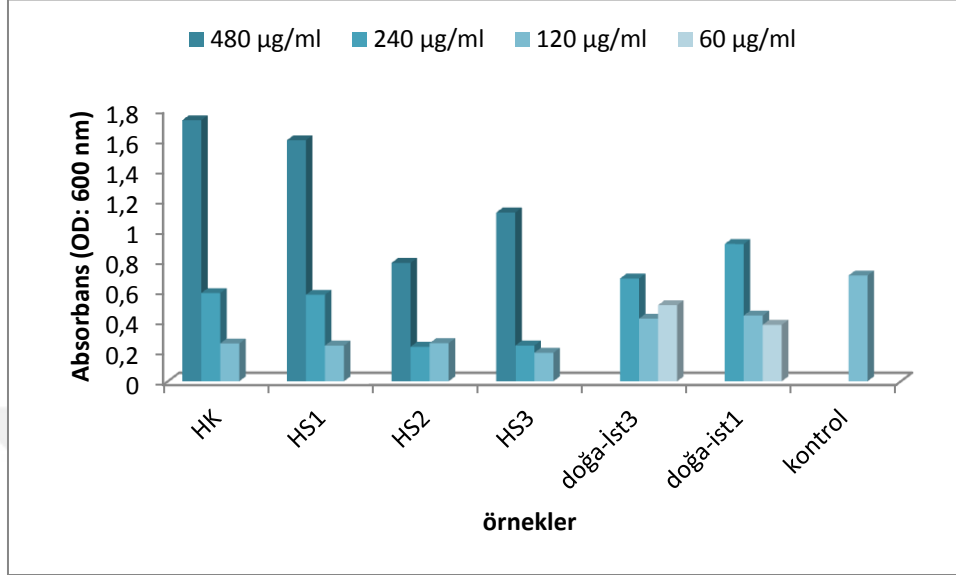
HS3 kodlu, asetat stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün 480 µg/ml dozu *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumunu artırmıştır. 240 ve 120 µg/ml dozunun biyofilm oluşumunu azaltmıştır (Şekil 3.136).



Şekil 3.136. HS3 kodlu örneklerin aseton özütünün *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine anti-biyofilm doz-yanıt grafiği

Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütlerinin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm formu üzerine etkileri incelendiğinde 480 µg/ml dozdaki özütün biyofilm oluşumunu artırdığı gözlenmiştir. HS1, HS2 ve HS3

kodlu örneklerin aseton özütlerinin 240 ve 120 µg/ml dozlarının biyofilm oluşumunu azalttığı doğadan toplanan örneklerden daha etkili oldukları gözlenmiştir (Şekil 3.137).



Şekil 3.137. Nitrat-asetat stresine maruz bırakılan örneklerin aseton özütlerinin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm formu üzerine antibiyofilm etkilerinin karşılaştırması

Doğadan toplanan liken örnekleri ile mikobiyont örnekleri arasında bakterilerin büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine aktiviteleri yönünden farklılıklar gözlenmiştir. *S. aureus* suşunun büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine doğal örnekler ve bazı mikobiyont stres örnekleri eşdeğer sonuçlar vermiştir. Mikobiyont kültür örneklerinden H13, H11, H9 kodlu örnekler ise artırıcı etki göstermiştir.

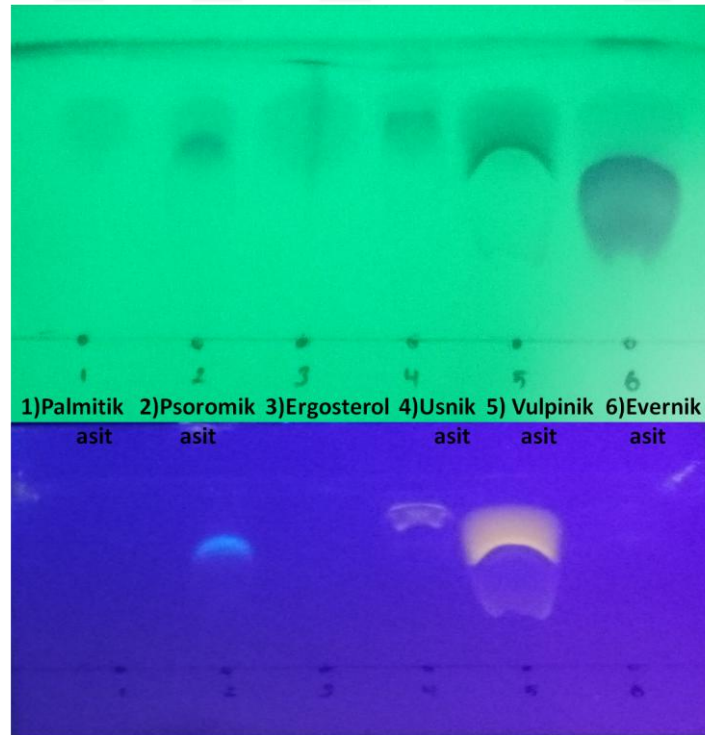
Mikobiyont kültür örneklerinden kontrol grubu ve strese maruz bırakılan örnekler *P. aeruginosa* PAO1 suşunun hem büyüme eğrisi üzerine hem de biyofilm oluşumu üzerine doğadan toplanan örneklerden çok daha etkili sonuçlar vermişlerdir. Bu farklılığın nedeni ile ilgili ancak etken madde tespiti ile yorum yapılabilecektir. Ancak etken maddelerin bir arada etki edebileceği de göz ardı edilmemelidir.

3.1.9. Stres koşullarında kültürde çoğalan *Hypogymnia tubulosa* mikobiyont örneklerinin aseton özütünün içeriğinin belirlenmesi

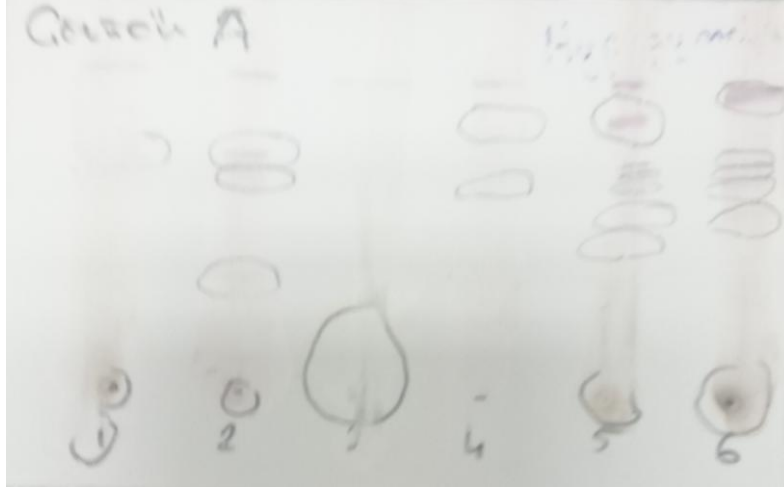
3.1.9. 1. İnce tabaka kromatografisi (Thin layer chromatography-TLC)

H. tubulosa mikobiyont örneklerinden elde edilen aseton özütünün içeriğini belirlemek amacıyla örnekler ince tabaka kromatografisi ile incelenmiştir. Aseton içinde çözünmüş özütler silika plakalara yüklenerek Toluene/Diokzan/Asetik asit (180:45:5) hareketli fazı kullanılarak yürütülmüştür. Yürütülen maddeler 366 nm ve 254 nm UV ile inceleme ve H₂SO₄ ile yakma işlemi yapılarak maddeler tespit edilmiştir.

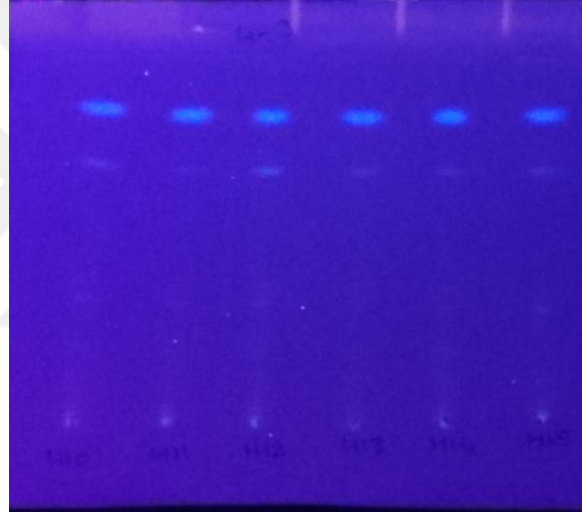
TLC sonucu UV'de görüntülenen plakalarda üç farklı madde, H₂SO₄ ile yakma işlemi sonucunda UV'de tespit edilenden farklı bir madde tespit edilmiştir (Şekil 3.139-Şekil 3.141). Maddeler referans maddeler ile karşılaştırılarak R_f değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.138). UV'de tespit edilen maddelerin R_f değerleri sarı rekli madde 0,87; mavi renkli madde 0,8; yeşil renkli madde 0,6; turuncu renkli madde 0,3 olarak belirlenmiştir. Doğadan toplanan örneklerle mikobiyont örnekleri arasında farklılık tespit edilmiştir. Şekil 3.141 'de mikobiyont örneğinde tespit edilen maddeler doğal örnekte tespit edilememiştir.



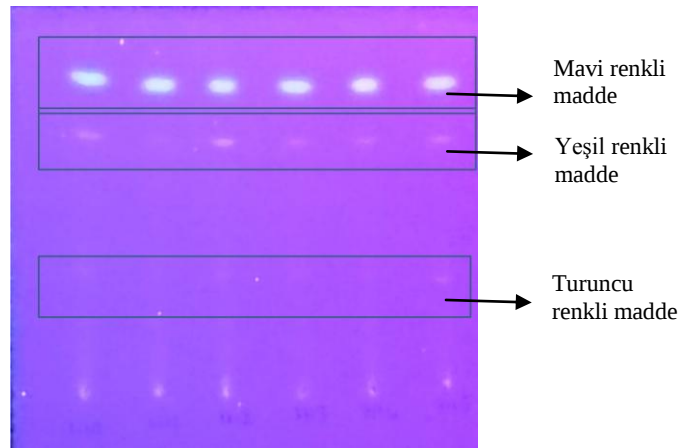
Şekil 3.138. Referans maddelerin TLC görüntüsü



Şekil 3.139. H_2SO_4 ile yakma işlemi yapılarak tespit edilen maddelerin TLC görüntüsü



Şekil 3.140. UV ile tespit edilen maddelerin TLC görüntüsü



Şekil 3.141. UV ile maddelerin tespit edilmesi

3.2. Tartışma

Likenlerin hastalıkların iyileştirilmesinde yararlanılan doğal kaynaklar arasında olduğu bilinmektedir. Metabolizmalarının doğal bir ürünü olarak meydana getirdikleri sekonder metabolitler likenlerin tıptan, eczacılığa; boya endüstrisinden, besin endüstrisine kadar birçok alanda kullanımlarına imkân sağlamaktadır [3,5]. Liken yaşamında sekonder metabolitler, çevresel koşullara uyum sağlama, savunma, korunma, hayatta kalma, neslini sürdürme ve ekosistemle ilişkilerini düzenleme konularında birçok göreve sahiptirler. Yavaş büyüme gösteren ve çok ekstrem koşullarda dahi yaşamını sürdürebilen likenlerin farklı çevresel koşullara uyum sağlaması ürettikleri sekonder metabolitler ile mümkün olmaktadır. Çok eski zamanlardan beri likenlerin çeşitli amaçlarla kullanıldığı bilindiği halde üretmiş oldukları sekonder metabolitlerin sentez mekanizması tam olarak belirlenememiştir. Shwab ve Keller (2008)'e göre, mantar ortağının sekonder metabolit metabolizması, karbon ve azot gibi besin kaynakları, sıcaklık, ışık, pH gibi çevresel faktörlerle birlikte kromozomal organizasyona bağlı olan biyosentez genlerinin (PKS - Poliketid Sentez Genleri) kontrolü altındadır [166]. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki poliketidlerin biyosentezinde poliketid sentaz enzimleri görev almaktadır ve bu multienzim kompleksleri asetil-CoA ve malonil-CoA türevlerinin farklı şekillerde aktive edilmesini sağlamaktadır [1,41,121,137]. Deduke ve ark. (2012) birçok çevresel faktörün, liken sekonder metabolitlerinin üretiminde görevli PKS gen ekspresyonu üzerinde etkili olduğunu ifade etmiştir [141]. PKS gen ekspresyonunun ortamdaki besin maddeleri ve pH, sıcaklık, ışık gibi faktörlere tepki verdiği düşünülmektedir [83,130,131,135,141]. Sekonder metabolit üretiminde aynı zamanda karbon ve azot kaynakları gibi diğer çevresel faktörlere de tepki verildiği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [130,131,135]. Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında, biyolojik aktivite gösteren liken türlerinden yeni ilaç eldesi için potansiyele sahip olduğu düşünülen liken sekonder metabolitlerinin ticari kullanıma uygun şekilde çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu maddelerin sanayiye aktarılmasına katkıda bulunmak için liken örneklerine stres uygulama yoluyla metabolit üretiminin artırılmasına çalışılmıştır. Likenlerden endüstriyel anlamda kullanmak için uygun miktarı elde etmek oldukça zor olmaktadır. Ayrıca doğada az görülen bazı liken türlerini korumak ve yayılışı fazla olan türleri de ekolojik dengeyi bozmadan bilinçli tüketmek gerekmektedir. Bu nedenle Türkiye'ye özgü liken örneklerinin laboratuvar

ortamında çoğaltılması ve sekonder metabolit üretimi için en uygun koşulların belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda, potansiyel likenlerden Türkiye'den toplanmış *H. tubulosa* türünün labotatuvar şartlarında çoğaltılması ve likenlerde sekonder metabolitlerin sentezlenmesinde etkili olan poliketid sentez (PKS) genlerinin uygun primerler ile stres altında ekspresyon seviyesinin değişiminin ve biyolojik aktiviteye sahip sekonder metabolitlerin üretimine etkisinin belirlenmesi çalışmamızın araştırma konusunu oluşturmaktadır.

Çalışmada öncelikle Bursa Alaçam/Uludağ lokalitesinden toplanan *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. türü biyolojik aktivite testine tabii tutulmuştur. *H. tubulosa* örneklerinden elde edilen aseton özütü *P. aeruginosa* PAO1 CECT 4122 ve *S. aureus* ATCC 25923 bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine test edilmiştir. *H. tubulosa* aseton özütünün bakteri suşlarının büyümesini ve biyofilm oluşumunu inhibe edici etkileri Cytation 3 cihazında spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine aktiviteye sahip olduğu tespit edilen *H. tubulosa* mikobiyont örnekleri kültüre alınmıştır. Türkiye'de ilk kez liken örnekleri bu çalışma ile kültüre alınmıştır.

Türkiye'de kültüre alma yöntemi likenlerde ilk kez uygulanmış ve ilk kez liken örnekleri kültür koşullarında çoğaltılmıştır. Bu yöntem liken örneklerinin ve metabolitlerinin doğal yollarla daha ucuz ve daha fazla elde edilebilmesini mümkün kılmaktadır. Yöntemin Türkiye'de uygulanması ve Türk araştırmacılara tanıtılması amacıyla "Liken Kültürü Yöntem ve Uygulamaları Çalıştayı" düzenlenmiştir. Bu çalıştay kapsamında Güney Kore ve Japonya'dan alanında uzman araştırmacılar eşliğinde hem likenlerin kültüre alınma yöntemleri hem de likenlerde uygulanabilecek moleküler yöntemler uygulamalı olarak gösterilmiştir.

Bursa Alaçam/Uludağ lokalitesinden toplanan *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. türü kültüre alındığında başlangıçta yaklaşık %32 oranında kontaminasyon gözlenmiştir. Kültür ile ilgili çalışmalarda %70-80 oranında kontaminasyondan bahsedilmektedir. *H.tubulosa* mikobiyontunun kültüre alınmasında kontaminasyon oranı ortalama %12'ye kadar düşmüştür. Bu değer literatüre göre oldukça başarılı bir orandır [108,109].

Kültür ortamında *H. tubulosa* mikobiyontunun doğru çoğaltıldığını tespit etmek amacıyla spesifik primerlerle ITS bölgesi çoğaltılmış ve dizileme gerçekleştirilmiştir. *H. tubulosa* mikobiyont örneğinin tür tayini sırasında elde edilen ITS bölgesi dizileri ile filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. *Hypogymnia* cinsine ait veriler GenBank'tan indirilerek nj algoritması ile Mega programında dendrogramlar çizilmiştir. Dendrogramlara göre Bursa lokalitesinden toplanan *H. tubulosa* 'nın kültüre alınması ile elde edilen mikobiyont örnekleri farklı ülkelerden toplanan *H. tubulosa* örnekleri ile gruplaşma göstermiştir. Antalya'dan toplanan *H. tubulosa* örneği ise gruptan ayrılarak genetik olarak uzaklaşmıştır. Miadlikowska ve ark. (2011) *Hypogymnia* cinsine ait filogenetik benzerliği ortaya çıkarmak için Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz geni (*GPD1*) ve ITS bölgesini kullanarak maksimum olasılık (maximum likelihood) metodu ile filogenetik dendrogramlar oluşturmuştur [167]. Miadlikowska ve ark. (2011) *H. tubulosa* türünün *H. fujisanensis* türü ile daha yakın olduğunu tespit etmiştir. Çalışmamızda oluşturulan dendrogramda da benzer bir sonuç bulunmuştur. Miadlikowska ve ark. (2011) Asya, Avustralya, Kuzey Amerikadan toplanan tüm türlerin bir arada toplanmasını endemik özellik göstermelerine bağlamıştır. *H. tubulosa* türünün ise bölgesel bir ayrım göstermediğini belirterek *H. tubulosa*'nın soral ile üremesi nedeniyle uzak mesafelere dağılımının daha yaygın olmasıyla açıklamıştır. Çalışmamızda oluşturulan dendrogramda Antalya'dan toplanan *H. tubulosa* örneğinin gruptan ayrılması da genetik değişime maruz kalması ile açıklanabilmektedir.

Stocker- Wörgötter, (2008) kararlı kültür koşullarının mikobiyonların büyüme oranlarını artırabileceğini ancak liken-spesifik sekonder metabolitlerinin üretimi üzerinde olumlu bir etkisi olmadığını ifade etmiştir. Dikkate değer çevresel değişikliklerin gündüz gece döngüsü, soğuk ve ılık sıcaklık uygulamaları, yüksek ışık şiddetine maruz kalma ve besiyerinin nem içeriğinin kontrolü gibi fizyolojik streslerin sekonder metabolitin üretimini etkilediğini vurgulamıştır [114]. Çalışmamızda da mikobiyont kültür örnekleri öncelikle malt-yeast agar içeren besiyerinde büyütülmüştür. Kültürde büyüme süresi belirlenirken Culberson ve Armelo (1992) *Cladonia grayi* türünü kültür ortamında çoğalttıkları çalışma göz önünde bulundurulmuştur [168]. Culberson ve Armelo (1992) farklı katılıktaki besi ortamlarında *Cladonia grayi*'nin büyüme oranını ve ürettiği sekonder metabolitleri incelemişlerdir [168]. Yaptıkları testler sonucunda büyümenin bir başlangıç gecikmesinden sonra ivme kazandığını ve

daha sonra yavaşladığını belirtmişlerdir. Büyümenin hızlandığı dönemin 8-16 gün arası olduğunu daha sonrasında büyümenin yavaşladığını ifade etmişlerdir. Çalışmamızda 15 ve 30 gün süreyle örnekler büyütülmüş ve örneklerin büyüme oranları hesaplanmıştır. Çalışmamızda 15 ve 30 günlük büyüme oranları karşılaştırıldığında 15 günlük büyüme oranının 30 günlüğe göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda 15 ve 30 gün süreyle kültürde büyüyen örnekler sıcaklık, ışık, nitrat ve asetat stresi uygulanmıştır. 15 ve 30 gün süreyle büyüyen örneklerin büyüme oranları hesaplanmıştır. Strese maruz bırakılan örneklerin, *H. tubulosa* için ilk kez dizayn edilen primerlerle kRT-PZR'la PKS gen ekspresyon oranındaki değişim incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre 30 günlük örneklerde ekspresyon seviyesi daha yüksek tespit edilmiştir. Kim ve ark. (2012) *Cladonia metacorallifera* türünde besiyeri içeriği ile PKS gen bölgesinin ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında 15 günlük ve 3 aylık kontrol gruplarının ekspresyon seviyesini de incelemişlerdir [133]. 15 günlük örneklerin ekspresyon seviyesini 3 aylık örneklerle oranla daha yüksek tespit etmişlerdir. Bu veriler ve çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, kültür örneklerinde PKS gen ekspresyonunu artırmak için örneklerin büyüme sürecinin etkili olduğunu göstermiş ve çok uzun ya da çok kısa süre bekletilmemesi gerektiği yönünde fikir vermiştir.

Aynı zamanda bulgularımıza göre 15 ve 30 günlük örneklerde büyüme oranı ile ekspresyon seviyesi arasında negatif bir ilişki gözlenmiştir. Timsina ve ark. (2013) *R. dilacerata* türünün büyüdüğü besin ortamının poliketid sentezine etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında maya ekstraktları içeren büyüme ortamında daha fazla büyüme gösteren örneklerde en az poliketid üretimi olduğunu gözlemlemişlerdir [134]. Büyüme oranı ile sekonder metabolit üretimi arasında negatif korelasyon tespit etmişlerdir ve besin ortamı ile PKS gen ekspresyonu arasında bağlantı olduğunu belirlemişlerdir. Benzer bir sonuç çalışmamızdaki nitrat içeren ortamda büyüyen örneklerde gözlenmiştir. Nitrat içeren besi ortamındaki *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinde büyüme oranı fazla iken PKS gen ekspresyon seviyesinin düşük olduğu kaydedilmiştir. Bu bulgular literatür ile uyum sağlamaktadır. McCune ve Geiser (2009) nitrojen kaynağının amino asit üretimini artırmasından dolayı büyümeyi artırdığını ifade etmektedir [169]. Timsina ve ark. (2013) besi ortamına nitrojen kaynağı eklendiğinde büyüme artarken gen ifadesinin azaldığını belirtmiştir [134]. Bu durumu azot varlığının

karbon kaynağından farklı bir metabolik yola yönlendirerek iyi büyüme ve gelişmeyi sağladığı şeklinde açıklamışlardır. Asetat stresi uygulanan örneklerde ise aksine büyüme yavaşken PKS gen ekspresyonu artış göstermiştir. Asetatın düşük bir karbon kaynağı olduğu literatürde ifade edilmektedir [108,109]. Ancak karbon kaynaklarının asetat-polimalonil yolağına yönlendirildiği de belirtilmektedir [6,30,134]. Buna bağlı olarak gen ekspresyonunun arttığı düşünülmektedir. *H. tubulosa* mikobiyont örnekleri asetat içeren besi yerinde tutularak asetat molekülünün asetil-CoA üretimi için kaynak olarak kullanılması çalışmamızın başlangıcında öngörülmüştür. Bu amaçla *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinde H1 ve H2 primerleri dizayn edilirken asetil-CoA molekülleri aktive etmekle sorumlu AT ve ACP bölgeleri seçilerek asetatın asetil-CoA aktivasyonuna ve gen ekspresyonuna etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak hem H1 hem de H2 primeri ile çoğalan bölgenin ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Gen ekspresyonundaki etkinin biyolojik aktiviteye de yansıdığı gözlenmektedir. Asetat stresine maruz bırakılan HS3 kodlu örneklerin diğer örneklerle oranla bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine daha etkili oldukları görülmüştür. Özellikle asetat stresine maruz bırakılan HS3 kodlu örneklerin *S. aureus* büyüme eğrisi üzerine diğer stres koşullarından daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Yine *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumu üzerinde de yüksek etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bulgularımız PKS gen ekspresyon seviyesi ile biyolojik aktivite artışında bağlantı olduğunu destekleyen veriler içermektedir.

Işık stresi uygulanan örneklerde ise ekspresyon seviyesinde farklılıklar gözlenmiştir. Ancak genel olarak karanlık ortamda PKS gen ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Sprote ve Brakhage (2007) tarafından ışık varlığının penisilin biyosentezini baskıladığı bildirilmiştir [170]. Likenlerde ise Stocker-Wörgötter (2001) *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis* kültür örneğinde kültür ortamının kurutulana kadar nispeten düşük sıcaklıklarda yüksek ışık koşullarına maruz bırakılmadığı sürece baesomisesik ve skuamatik asitlerin üretilmediğini göstermiştir. Böylece bazı maddelerin üretimi için ışık gerekliliğini ortaya koymuşlardır [171]. Bjerke ve Dahl (2002), *Ramalina*'da thallus içindeki usnik asit yoğunluğu ve ışık yoğunluğu arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir [172]. Sıcaklık stresi uygulanan örneklerde ise 15 °C ekspresyon seviyesi artmıştır. Hamada (1991) *Ramalina siliquosa*'dan alınan mikobiyot kültürlerinde kültür sıcaklığı usnik asit için 12 °C'ye ve 4-O-dimetilbarbatik

için 15 °C'ye yükseltildiğinde usnik asit ve 4-O-dimetil barbatik konsantrasyonunda istikrarlı bir artış olduğunu, daha yüksek sıcaklıklarda her iki bileşen içeriğinin de azalma ile sonuçlandığını göstermiştir [153]. Sıcaklık varyasyonunun likenlerde sekonder metabolit seviyeleri üzerinde önemli etkiye sahip olduğu düşünülmektedir [15]. Bulgularımız da bu görüşü desteklemektedir. Bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine etkisi ile ilişkisi incelendiğinde 15 °C karanlık ortam stresi uygulanan örneklerin *S. aureus* suşunun biyofilm oluşumu üzerinde daha etkili olduğu gözlenmiştir. 37 °C'de ise ışıklı ortamda bulunan örneklerde aktivite daha yüksektir. Bu bulgular ekspresyon seviyesi ile pozitif bir korelasyon göstermektedir. Oluşan sonucun canlının gece gündüz yaşam periyoduyla bağlantılı olması mümkündür. Çünkü gece karanlıkta sıcaklık düşmektedir ve canlı kendini korumak için madde üretimini artırabilmektedir. Gündüz ise sıcaklık ve ışık şiddeti artmaktadır ve canlı kendini korumak için yine madde üretimini artırmaktadır. Örneğin, *Cladonia subtenuis* fazla ışıklı ortamlarda yüksek konsantrasyonda usnik asit üretmiştir [147]. Yine ribitol ve ışık kombinasyonunun test edilmesi sonucunda, usnik asit sentezinin uyarılmasında artış olduğu kaydedilmiştir [148]. Nybakken ve ark. (2004) *X. parietina* türünü kullanarak gerçekleştirdikleri deneyler sonucunda, UV-B'nin parietin maddesinin sentezinin uyarılması için gerekli olduğunu ve bu uyarılmanın yüksek ışık yoğunluğunda daha hızlı olduğunu ortaya çıkarmışlardır [148]. Bulgularımız liken örneklerinin kültür ortamında doğal koşullarını aradığını düşündürmektedir.

Ayrıca çalışmamızda özellikle 30 günlük örneklerde besi yerinde sarı renkli pigmentasyon gözlenmiştir. Cordeiro ve ark. (2004) *Ramalina* türleri ile yaptıkları çalışmada besi yerinde pigment oluşumunu gözlemlemişlerdir [174]. Besi yerinde farklı iki madde belirlemişler ancak maddenin analizini gerçekleştirememişlerdir. Wang ve ark. (2012) tarafından *Usnea longissima* türüne ait indirgemeyen gen bölgelerinin ekspresyonunu inceledikleri çalışmada MYA, alanin, inositol, sorbitol, glikoz, sukroz içeren besiyerlerinde farklı renk pigmentasyonu gözlemlenmiştir [175]. Ancak ortam renk değişikliği ile gen ifadesi arasında ilişki gözlenmemiştir. Çalışmamızda ise gen ekspresyonu bulguları incelendiğinde renk pigmenti içeren besiyerinde bulunan örneklerde, renk değişimi olmayan örneklere oranla gen ekspresyonu daha düşük ölçülmüştür. Bu süreçte renk pigmenti içeren besiyerindeki örneklerin farklı metabolik

reaksiyonlar nedeniyle renk pigmenti ürettiği ve bu metabolik reaksiyonlara yöneldiği için PKS ekspresyonunda azalma olmuş olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızdaki bulgular *H. tubulosa* mikobiyont örneğinin antibiyofilm aktivitesi ile ilgili ilk verilerdir, daha önce herhangi bir çalışma rapor edilmemiştir. *H. tubulosa* türünün doğadan toplanan örneklerinin *P. aeruginosa* bakteri suşunun büyüme eğrisi, biyofilm oluşumu ve QS mekanizması üzerine etkisi Uçarkuş (2017) tarafından incelenmiştir [176]. Doğadan toplanan *H. tubulosa* aseton özütlerinin düşük dozlarının biyofilm formunu yüksek dozlara göre daha yüksek oranda inhibe ettiğini, özellikle *H. tubulosa*'nın yüksek anti-biyofilm etkiye sahip olduğunu belirlemiştir. Bunun sebebinin, yüksek dozların bakteriyi strese sokması ve strese giren bakterinin daha fazla oranda biyofilm formu meydana getirmesi olarak ifade etmiştir. Nithyanand ve ark. (2015) ise yaptıkları bir çalışmada usnik asidin *Streptococcus pyogenes* bakteri suşlarının biyofilm formu üzerindeki etkinliğini incelemişlerdir [75]. 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. Benzer şekilde çalışmamızda kullanılan doğal örneklerde ve strese maruz bırakılan örneklerde düşük dozların anti-biyofilm etkisi daha yüksek bulunmuştur. Yüksek dozların biyofilm oluşumunu artırdığı gözlenmiştir.

Stres koşullarının etken madde üretimini ve buna bağlı olarak biyolojik aktiviteyi etkilemiş olabileceği düşünülerek, tüm örneklerden elde edilen aseton özütleri bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine test edilmiştir. Stres koşullarında çoğaltılan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin özellikle *P. aeruginosa* suşu büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine doğa örneklerinden daha etkili olduğu gözlenmiştir. *P. aeruginosa* suşuna karşı 15 günlük örneklerden 15 °C stresine maruz kalanların daha yüksek antibiyofilm etkisi tespit edilmiştir. *S. aureus* üzerine antibiyofilm gösteren örneklerin aksine 37 °C karanlık koşullarının daha etkili olduğu gözlenmiştir. Yine *P. aeruginosa* suşu büyüme eğrisinin inhibisyonunda 37 °C karanlık ve 15 °C stresinin daha etkili olduğu gözlenmiştir. Literatürde liken maddelerinin Gram negatif bakterilere karşı daha az etkili olduğu ifade edilmektedir. Bunun doğadaki liken örneklerinin Gram negatif bakterilere karşı etkili olan maddeleri üretmesini sağlayacak şartların oluşmamasından kaynaklanması olasıdır. 37°C karanlık ortamın *P. aeruginosa* gibi Gram negatif bir bakteriye karşı etkiyi artırdığı düşünüldüğünde bunu doğada

sağlamak çok kolay olmayacaktır. Liken örneklerinin “kültür koşullarında” doğada üretmedikleri maddeleri üretmeleri de mümkün görülmektedir. Örneğin Cordeiro ve ark. (2004) doğal örneklerde gözlemleyemediği atranorin maddesini kültür örneklerinde gözlemlemiştir [174].

Çalışmamızda stres koşullarında üretilen maddeler için gerçekleştirilen ince tabaka kromatografisi uygulamasında stres uygulanan örneklerde metabolit çeşitliliği ile doğa örneği arasında farklılık olduğu gözlenmiştir. Ancak stres örnekleri arasında fark tespit edilememiştir, etkinlikleri arasındaki farklılığın üretilen madde miktarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Molnar ve Farkas (2011) *H. physodes* ile gerçekleştirdiği çalışmasında farklı bölgelerden toplanan örneklerde metabolit çeşidi açısından farklılık tespit edememiştir [177]. Sadece sekonder metabolitlerin miktarında farklılıklar tespit etmiştir. Benzer şekilde Fazio ve ark. (2007) ise *T. chrysophthalmus* ve *R. celastri*'nin izole mikobiyontları tarafından üretilen metabolitleri araştırmışlardır [178]. Mikobiyontlar ile liken tallusunda benzer miktarda, hatta bazı maddelerin ise mikobiyontta daha fazla olduğunu gözlemlemiştir. Mevcut verilerle, *in vitro* sekonder metabolitlerin üretimi için kültürlenmiş mikobiyotların kullanımı umut verici bulunmuştur. Culberson ve Armelo (1992) kültür örneği ile doğal örneği karşılaştırmıştır [168]. Kültür örneğinde usnik asit miktarının tallusa göre daha düşük olduğunu belirlemiştir. Fakat doğal tallusun büyümesinin kültürlenen dokulardan daha yavaş olmasından dolayı kültürlenmiş dokuların, usnik asit üretimi için tallustan daha üstün olduğunu ifade etmişlerdir. Aynı zamanda, ortamda fotobiyont olmadan da metabolit üretiminin gerçekleştiğini belirterek sekonder metabolit üretimi için fotobiyontta ihtiyaç olmadığını iddia etmişlerdir.

Sonuç olarak ekspresyon oranının daha yüksek tespit edildiği örneklerin bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine etkisinin de genellikle daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Örneğin asetat stresine maruz bırakılan HS3 kodlu örneklerin nitrat-asetat stresine maruz bırakılan diğer örneklere oranla bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerinde daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Özellikle asetat stresine maruz bırakılan HS3 kodlu örneklerin *S. aureus* büyüme eğrisi üzerine daha etkili olduğu görülmüştür. PKS ekspresyon seviyesindeki farklılığın aktiviteyi etkilediği ortadadır. Bu sonucun metabolit üretimindeki artıştan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Likenlerde poliketid genleri sekonder metabolitlerin sentez mekanizmasının açığa çıkarılmasında önemli bir araştırma konusu olarak görülmektedir. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki poliketidlerin biyosentezinde poliketid sentaz enzimleri görev almaktadır ve bu multienzim kompleksleri asetil-CoA ve malonil-CoA türevlerinin farklı şekillerde aktive edilmesini sağlamaktadır [1,30,41,121]. Likenlerde daha yaygın olduğu düşünülen Tip I tekrarlayan (iterative) tip poliketid sentez enzimleri belirlenmiştir. Özellikle indirgemeyen (NR) tip poliketid sentazlar çok daha yaygın tespit edilmiştir [41,114,121,124]. Çalışmamızda test ettiğimiz *H. tubulosa* türüne ait gen dizilerini belirlemek için GenBank'a *Hypogymnia* cinsine ait Yu ve ark., (2013) tarafından yüklenen *H.physodes* PKS gen dizileri indirilerek açıl taşıyıcı protein (ACP) bölgesiyle uyumlu H1 ve H2 primerleri dizayn edilmiştir. *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin H1 ve H2 primeri ile çoğaltılan bölgelerinin dizileri Yu ve ark. (2013) tarafından yüklenen *H.physodes* PKS gen bölgesi nükleotid dizileri ve yine aynı bölgeye ait aminoasit dizileri karşılaştırılarak *H. tubulosa* mikobiyont PKS gen bölgesinin analizi yapılmıştır. H1 ve H2 primeri ile çoğaltılan bölgelerin açıl taşıyıcı protein (ACP) bölgesiyle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Yu ve ark., (2013) *H.physodes* indirgemeyen (NR) tip PKS1 ve PKS2 bölgesi üzerinde bugüne kadar indirgemeyen (NR) tip PKS'lerde hiç rapor edilmeyen depsid ve depsidon üretiminde etkili R alanını tespit ettiklerini ifade etmektedir [131]. Çalışmamızda *H. tubulosa* mikobiyont PKS gen bölgesinin R alanını sahip olması ile ilgili bir yorum yapmak için PKS gen bölgesine ait tüm dizinin oluşturulması gerekmektedir. *H. tubulosa* mikobiyont H1 ve H2 primeri ile çoğaltılan PKS gen bölgesi GenBank'taki verilerle karşılaştırıldığında Tip I tekrarlayan (iterative) ve indirgemeyen poliketid sentez genleri ile uyum göstermektedir. H1 primeri ile çoğaltılan bölge Tip I tekrarlayan (iterative) gen ile daha fazla yakınlık vermektedir. H2 primeri ile çoğaltılan bölge ise özellikle *H. physodes* türünün indirgemeyen poliketid sentez genleri ile uyum göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen bulgular *H. tubulosa* mikobiyont örneğine ait Tip I poliketid sentez enzimlerinin üretiminden sorumlu gen bölgelerinin varlığını ortaya koymaktadır.

Bu noktada PKS gen bölgelerinin analizinin temel amacı liken maddelerinin daha hızlı büyüyen farklı canlılarda *in vivo* şartlarda çoğaltılmasını sağlamaktır. Ancak günümüzde PKS genlerinin heterolog ifadesi ve daha büyük miktarlarda biyolojik aktiviteye sahip poliketidlerin ardışık üretilmesi ile şimdiye kadar yapılmış olan

teşebbüslerde prokaryotik veya ökaryotik konak organizmalarda liken poliketid üretmek için tam bir başarı elde edilememiştir. Fungal PKS genleri, genellikle 6-8 kb'lık çok büyük DNA sekansına sahiptir [40] ve intron dizileri içerdiği için klonlaması çok zor olmaktadır. Özellikle proteininin orijinal işlevi ile sentezlenmesi tam mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla, hem uygun konakçı hem de hızlı büyüyen mantarların bulunması ve orijinal liken PKS'nin ekspresyonu için daha fazla çalışma ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda olduğu gibi, son yıllarda liken örneklerinin sanayiye aktarılmasını sağlamak amacıyla kültür koşullarının değiştirilerek en iyi büyümenin sağlandığı besin ortamının ve sekonder metabolit sentezinin artmasını sağlayacak stres koşullarının tespit edilmesine yönelik çalışmaların arttığı literatürde belirtilmektedir [103-105].

BÖLÜM 4

4. SONUÇLAR

Tıp tarihiyle ilgili kaynaklar, insanların çok eski zamanlardan beri hastalıkların iyileştirilmesinde çeşitli doğal ürünlerden yararlandıklarını göstermektedir [1-4]. Günümüzde insanlar çeşitli hastalıkların tedavisinde doğal ürünleri tüketmek istemektedir. Bu nedenle sentetik ilaçlar yerine doğal ürünlerden elde edilen ilaçlar tercih edilmektedir. Modern ilaç endüstrisi hastalıklara karşı birçok bitkiyi ilaç yapımında kullanmaktadır. Bitkisel ilaç hammaddeleri sentetik olanlardan daha ucuz ve daha kolay elde edilebilmektedir. Ayrıca, bazı yeni sentetik bileşiklerin tehlikeli yan etkilerinin gözlenmesi ve birkaç etkiye birden sahip olmaları nedeniyle bitkisel ilaçlar tercih edilmektedir. Buna bağlı olarak, günümüzde birçok ilaç firması doğal ürünlerin geliştirilmesi için önemli yatırımlar yapmaktadır. Özellikle yurt dışından ilaçların veya ilaç hammaddelerinin alınması oldukça yüksek maliyetli olduğu için ekonomik açıdan tercih edilmemektedir.

Hastalıkların iyileştirilmesinde kullanılan doğal ürün kaynaklarından biri de likenlerdir. Likenlerin tıptan, eczacılığa; boya endüstrisinden, besin endüstrisine kadar birçok alanda kullanımlarına yapısında bulunan sekonder metabolitler imkân sağlamaktadır [3,5]. Ancak likenleri çok fazla miktarda bulmak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle ilaç keşfi ve biyolojik aktivite için potansiyele sahip önemli liken sekonder metabolitlerinin üretilmesine katkıda bulunmayı hedeflediğimiz bu tez çalışmasında; konu ile ilgili literatür göz önünde bulundurularak çeşitli likenleri kültür ortamında çoğaltmak, ekten maddelerin sentezlenmesinde görevli genlerin ekspresyonunun kRT-PZR ile ölçülmesi amaçlanmıştır. Ayrıca sekonder metabolit üretiminde etkili stres koşullarının gen ekspresyonuna ve üretilen sekonder metabolitlerin bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaç ve hedefler doğrultusunda *H.tubulosa* mikobiyontları Türkiye'de ilk kez kültür ortamında büyütülmüştür. Örneklere stres uygulanarak PKS gen ekspresyonu ve biyolojik aktivite farklılaşması tespit edilmeye çalışılmıştır. *H.tubulosa* için H1 ve H2 primerleri tasarlanmış, primerler kullanılarak *H.tubulosa* türünün PKS gen bölgelerine ait diziler elde edilmiştir. Örnekler sıcaklık, ışık, nitrat veya asetat içeren besi ortamı gibi farklı koşullara maruz bırakılarak PKS gen ekspresyonu ve aktivite farklılıkları

incelenmiştir. Bu yolla sekonder metabolit üretimini artırmak için en etkili ortam koşulunun belirlenmesi sağlanmıştır. Aynı zamanda liken türlerinin içerdiği sekonder metabolitlerin, hem bölgesel hem de yetiştirme şartlarındaki (doğal ve kültür koşulları) farklılıkların metabolitlerin çeşitliliğine ve metabolit konsantrasyonuna etkisi TLC yöntemi ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, metabolitlerin *in vivo* şartlarda elde edilmesinde ve ürün miktarının artırılmasında gerekli uygun ortamların belirlenmesi açısından önemli veriler sunmaktadır.

Bursa lokalitesinden toplanan taze liken örneklerinin aseton özütünün *S. aureus* bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine oldukça etkili olduğu gözlenmiştir. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun büyüme eğrisi üzerine sınırlı etkisi olsa da özellikle biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Kültüre alınan *H. tubulosa* mikobiyont örneklerinin büyüme oranları incelendiğinde, 15 günlük örneklerin 30 günlük örneklerle göre daha fazla büyüme oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Kültür örneklerine stres uygulandığında ise asetat stresine maruz bırakılan örneklerin büyüme oranının daha az olduğu tespit edilmiştir. Stres koşullarında PKS genlerinin ekspresyon oranları incelendiğinde, 15 günlük örneklerde 30 günlük örneklerle oranla daha düşük olduğu, 15 ve 37 °C'de bekletilen örneklerde ise genellikle 15 °C'de ekspresyon oranının arttığı gözlenmiştir. Işık stresine maruz bırakılan örneklerde karanlık ortamın PKS gen ekspresyonunu artırdığı tespit edilmiştir. Nitrat ve asetat içeren besiyerindeki örneklerde ise asetat stresine maruz bırakılan örneklerde ekspresyon oranı nitrat ve nitrat-asetat örneklerine göre oldukça yüksek bulunmuştur. PKS ekspresyon oranının büyüme oranı ile ters orantılı olduğu gözlenmiştir.

Strese maruz bırakılan örneklerin aseton özütleri *P.aeruginosa* PAO1 ve *S. aureus* bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine etkili bulunmuştur. Özellikle *P.aeruginosa* PAO1 suşu üzerine sıcaklık ve ışık stresi altındaki bazı mikobiyont örneklerinin doğal örneklerden daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Nitrat ve asetat stresine maruz bırakılan örnekler incelendiğinde PKS gen ekspresyon oranının fazla olduğu, asetat örneklerinin antibiyofilm aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Örneklerin sahip olduğu sekonder metabolitleri tespit etmek için uygulanan kromatografi testleri sonucunda örneklerde belirgin 4 madde tespit edilmiştir ancak örnekler arasında madde üretimi açısından net bir ayrım gözlenmemiştir.

ITS bölgesi dizilerinden yararlanarak uygun primerlerle PZR ürünleri elde edilmiş ve filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu çalışma Türkiye’den toplanan örneklerle ait gen dizilerinin GenBank’a yeni veri olarak sunulmasıyla likenoloji bilgi birikimine katkı sağlanmıştır.

PKS genleri incelenmiş ve analiz edilmiştir. PKS gen ekspresyonunun mikobiyontun büyüme dönemine göre değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Büyümenin daha fazla olduğu dönemlerde PKS ekspresyonunun daha düşük olduğu gözlenmiştir. Stres koşullarının sekonder metabolit üretiminde görevli PKS ekspresyonunu ve bakteri suşlarının büyüme eğrisi ve biyofilm oluşumu üzerine aktivitesini etkilediği sonucuna varılmıştır. Likenlerin kültürde çoğaltılarak endüstri alanında uygulanabilmesi için örneklerin önce liken boyutunu artırıcı faktörlere maruz bırakılması, yeterli boyuta ulaştıktan sonra strese maruz bırakılarak metabolit üretiminin artırılacağı belirlenmiştir. Bu tez çalışması Türkiye ve bilim dünyası açısından hem deneysel yöntemler hem de elde edilen sonuçlar bakımından pek çok yeniliği içermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Romagni, J.G., Dayan, F. E. (2002) *Structural Diversity of Lichen Metabolites and Their Potential Use*. in R. K. Upadhyay, ed., *Advances in Microbial Toxin Research and its Biotechnological Exploitation*. Kluwer Academic and Plenum Publishers, New York, 151-170.
- [2] Çobanoğlu, G., Yavuz, M. (2003) Tıp tarihinde likenlerle tedavi. *Yeni Tıp Tarihi Araştırmaları*, 9,37-90.
- [3] Çobanoğlu, G. (2005) Likenlerin potansiyel kullanımlarına tarihsel bakış ve Türk tıp tarihinde likenler. *Türk Liken Topluluğu Bülteni*, 1, 14-16.
- [4] Yavuz, M., Çobanoğlu, G. (2010) Ethnological uses and etymology of the word *Usnea* in Ebubekir Razi's "Liber Almansoris". *The British Lichen Society Bulletin*, 106, 3-12.
- [5] Llano, G.A. (1950) Economic uses of lichens. *Annual Report, Smithsonian Institution*. Washington D.C.
- [6] Nash III, T.H. (2008) *Lichen Biology*, Second Edition, Cambridge University Press.
- [7] Stocker-Wörgötter, E. (2010) Stress and Developmental Strategies of lichens. *Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology Series* (Joseph Seckbach and Martin Grube, eds.) Part 4, 525-546.(Book Chapter)
- [8] Shukla, V., Joshi, G.P., Rawat, M.S.M. (2010) Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9: 303-314.
- [9] Ahmadjian, V. (1982) *Algal/Fungal Symbioses*. *Progress in Phycological Research*. 1179-233.
- [10] Brodo, I.M., Sharnoff, S.D. Sharnoff, S. (2001) *Lichens of North America*, Yale University Press. New Haven and London, 1-795.
- [11] Dobson, F.S. (1992). *Lichens an Illustrated Guide to the British and Irish Species*. The Richmond Publishing Co. Ltd., England.
- [12] Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. (2008) *Dictionary of the fungi*, 10th edn. CAB,Wallingford, Oxon, UK.

- [13] Lucking, R., Lawrey, J.D., Sikaroodi, M., Gillevet, P.M., Chaves, J.L., Sipman, H.J.M., Bungartz F. (2009) Do Lichens Domesticate Photobionts Like Farmers Domesticate Crops? Evidence From A Previously Unrecognized lineage of Filamentous Cyanobacteria. *American Journal of Botany*, 96(8), 1409–1418.
- [14] Ahmadjian, V., Jacobs, J.B. (1983) Algal-fungal relationships in lichens: Recognition, synthesis, and development. Pages 147–172 in Goff LJ, ed. *Algal Symbiosis*. Cambridge (UK), Cambridge University Press.
- [15] Ranković, B., Ranković, D., Kosanić, M., Maric, D. (2010) Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Anaptychia ciliaris*, *Nephroma parile*, *Ochrolechia tartarea* and *Parmelia centrifuga*. *Central European Journal of Biology*, 5(5), 649-655.
- [16] Malcolm, W.M., Galloway, D.J. (1997) *New Zealand Lichens. Checklist, Key, and Glossary*, The Caxton Press, Christchurch, New Zealand.
- [17] Boustie, J., Grube, M. (2005) Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genet. Resour.* 3, 273 – 287.
- [18] Lindsay, W. L. (1856) *A Popular History of British Lichens Comprising an Account of their Structure, Reproduction, Uses, Distribution, and Classification*. Lovell Reeve, London, 1–352.
- [19] Honegger, R. (2006) Water relations in lichens. *Fungi in the Environment*, Editors. Gadd, G.M., Watkinson, S.C., Dyer, P., Cambridge University Press, 9, 185-200.
- [20] Armstrong, R.A. (1974) The descriptive ecology of saxicolous lichens in area of South Merionethshire, Wales. *J Ecol* 62, 33–45.
- [21] James, P. W., Hawksworth, D. L., Rose, F. (1977) Lichen Communities of the British Isles: a preliminary conspectus. In *Lichen Ecology* (M. R. D. Seaward, ed.): 295–413. London, Academic Press.
- [22] Garty, J. (2001) Biomonitoring Atmospheric Heavy Metals with Lichens: Theory and Application. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 20(4), 309-371.
- [23] Poikolainen, J. (2004). *Mosses Epiphytic Lichens and Tree Bark as Biomonitors for Air Pollutants – Specifically for Heavy Metals in Regional Surveys*, (Academic Dissertation), University of Oulu, Faculty of Science, Department of Biology, Finland.

- [24] Çobanoğlu, G. (2015) The use of lichens for biomonitoring of atmospheric pollution-Atmosferik kirliliğin biyolojik izlenmesinde likenlerin kullanımı. Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences, 33(4), 591-613.
- [25] Smith, C. W., Aptroot, A., Coppins, B. J., Fletcher, A., Gilbert, O. L., James, P. W., Wolseley, P. A. (2009) The Lichens of Great Britain and Ireland. The British Lichen Society, London.
- [26] Anonim: <http://waynesword.palomar.edu/images/soredia.gif> (Haziran 2017)
- [27] Lawrey, J.D. (2009) Lichen chemical defense: Chapter 11 In Diversity of Defensive Mutualisms (J. White and M. Torre, eds.), Taylor & Francis Group Publishers, 167-181.
- [28] Taylor, T.N., Hass, H., Remy, W., Kero, H. (1995) The oldest fossil lichen. Nature, 378, 244.
- [29] Yuan, X., Xiao, S., Taylor, T.N. (2005) Lichen-like symbiosis 600 million years ago. Science, 308, 1017–1020.
- [30] Chooi, Y.H., Stalker, D.M., Davis, M.A., Fujii, I., Elix, J.A., Louwhoff, S.H.J.J., Lawrie, A.C. (2008) Genetic Potential of Lichen-Forming Fungi in Polyketide Biosynthesis. Phd. thesis, School of Applied Sciences Science, Engineering and Technology Portfolio RMIT University, 112, 147–161.
- [31] Acharius, E. (1803) Methodus qua Omnes Detectos Lichenes Secundum Organa Carpomorpha ad Genera, Specie et Varietates Redigere Atque Obsevationibus Illustrare Tentavit. Sect. I. Stockholmiae.
- [32] Acharius, E. (1810) Lichenographia Universalis in qua Lichenes Omnes Detectos, Adiectis Obsevationibus et Figuris Horum Vegetabilium Naturam et Organorum Carpomorphorum Structuram Illustrantibus ad Genera, Species, Varietates Differentiis et Obsevationibus Sollicite Definitas Redegit. Gottingae.
- [33] Boonpragob, K., Crittenden, P.D., Lumbsch, T.H. (2012) Lichens: from genome to ecosystems in a changing world. Myco Keys, 6, 1–2.
- [34] Blackwell M (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? Am. J. Bot., 98(3), 426–438.
- [35] Grube, M., Kroken, S. (2000) Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. Mycol. Res., 104, 1284–1294.

- [36] DePriest, P.T. (2004) Early Molecular Investigations of Lichen-Forming Symbionts: 1986–2001. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 273–301.
- [37] Huneck, S., Yoshimura, I. (1996) Identification of lichen substances. Springer, Berlin, 493 p.
- [38] Orange, A., James, P.W., White, F.J. (2001) Microchemical methods for the identification of lichens. British Lichen Society, pp 101.
- [39] LaGreca, S. (1999) A phylogenetic evaluation of the *Ramalina americana* chemotype complex (lichenized Ascomycota, Ramalinaceae) based on rDNA ITS sequence data. *Bryologist*, 102, 602-618.
- [40] Miao, V., Coëffet-LeGal, M.F., Brown, D., Sinnemann, S., Donaldson, G., Davies, J. (2001) Genetic approaches to harvesting lichen products. *Trends in Biotechnology*, 19, 349-355.
- [41] Kroken, S., Glass, N.L., Taylor, J.W., Yoder, O.C., Turgeon, B.G. (2003) Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 15, 670– 675.
- [42] Frisvad, J.C., Anderson, B., Thrane, U. (2008) The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*, 112, 231-240.
- [43] Çobanoğlu Özyiğitoğlu, G., Açıkgöz B., Sesal C. (2016) Lichen secondary metabolites: Synthesis pathways and biological activities. *Acta Biologica Turcica* 29(4): 150-163.
- [44] Aalto-Korte, K., Lauerma, A., Alanko, K. (2005) Occupational allergic contact dermatitis from lichens in present-day Finland. *Contact Dermatitis*, 52(1), 36-8.
- [45] Aslan, A. (2000) Erzurum ve Artvin Çevresinden Toplanan Dört Liken Türünün Yün Boyama Özellikleri. *Herba Medica*, 7: 21-24.
- [46] Molnar, K., Farkas, E. (2010) Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung*, 65c,157-173.
- [47] Shukla, P., Upreti, D.K., Nayaka, S., Tiwari, P. (2014) Natural Dyes from Himalayan Lichens. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 13/1, 195-201.

- [48] Şen, H., Aksoy, A., Çobanoğlu, G., Selvi, S. (2014) Natural dyeing works on some lichens species distributed in Ayvacık (Çanakkale) and İvrindi (Balıkesir/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 7/3, 184-189.
- [49] Çobanoğlu, G. (2004) Eski ve yeni kullanım alanları, bilinmeyen yönleriyle likenler. *Bilim ve Teknik Dergisi*, 439, 86-89.
- [50] Bhattarai, H.D., Paudel, B., Hong, S.G., Lee, H.K., Yim, J.H. (2008) Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents of lichens from Antarctica. *Journal of Natural Medicines*, 62, 481–484.
- [51] Çobanoğlu, G., Sesal, C., Gökmen, B., Çakar, S. (2010) Evaluation of the antimicrobial properties of some lichens. *South Western Journal of Horticulture*, 1(2), 153-158.
- [52] Açıkgöz, B., Karaltı, İ., Ersöz, M., Coşkun, M.Z., Çobanoğlu, G., Sesal, C. (2013). Screening of antimicrobial and cytotoxic effects of two *Cladonia* species. *Zeitschrift für Naturforschung*, 68c, 191-197.
- [53] Kaptaner İğci, B. (2013) Likenlerin antimikrobiyal etkileri üzerine Türkiye'de yapılan çalışmalar. *Liken Araştırmaları Derneği (LİKAD) Bülteni*, 2, 22-25.
- [54] Oran, S. (2013) Türkiye'de likenlerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi konusunda yapılan çalışmalar. *Liken Araştırmaları Derneği (LİKAD) Bülteni*, 2, 16-22.
- [55] Çobanoğlu, G., Sesal, C., Açıkgöz, B., Karaltı, I. (2016) Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Physcia aipolia*, *Xanthoria parietina*, *Usnea florida*, *Usnea subfloridana* and *Melanohalea exasperata*. *Modern Phytomorphology*, 10, 21-26.
- [56] Crawford, S.D. (2015) Lichens Used in Traditional Medicine, chapter 2 in B. Rankovic' (ed.), *Lichen Secondary Metabolites*. Springer International Publishing Switzerland.
- [57] Yavuz, M. (2013) Lichens in the prescriptions of Pliny the Elder. *Oltenia, Studii şi comunicări, Ştiinţele Naturii*, 29(1), 115-119.
- [58] Malhotra, S., Subban, R., Singh, A. (2008). Lichens-role in traditional medicine and drug discovery. *The Internet Journal of Alternative Medicine*, 5(2).

- [59] Prateeksha, P.B.S., Bajpai, R., Jadaun, V., Kumar, J., Kumar, S., Upreti, D.K., Singh, B.R., Nayaka, S., Joshi, Y., Singh, B.N. (2016) The genus *Usnea*: a potent phytomedicine with multifarious ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *The Royal Society of Chemistry, RSC Adv.*, 6, 21672-21696.
- [60] Ingolfssdottir, K. (2002). Molecules of Interest - Usnic acid. *Phytochemistry*, 61, 729-736.
- [61] Manojlovic, N.T., Solujici S., Sukdolaki S., Milosev, M. (2005). Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*. *Fitoterapia*, 76(2), 244-6.
- [62] Ingolfssdottir, K., Hjalmarsdottir, M.A., Sigurdsson, A., Gudjonsdottir, G.A., Brynjolfsdottir, A., Steingrimsen, O. (1997) In Vitro Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Protolichsterinic Acid from the Lichen *Cetraria islandica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 215-217.
- [63] 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.
- [64] Uçarkuş, E., Gökalsın, B., Yıldırım, N., Açıkgöz, B., Özyiğitoğlu, G., Sesal, N.C. (2017) Balıkesir bölgesinden toplanan liken örneklerine ait özütlerin *Escherichia coli* ATCC 25922 üzerindeki antibakteriyel etkinlikleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 47(1), 26-32.
- [65] Ranković, B., Ranković, D., Kosanić, M., Maric, D. (2010) Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Anaptychia ciliaris*, *Nephroma parile*, *Ochrolechia tartarea* and *Parmelia centrifuga*. *Central European Journal of Biology*, 5(5), 649-655.
- [66] Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., Stefanović, O., Čomić, L., Dačić, D., Ćurčić, M., Marković, S. (2011) Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5428-5448.
- [67] Packiyavathy, S. V. I.A, Palani, A., Ramaswamy, B. R., Shunmugiah, K. P., Arumugam, V.R., (2011) Antiquorum Sensing and Antibiofilm Potential of *Capparis spinosa*. *Archives of Medical Research*, 42, 658-668.

- [68] MOHAMED, J.A., Huang, D. B., (2007) Biofilm formation by enterococci. J Med Microbiol, 56,12, 1581-1588.
- [69] Karatuna, O., Yağcı A. (2008) *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 38(1), 42-51.
- [70] Gülbandılar, A., (2009) Kütahya yöresinde burun mukozasındaki *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının ve antibiyotik duyarlılığının araştırılması. DPÜ Fen Bilimleri Dergisi, Sayı 18.
- [71] Arnold, J.W., Silvers, S., (2000) Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. Poul Sci, 79, 1215-1221.
- [72] Cocchietto, M., Skert, N., Nimis, P.L., Sava, G. (2002) A review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften, 89: 137-146.
- [73] Elo, H., Matikainen, J., Peltari, E. (2007) Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant *enterococci* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Naturwissenschaften, 94, 465-468.
- [74] Francolini, I., Norris, P., Piozzi, A., Donelli, G., Stoodley, P. (2004) Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(11), 4360-4365.
- [75] 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.
- [76] 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.
- [77] Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Radulovic, N., Mladenovic, M., Stankovic, M., Topuzovic, M., Radojevic, I., Stefanovic, O., Vasic, S., Comic, L. (2014) *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. EXCLI journal, 13, 938.
- [78] 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.

- [79] Pompilio, A., Crocetta, V., Pomponio, S., Fiscarelli, E., Di Bonaventura, G. (2015) In vitro activity of colistin against biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* is significantly improved under “cystic fibrosis-like” physicochemical conditions. Diagnostic microbiology and infectious disease.
- [80] Fernandez-Moriano, C., Gomez-Serranillos, M.P., Crespo, A. (2016) Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. Pharmaceutical Biology, 54(1), 1-17.
- [81] Verma, N., Behera, B. C. (2015) In Vitro Culture of Lichen Partners: Need and Implications. D.K. Upreti et al. (eds.), Recent Advances in Lichenology, Springer India 2015.
- [82] Brunauer, G., Stocker-Wörgötter, E. (2005) Culture of lichen fungi for future production of biologically active compounds. Symbiosis, 38, 187–201.
- [83] Timsina, B.A. (2013) Evolution and expression of polyketide synthase Gene in the lichen-forming fungal families *Cladoniaceae* and *Ramalinaceae*. Phd thesis, Department of Biological Sciences University of Manitoba Winnipeg Manitoba Canada.
- [84] Thomas, E.A. (1939) Über die Biologie von Flechtenbildnern. Buchdruckerei Böhler, Bern.
- [85] Ahmadjian, V. (1961) Studies on lichenized fungi. Bryologist, 64, 168-179.
- [86] Ahmadjian, V. (1966) Lichens. In: Henry SM (ed) Symbiosis, vol I. Academic Press, New York, 36–97 .
- [87] Ahmadjian, V., Heikkilä, H. (1970) The culture and synthesis of Endocarpon pusillum and Staurothele clopima. Lichenologist, 4, 256–267.
- [88] Yamamoto, Y., Mizuguchi, R, Yamada, Y. (1985) Tissue culture of *Usnea rubescens* and *Ramalina yasudae* and production of usnic acid in their cultures. Agric Biol Chem 49, 3347–3348.
- [89] Yoshimura, I., Kurokawa, T., Nakano, T., Yamamoto, Y. (1987) A preliminary report of cultures of *Cladonia vulcani* and the effects of the hydrogen ion concentration on them. Bull Kochi Gakuen Coll, 18, 335–345.
- [90] Yamamoto, Y., Mizuguchi, R., Takayama, S., Yamada, Y. (1987) Effects of culture conditions on the growth of *Usneaceae* lichen tissue cultures. Plant Cell Physiol, 28, 1421–1426.

- [91] Yoshimura, I., Kurokawa, T., Kanda, H. (1990) Tissue culture of some Antarctic lichens preserved in the refrigerator. In: Proceedings of NIPR symposium on polar biology, 3, 224–228.
- [92] Stocker-Wörgötter, E., Turk, R. (1988) Culture of the cyanobacterial lichen *Peltigera didactyla* from soredia under laboratory conditions. Lichenologist 20, 369–376.
- [93] Yamamoto, Y., Miura, Y., Higuchi, M., Kinoshita, Y. (1993) Using lichen tissue culture in modern biology. Bryologist 96, 384–393.
- [94] Behera, B.C, Makhija, U., Adawadkar, B. (2000) Tissue culture of *Bulbothrix setschwanensis* (lichenized ascomycetes) in vitro. Curr Sci., 78, 781–783.
- [95] Behera, B.C., Makhija, U. (2001) Effect of various culture conditions on growth and production of salazinic acid in *Bulbothrix setschwanensis* (lichenized ascomycetes) in vitro. Curr Sci., 80, 1424–1427.
- [96] Behera, B.C., Makhija, U. (2002) Inhibition of tyrosinase and xanthine oxidase by lichen species *Bulbothrix setschwanensis*. Curr Sci., 82, 61–66.
- [97] Verma, N., Behera, B.C., Sonone, A., Makhija, U. (2008) Cell aggregates derived from natural lichen thallus fragments: antioxidant activities of lichen metabolites developed in vitro. Nat Prod Commun, 3, 1911–1918.
- [98] Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A., Makhija, U. (2005) Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghattensis*. Phytother Res., 19, 58–64.
- [99] Stocker-Wörgötter, E. (2005) Approaches to a biotechnology of lichen forming fungi: induction of polyketide pathways and the formation of chemosyndromes in axenically cultured mycobionts. Rec. Res. Dev. Phytochem., 9, 115–131.
- [100] Verma, N. (2011) Studies on antioxidant activities of some lichen metabolites developed *in vitro*. Shodh Ganga, Indian ETD Repository, 2.
- [101] Molnár, K., Farkas, E. (2010) Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. Z Naturforsch C, 65, 157–173.
- [102] Behera, B.C., Mahadik, N., Morey, M. (2012) Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. Pharm Biol. 50, 968–979.

- [103] Verma, N., Behera, B.C., Joshi, A. (2012) Studies on nutritional requirement for the culture of lichen *Ramalina nervulosa* and *Ramalina pacifica* to enhance the production of antioxidant metabolites. *Folia Microbiol.*, 57,107–114.
- [104] Verma, N., Behera, B. C., Sonone, A., Makhija, U. (2008) Lipid peroxidation and tyrosinase inhibition by lichen symbionts grown *in vitro*. *African Journal of Biochemistry Research*, 2 (12), 225-231.
- [105] Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A., Makhija, U. (2005) Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghattensis*. *Phytother Res.*, 19, 58–64.
- [106] Ahmadjian, V. (1993) The lichen symbiosis. John Wiley&Sons, Inc.,New York.
- [107] Pyatt, F.B. (1973) Plant sulphur content as air pollution gauge in the vicinity of a steelworks. *Environ Pollut.*, 5,103–115.
- [108] Yoshimura, I., Yamamoto, Y., Nakano, T., Finnie, J. (2001) Isolation and culture of lichen photobionts and mycobionts. In: Kranner I, Becknett R, Varma A (eds) *Methods in lichenology*. Springer, Heidelberg, 3–33.
- [109] Yamamoto, Y. (2002) Discharge and germination of lichen ascospores in the laboratory (in Japanese). *Lichenol.*, 1,11–22.
- [110] Shukla, V., Upreti, D.K. (2007) Physiological response of the lichen *Phaeophyscia hispidula* (Ach.) Essl. to the urban environment of Pauri and Srinagar (Garhwal), Himalayas. India. *Environ. Pollut.*, 150, 295–299. doi:10.1016/j.envpol.2007.02.010.
- [111] Hale, M.E. (1983) The biology of lichens. Edward Arnold, London.
- [112] Huneck, S. (1999) The significance of lichens and their metabolites. *Die Naturwissenschaften*, 86, 559-570.
- [113] Oksanen, I. (2006) Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 73, 723–734 DOI 10.1007/s00253-006-0611-3.
- [114] Stocker-Wörgötter, E. (2008) Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports*, 25, 188-200.
- [115] Culbertson, C.F., Elix, J.A. (1989) Lichen substances. Academic Press, London

- [116] Huneck, S. (2001) New results on the chemistry of lichen substances. In: W. Herz, H. Falk, G.W. Kirby, R.E. Moore (Eds.), Progress in the Chemistry of Organic Products. Springer, New York, 1-276.
- [117] Elix, J.A. (1996) Biochemistry and secondary metabolites. In: Nash TH , ed., Lichen Biology. Cambridge: Cambridge University Press, 154-180.
- [118] Armaleo, D., Zhang, Y., Cheung, S. (2008) Light might regulate divergently depside and depsidone accumulation in the lichen *Parmotrema hypotropum* by affecting thallus temperature and water potential. Mycologia, 100(4), 565–576. DOI: 10.3852/07-162R.
- [119] Armaleo, D., Sun, X., Culberson, C. (2011) Insights from the first putative biosynthetic gene cluster for a lichen depside and depsidone. Mycologia, 103(4), 741–754. DOI: 10.3852/10-335.
- [120] Dewick, P.M. (2002) Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. Wiley, Chichester.
- [121] Kwan, D.H., Schulz, F. (2011) The Stereochemistry of Complex Polyketide Biosynthesis by Modular Polyketide Synthases. Molecules, 16, 6092-6115,
- [122] Keller, N.P., Hohn, T.M. (1997) Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. Fungal Genetics and Biology, 21, 17-29.
- [123] Grube, M., Blaha, J., (2003) On the phylogeny of some polyketide synthase genes in the lichenized genus *Lecanora*. Mycological Research, 107, 1419-1426.
- [124] Shen, B. (2000). Biosynthesis of aromatic polyketides, in: Leeper FJ, Vederas JC (Eds), Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids. Springer, New York.
- [125] Schmitt, I., Martin, M.P., Kautz, S., Lumbsch, H.T. (2005) Diversity of non-reducing polyketide synthase genes in the Pertusariales (lichenized Ascomycota): A phylogenetic perspective. Phytochemistry, 66, 1241-1253.
- [126] Opanowicz, M., Blaha, J., Grube, M. (2006) Detection of paralogous polyketide synthase genes in Parmeliaceae by specific primers. Lichenologist, 38, 47-54.
- [127] Brunauer, G., Hager, A., Grube, M., Tuerk, R., Stocker-Worgotter, E. (2007) Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of *Xanthoria elegans* and cultured resynthesis stages. Plant Physiology and Biochemistry, 45, 146-151.

- [128] Valarmathi, R., Hariharan, G.N., Venkataraman, G., Parida, A. (2009) Characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from lichen *Dirinaria applanata*. *Phytochem.*, 70, 721–729.
- [129] Gagunashvili, A.N., Davidsson, S.P., Jonsson, Z.O., Andresson, O.S. (2009) Cloning and heterologous transcription of a polyketide synthase gene from the lichen *Solorina crocea*. *Mycol Res.*, 113, 354–363.
- [130] Wang, Y., Kim, J.A., Cheong, Y.H., Koh, Y.J., Hur, J.S. (2011) Isolation and characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from the lichen-forming fungus *Usnea longissima*. *Mycol Progress.* 11,75–83.
- [131] Yu, N. H., Kim, J. A., Jeong, M.H., Cheong, Y. H., Jung, J.S., Hur, J.S. (2013) Characterization of two novel non-reducing polyketide synthase genes from the lichen-forming fungus *Hypogymnia physodes*. *Mycol Progress.*, 12(3),519–524, DOI 10.1007/s11557-012-0858-2
- [132] Muggia, L., Grube, M. (2010) Type III polyketide synthases in lichen mycobionts. *Fungal biology*, 114,379-385.
- [133] Kim, J.A., Hong, S.G., Cheong, Y.H., Koh, Y.J., Hur, J.S. (2012). A new reducing polyketide synthase gene from the lichen-forming fungus *Cladonia metacorallifera*. *Mycologia.* 104(2), 362-70. doi: 10.3852/11-001.
- [134] Timsina, B.A., Sorensen, J.L., Weihrauch, D., Piercey-Normore, M.D. (2013) Effect aposymbiotic conditions on colony growth and secondary metabolite production in the lichen-forming fungus *Ramalina dilacerata*. *Fungal biology*, 117(11-12), 731-43.
- [135] Wang, Y., Wang, J., Cheong, Y.H., Hur, J.S. (2014) Three New Non-reducing Polyketide Synthase Genes from the Lichen-Forming Fungus *Usnea longissima*. *Mycobiology*, 42(1), 34-40.
- [136] Gagunashvili, A.N., Davidsson, S.P., Jonsson, Z.O., Andresson, O.S. (2009). Cloning and heterologous transcription of a polyketide synthase gene from the lichen *Solorina crocea*. *Mycol Res.*, 113, 354–363.
- [137] Chooi, Y.H, Stalker, D.M., Davis, M.A., Fujii, I., Elix, J.A., Louwhoff, S.H.J.J., Lawrie, A.C. (2008) Cloning and sequence characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from the lichen *Xanthoparmelia semiviridis*. *Mycological Research*, 112, 147–161.

- [138] Brunauer, G., Muggia, L., Stocker–Worgotter E., Grube, M. (2009) A transcribed polyketide synthase gene from *Xanthoria elegans*. Mycological Research, 113, 82–92
- [139] Schimming, O., Schmitt, I., Bode, H.B. (2016) Identification of the Sfp-Type PPTase EppA from the Lichenized Fungus *Evernia prunastri*. PLoS ONE 11(1), e0145624.
- [140] Brakhage, A.A. (2013) Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. Annual Review of Phytopathology, 43, 437-458.
- [141] Deduke, C., Timsina, B., Piercey-Normore, M.D. (2012) Effect of environmental change on secondary metabolite production in lichen-forming fungi. In: Young S., (Ed.) International Perspectives on Global Environmental Change. InTech, 197-230.
- [142] Dayan, F., Romagni, J.G. (2001) Lichens as a potential source of pesticides. Pesticide Outlook, 12, 229-232.
- [143] Asplund, J. (2011) Snails avoid the medulla of *Lobaria pulmonaria* and *L. scrobiculata* due to presence of secondary compounds. Fungal Ecology, 4, 356-358.
- [144] Vatne, S., Asplund, J., Gauslaa, Y. (2011) Contents of carbon based defense compounds in the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* vary along environmental gradients. Fungal Ecology, 4, 350-355.
- [145] Siddiqi, M.R., Hawksworth, D.L. (1982) Nematodes associated with galls on *Cladonia glauca*, including two new Species. The Lichenologist, 14, 175-184.
- [146] Emmerich, R., Giez, I., Lange, O.L., Proksch, P. (1993) Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. Phytochemistry, 33(6), 1389-1394.
- [147] Rundel, P.W. (1969) Clinal variation in the production of usnic acid in *Cladonia subtenuis* along light gradients. Bryologist, 72, 40–44.
- [148] Solhaug, K.A., Gauslaa, Y. (2004) Photosynthates stimulate the UV-B induced fungal anthraquinone synthesis in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. Plant, Cell, and Environment 27, 167–176.

- [149] Nybakken, L., Solhaug, K.A., Bilger, W., Gauslaa, Y. (2004) The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia*, 140, 211–216.
- [150] Gauslaa, Y., Solhaug, K.A. (2001) Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Oecologia* 126, 462–471.
- [151] Rancan, F., Rosan, S., Boehm, K. (2002) Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *J Photochem Photobiol B.*, 68, 133–139.
- [152] Ahmadjian, V., Jacobs, J.B. (1985) Artificial reestablishment of lichens. IV. Comparison between natural and synthetic thalli of *Usnea strigosa*. *Lichenologist*, 17, 149–165.
- [153] Hamada, N. (1991) Environmental factors affecting the content of usnic acid in the lichen mycobiont of *Ramalina siliquosa*. *Bryologist*, 94, 57–59.
- [154] Culberson, C.F., Culberson, W.L., Johnson, A. (1983) Genetic and environmental effects on growth and production of secondary compounds in *Cladonia cristatella*. *Biochem Syst Ecol.*, 11, 77–84.
- [155] Açıkgöz, B. (2011) *Ramalina* Cinsine Ait Bazı Liken Türlerinin rDNA ITS Dizi Analizine Göre Moleküler Filogenisi. Yüksek Lisans Tezi Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Ens.
- [156] www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)
- [157] Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997) The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882.
- [158] Hall, T. (2001) BioEdit version 5.0.6, North Carolina State University, Department of Microbiology, 1-192.
- [159] Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0, *Mol. Biol. Evol.* , 24(8), 1596–1599.
- [160] <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>
- [161] Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

- [162] Orange, A., James, P.W., White, F.J. (2001) Microchemical methods for the identification of lichens. British Lichen Society.
- [163] Culberson, C.F. (1972) Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *J Chromatogr*, 72,113–125.
- [164] Munzi, S., Pisani, T., Loppi, S. (2009) The integrity of lichen cell membrane as a suitable parameter for monitoring biological effects of acute nitrogen pollution. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 72(7), 2009-12.
- [165] Pirintsos, S.A., Munzi, S., Loppi, S., Kotzabasis, K. (2009) Do polyamines alter the sensitivity of lichens to nitrogen stress? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1331–1336.
- [166] Shwab, E. K., Keller, N. P. (2008) Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research.*, 112, 225-230.
- [167] Miadlikowska, J., Schoch, C.L., Kageyama, S. A., Molnar, K., Lutzoni, F., McCune, B. (2011) *Hypogymnia* phylogeny, including *Cavernularia*, reveals biogeographic structure. *The Bryologist*, 114(2), 392-400.
- [168] Culberson CF, Armaleo D (1992) Induction of a complete secondary-product pathway in a cultured lichen fungus. *Exp Mycol*, 16, 52–63.
- [169] McCune, B., Geiser, L. (2009) *Macrolichens of the Pacific Northwest*. Revised Edition. OSU Press, Corvallis, OR.
- [170] Spröte, P., Brakhage, A.A. (2007) The light-dependent regulator velvet A of *Aspergillus nidulans* acts as a repressor of the penicillin biosynthesis. *Arch Microbiol.*, 188(1), 69-79.
- [171] Stocker-Wörgötter E. (2001) Experimental studies of the lichen symbiosis: DNAanalyses, differentiation and secondary chemistry of selected mycobionts, artificial resynthesis of two- and tripartite symbioses. *Symbiosis*. 30, 207-227.
- [172] Bjerke, J.W., Dahl, T., (2002) Distribution patterns of usnic acidproducing lichens along local radiation gradients in West Greenland. *Nova Hedwigia* 75, 487–506.
- [173] Cordeiro, L.M.C., Marcello, I. Stocker-Wörgötter, E. (2004) Culture studies and secondary compounds of six *Ramalina* species. *Mycol. Res.*, 108 (5), 489–497.

- [174] Wang, Y., Kim, J.A., Cheong, Y.H., Koh, Y.J., Hur, J.S. (2012) Isolation and characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from the lichen-forming fungus *Usnea longissima*. Mycol Progress, 11, 75–83.
- [175] Uçarkuş, E. (2017) Bolu-Aladağlar bölgesinden toplanan liken türlerinin *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing mekanizması ve biyofilm formu üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Ens.
- [176] Molnar, K., Farkas, E. (2011) Depsides and depsidones in population of the lichen *Hypogymnia physodes* and its genetic diversity. Ann. Bot. Fennici, 48, 473-482.
- [177] Fazio, A.T., Adler, M.T., Bertoni, M.D., Sepulveda, C.S., Damonte, E.B., Maier, M.S. (2007) Lichen secondary metabolites from the cultured lichen mycobionts of *Teloschistes chrysophthalmus* and *Ramalina celastri* and their antiviral activities. Zeitschrift für Naturforschung, 62(7-8): 543-549.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Birkan AÇIKGÖZ

Doğum Yeri ve Tarihi: Malatya / 1984

Unvanı: Uzman Biyolog, Biyoloji Öğretmeni

Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Öğretmenliği	Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi	2003-2008
Y. Lisans	Biyoloji Bölümü	Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Danışman: Yard. Doç. Dr. Gülşah ÇOBANOĞLU)	2008-2011
Doktora	Biyoloji Bölümü	Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Danışman: Doç. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU ve Doç.Dr. N. Cenk SESAL)	2011-2017

Görevler

Dönemi	Ünvan	Kurum	Bölüm
2007-2008	Stajyer Öğretmen	Marmara Üniversitesi	Çapa Anadolu Öğretmen Lisesi
2013-2014	Aday Öğretmen	Milli Eğitim Bakanlığı	Midyat Nene Hatun Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi
2014-2015	Öğretmen	Milli Eğitim Bakanlığı	Midyat Nene Hatun Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi
2015-devam ediyor	Öğretmen	Milli Eğitim Bakanlığı	Kartal Anadolu İmam Hatip Lisesi

Yayın Bilgileri

Yüksek Lisans Tezi

AÇIKGÖZ B. (2011) Ramalina Cinsine Ait Bazı Liken Türlerinin rDNA ITS Dizi Analizine Göre Moleküler Filogenisi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Ens.Yüksek Lisans Tezi, sf:91.

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanmış

ÇOBANOĞLU G., AÇIKGÖZ B. & BALONI L. (2013). Contributions to lichen diversity of Turkey from Sarısu county (Kocaeli). Turkish Journal of Botany 37: 964-969. (SCI-exp)

AÇIKGÖZ B., KARALTI İ., ERSÖZ M., COŞKUN M.Z., ÇOBANOĞLU G., SESAL C. (2013). Screening of Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Two *Cladonia* Species. Z. Naturforsch. 68c: 191-197. (SCI-exp)

COSKUN Z.M. , ERSOZ M., ACIKGOZ B., KARALTI I., COBANOGU G., SESAL C. (2015) Anti-proliferative and apoptotic effects of methanolic extracts from different *Cladonia* species on human breast cancer cells. Folia Biologica (Praha) 61, 97-103.

COBANOGU G., SESAL C., ACIKGOZ B., KARALTI 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.

SEAL C., ÇOBANOĞLU G., KARALTI İ. and AÇIKGÖZ B. (2016). *In Vitro* antimicrobial potentials of four *Ramalina* lichen species from Turkey. Current Research in Environmental & Applied Mycology 6 (3): 202–209.

Ulusal Hakemli Dergide Yayınlanmış

ÇOBANOĞLU G., SEVGİ E., SEVGİ O., TECİMEN H. B., YILMAZ O.Y., AÇIKGÖZ B. (2011) Alaçam Dağları Karaçam Ormanlarının Epifitik Likenleri (Balıkesir - Kütahya). Journal of the Faculty of Forestry, Istanbul University 2011, 61 (1): 31-37.

SEAL N.C., KARALTI İ., DİNGİLYAN B., KAYHAN F.E., AÇIKGÖZ B. (2011). Caddebostan (İstanbul) Rekreasyon Alanlarındaki Fekal Kirlilik İndikatörü *Enterococcus* spp. Bakterilerinin Klasik ve Moleküler Yöntem ile Belirlenmesi. Ekoloji. Sayı 80. Cilt 20 sf 74-80. (SCI-exp)

Ulusal Hakemsiz Dergilerde Yayınlanmış

CEYLAN Y., AÇIKGÖZ B., ÇOBANOĞLU G. (2013). Liken Büyüme Hızındaki Farklılıkların Likenometrik Ölçüm Yöntemiyle İzlenmesi ve Etkenlerin Değerlendirilmesi- Follow-up of Differences in Lichen Growth Rate with Lichenometric Measurement Method and Evaluation of Factors. Liken Araştırmaları Derneği (LİKAD) Bülteni, Sayı 2: 10-16.

Uluslararası Konferanslarda Sunulan Tam Metni Yayınlanmış

ÇOBANOĞLU G., YAVUZ M., COSTACHE I., RADU I., AÇIKGÖZ B., BALONIU L. (2009) Epiphytic and Terricolous Lichens Diversity In Cozia National Park (Romania) The Department of The Sciences of Nature of The Museum of Oltenia, Craiova, Romania. Muzeul Olteniei Craiova. Oltenia XXV: 17-22.

Uluslararası Konferanslarda Sunulan Tebliğler

AÇIKGÖZ B., BALONIU L., ÇOBANOĞLU G., YAVUZ M., COSTACHE I., RADU I. (2009) Terricolous Lichens Diversity In Cozia National Park (Romania). The Scientific International Conference 24-26 September 2009 Craiova / Romanya (Sözlü Sunum)

Ulusal Konferanslarda Sunulan Tebliğler

AÇIKGÖZ B., GÖKMEN B. (2008) Bitkilerin Kuzeye Göçü. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2008, Trabzon (Poster).

ERSÖZ M., COŞKUN Z.M., ÇOBANOĞLU G., AÇIKGÖZ B., SESAL C., ALTUĞ T. (2011). *Cladonia rangiformis*, *Cladonia convoluta* ve *Cladonia pocillum* Liken Türlerinin MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptotik Etkileri. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi, Ekim 27-30 2011, Antalya, Poster no.0144.

COSKUN Z.M. , ERSOZ M., ACIKGOZ B., KARALTI I., COBANOGU G., SESAL C. (2014) Cytotoxic, Anti-Proliferative and Anti-Microbial Activities of Extract From *Cladonia Pocillum*. IFCC Worldlab Istanbul 2014, 22-26 June 2014, Istanbul, Turkey, Cod: 0186.

ERSOZ M., COSKUN Z.M., ACIKGOZ B., KARALTI I., Cobanoglu G., SESAL C. (2014) Anti-Proliferative and Cytotoxic Effects of Methanolic Extracts From *Cladonia rangiformis* and *Cladonia convoluta* on MCF-7. IFCC Worldlab Istanbul 2014, 22-26 June 2014, Istanbul, Turkey, Cod: 0200.

AÇIKGÖZ B., ÇOBANOĞLU G., BAKIR Y., SESAL C. (2012). *Ramalina* (Ramalinaceae, liken oluşturan Ascomycetes) Cinsine Ait Bazı Liken Türlerinin rDNA ITS Dizi Analizine Göre Moleküler Filogenisi, 3-7 Eylül 2012, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, Poster no.PB-182, Özet kitabı s.595.

CEYLAN Y., AÇIKGÖZ B., ÇOBANOĞLU G. (2012). Likenlerin Gelişimi ve Büyüme Hızının Üzerinde Ekolojik Faktörlerin Etkisinin Likenometrik Yöntemlerle Değerlendirilmesi, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Poster no.PB-183, Özet kitabı s.596.

AÇIKGÖZ B., KARALTI İ., ERSÖZ M., COŞKUN M.Z., ÇOBANOĞLU G., SESAL C. Screening of Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Two *Cladonia* Species. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Poster no.PG-165.

KEKEÇ Ö., AÇIKGÖZ B., ŞAHİN A. E., ÖNER ÖZDAŞ D., SESAL C. (2014) Diş Üzerinde Oluşan Dental Plakın Elektrikli-Ultrasonik Diş Fırçaları Kullanılarak Uzaklaştırılması. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi. 23-27 Haziran 2014, Eskişehir

Proje Deneyimi

"Cozia Milli Parkı'nın (Romanya) Epifitik ve Terrikol Liken Çeşitliliği". Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (Yürütücü: Gülşah ÇOBANOĞLU). Proje No: FEN-D-040609-0180, Araştırmacı, 2009-2010.

"*Ramalina* Cinsine ait Bazı Liken Türlerinin rDNA ITS Dizi Analizine Göre Moleküler Filogenisi". Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (Yürütücü: Gülşah ÇOBANOĞLU). Yüksek Lisans Projesi Proje No: FEN-C-YLP-171209-0341, Araştırmacı, 2009-2011.

"*Cladonia*, *Ramalina*, *Usnea* Cinsi Likenlerin Farklı Koşullardaki Bazı Türlerinin Antimikrobiyal, Antifungal ve Antioksidan Etkilerindeki Değişimlerin Saptanması". Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (Yürütücü: Gülşah ÇOBANOĞLU). Proje No: FEN-A-200611-0208, Araştırmacı, 2011-2014.

"*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* Bakterilerinin ZnO, TiO₂, CuO ve SnO₂ Nano-Parçacık ve Ultrason Kullanılarak Öldürülmesi." Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (Yürütücü: Cenk SESAL). Proje No: FEN-B-130612-0222, Araştırmacı, 2012-2014.

"*Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. Liken Türüne ait Sekonder Metabolitlerin Sentezinde Görevli Poliketid Sentez (PKS) Genlerinin Ekspresyonlarının İncelenmesi" Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (Yürütücü: Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU). Proje No: FEN-B-120514-0154. Araştırmacı, 2014-devam ediyor.

"Bazı Liken Sekonder Metabolitlerin Sentezinde Poliketid Sentez (PKS) Genlerinin ve Ekspresyonlarının Potansiyel Etkilerinin Belirlenmesi" Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (Yürütücü: Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU). Proje No: FEN-C-DRP-100914-0337, Araştırmacı, 2014-devam ediyor.

Etnobotanik Değere Sahip Liken Türlerinin Mikobiyont Özütlerinin *Pseudomonas aeruginosa* Üzerinde Quorum Sensing İnhibisyon Özelliklerinin Araştırılması (Yürütücü: Cenk SESAL). FEN-A-070317-0108

Liken Kültürü Yöntem ve Uygulamaları Çalıştayı (Yürütücü: Cenk SESAL). FEN-L-080715-0336