

***Lentinus edodes*, *Lactarius deliciosus* ve *Ganoderma lucidum*'un antibiyofilm ve antimikrobiyal etkinlikleri**

Başar KARACA*, Ilgaz AKATA, Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Ankara University, Fen Fakültesi, Ankara, 06100, Türkiye.

*Sorumlu yazar: karaca@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: 06.12.2016

Kabul Tarihi: 11.10.2017

Özet

Çalışmanın amacı: Bu çalışma kapsamında tıbbi önemi olan üç makrofungus türünün [(*Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake), *Lactarius deliciosus* Fr. ve *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.)] metanolik (%60) ve etanolik (%95) özütlerinin *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella Typhimurium*'daki antibakteriyel ve biyofilm oluşumunu engelleme (antibiyofilm) potansiyelleri araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem: Antimikrobiyal aktivitelerin değerlendirilmesinde standart agar kuyu difüzyon, minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) testleri kullanılmıştır. Makrofungus özütlerinin biyofilm oluşumu üzerine (antibiyofilm) olan etkilerinin değerlendirmesinde kristal viyole bağlanma yöntemi esas alınmıştır.

Temel sonuçlar: Makrofungus örneklerinin yalnızca metanolik özütlerinde antimikrobiyal etkinlik saptanmıştır. Antibiyofilm aktivite değerlendirmesinde en yüksek aktivite *G. lucidum*'da görülmüştür.

Araştırma vurguları: Elde edilen bulgular, doğal antimikrobiyal ajanların araştırılmasında sıklıkla tercih edilen tıbbi makrofungus türlerinin, biyofilmlerle mücadele araştırmalarında da yüksek potansiyel içermelerinden ötürü tercih edilebileceklerini kanıtlar mahiyetindedir.

Anahtar Kelimeler: Makrofungus, Biyofilm, Antimikrobiyal, Antibiyofilm

Antimicrobial and antibiofilm activities of *Lentinus edodes*, *Lactarius deliciosus*, and *Ganoderma lucidum*

Abstract

Aim of study: In this study, the antimicrobial and antibiofilm potentials of methanolic (60%) and ethanolic (95%) extracts of three medicinal macrofungi species [(*Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake), *Lactarius deliciosus* Fr., and *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.)] on *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella Typhimurium* were investigated.

Material and Methods: Standart agar well diffusion, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration tests were performed to evaluate the antimicrobial activities. The effects of macrofungi extracts on biofilm formation (antibiofilm) were evaluated based on crystal violet binding assay.

Main Results: Antimicrobial and antibiofilm activities were determined only in methanolic extracts of macrofungi samples. The highest antibiofilm activity was observed in *G. lucidum* methanolic extract.

Research highlights: Obtained findings proved that the medicinal macrofungi species frequently preferred in the investigation of natural antimicrobial agents, and could be preferred for surveys of biofilm control due to their high potentials.

Keywords: Macrofungi, Biofilm, Antimicrobial, Antibiofilm



Giriş

Bazı makrofungus türlerinin antibakteriyal, antifungal, antiviral ve antiprotozoal özellik gösteren çeşitli kimyasal bileşenlere sahip oldukları belirlenmiştir. Makrofunguslar, buldukları ortamda varlığını sürdürebilmek ve çevresindeki rekabetçi türlere üstünlük sağlayabilmek adına bu tür kimyasal bileşenlere ihtiyaç duymaktadır (Solak ve ark., 2006). Makrofungusların geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip oldukları gerçeği dikkate alınarak, günümüzde ilaçlara alternatif olabilmeleri için yabancı türlerinin kültüre alınabilmesinin yanı sıra aktif bileşiklerinin izolasyon ve tanımlanmasına yönelik yeni çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Üstün, 2011).

Antibiyotiklere karşı geliştirilen yüksek direnç dikkate alındığında, yeni antimikrobiyal ürünlerin araştırılmasındaki gereksinim kaçınılmazdır. Bakteriyal, viral ve fungal hastalıklar, özellikle gelişmekte olan ülkelerin toplumlarını ciddi ölçüde tehdit etmektedir (Cos ve ark., 2006). Doğal ürünler, enfeksiyon hastalıkları da dahil olmak üzere çeşitli koşullar için bazı tedavi edici ajanları içermeleri bakımından potansiyellere sahiptir (Clardy ve Walsh, 2004).

Enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların tamamen yok edilmesi, öncelikli bir tedavi stratejisidir. Bu strateji çoğunlukla mikroorganizmaların temel yaşam süreçlerini hedefleyen yaygın antimikrobiyal ajanlarla gerçekleştirilmektedir. Ancak, artan antimikrobiyal dirençlilik ve bu duruma bağlı olarak yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi zarureti bu strateji için kısıtlayıcı unsurlardır. Üstelik öldürücü ya da gelişimi engelleyici bu tür ajanların uygulanması bakteri popülasyonlarındaki dirençlilik genleri üzerinde seçici baskı yaratmaktadır (Clatworthy ve ark., 2007; Hawkey, 2008; Spellberg ve ark., 2008; Boucher ve ark., 2009). Enfeksiyon etkeni olan mikroorganizmaların konakçı içerisindeki ya da dışarısındaki çevrelerde biyofilm üretebilmeleri de enfeksiyonun tedavisini oldukça güçleştirmektedir (Wilkins ve ark., 2014).

Antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra bazı doğal ürün özütlerinin biyofilm oluşumunu

engellediği bilinmektedir. Ancak yaygın kullanımı olan antimikrobiyal ajanlara karşı biyofilmlerdeki bakterilerin planktonik fazdaki bakterilere kıyasla çok yüksek dirençlilik göstermesi; abiyotik ya da biyotik yüzeylerin mikrobiyal kolonizasyonu ile birlikte biyofilm yapısındaki bakteriler için doğal bir fizikokimyasal bariyer tesis eden hücre dışı polimerik bileşenlerin çok yoğun bir şekilde üretilmesiyle, antimikrobiyal ajanların penetrasyonunun azalmasıyla, biyofilm içerisindeki bakterilerin olası sinerjistik etkileşimleriyle, antimikrobiyal dirençlilik determinantlarının yatay gen aktarım mekanizmalarıyla, genotipik ve fenotipik çeşitliliğin artmasıyla mümkün olmaktadır (Carson ve ark., 2009). Biyofilmlerle mücadelede yaygın antimikrobiyal terapilerin bazı durumlarda yetersiz kalışı, araştırmacıları başta doğal olmak üzere yeni antimikrobiyal ajanların keşfedilmesine ve tanımlanmasına yönlendirmektedir (Buommino ve ark., 2014).

Tıbbi önemi olan bazı makrofungus türlerinin antimikrobiyal çalışmalarda saptanan potansiyeller kadar biyofilmlerle mücadele konulu araştırmalar için de yüksek bir potansiyel ihtiva etmeleri kaçınılmazdır. Ancak ilgili konuda tıbbi makrofungus türleriyle yapılan çalışmalar literatürde henüz çok kısıtlıdır. Mevcut potansiyele *Coprinus comatus*'tan izole edilen ve fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*'da yeter sayı algılama (quorum sensing) sinyalizasyonunu bloke eden "coprinuslaktone" ve *Agaricus blazei*'nin sulu özütünün yine *P. aeruginosa*'da yeter sayı algılama mekanizmasını inhibe ederek biyofilm oluşumunu engellemesi örnek verilebilir (Carvalho ve ark., 2016). Bir başka kapsamlı çalışmada *Russula delica*, *Fistulina hepatica*, *Mycena rosea*, *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* ve *Lepista nuda* gibi makrofungus türlerinin özütlerinin *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Proteus mirabilis* gibi patojenlerin biyofilmleri üzerinde inhibe edici etki gösterdiği saptanmıştır (Alves ve ark., 2014). *Auricularia auricula* türünden izole edilen melaninin *E. coli* K-12, *P. aeruginosa* PAO1 ve *Pseudomonas fluorescens* P-3 gibi bazı

önemli bazı patojen suşların biyofilm gelişimlerini inhibe edici mahiyette etkiler içerdiği rapor edilmiştir (Bin ve ark., 2012). *L. edodes*'in esansiyal yağ içeriğinin ve homejenatının *Streptococcus mutans*, *Fusabacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* ve *Prevotella intermedia* gibi bazı oral patojenlerin biyofilmlerini inhibe ettiği bilinmektedir (Solmaz ve ark., 2013; Signoretto ve ark., 2014).

Günümüzde biyofilmler çok çeşitli kronik enfeksiyonların nedeni olarak kabul edilmektedir. Bu nedenlerin başlıcalarından biri olan *Salmonella* cinsi; insanlarda, hayvanlarda ve kanatlılarda hastalıklara neden olan önemli bir enteropatojendir. *Salmonella* bulaşısı genellikle fekal-oral yolla gerçekleşmekte ve insanlarda en yaygın gıda kaynaklı hastalık olan Salmonellozun ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Veldman ve ark., 2011). Dünya sağlık örgütünün (WHO) verileri değerlendirildiğinde, dünyada her yıl binlercesi ölümle sonuçlanan Salmonelloz vakası ortaya çıkmaktadır (Url1). Bir enfeksiyon etkeni olarak *Salmonella*, insan konakçılarda safra taşlarının üzerinde biyofilm oluşturmak suretiyle asemptomatik olarak hayatta kalmaya devam edebilmektedir. Bu nedenle asemptomatik konakçılarda antibiyotik uygulamasıyla patojenin yok edilmesi çoğu kez yetersiz bir uygulama olmaktadır (Prouty ve Gunn, 2003).

P. aeruginosa, nozokomiyal enfeksiyonlarda, özellikle kistik fibrozisli hastaların büyük bir çoğunluğunda kronik akciğer enfeksiyonuna neden olan ve antibiyotik terapileri ile biyofilm arasındaki ilişkinin açıklanmasında kullanılan model mikroorganizmadır. Kistik fibrozisli hastalarda *P. aeruginosa* 'nın neden olduğu akciğer enfeksiyonlarında biyofilm oluşumu önem taşımaktadır ve bu hastalarda erken yaşlardan itibaren tekrarlayan ve kronik enfeksiyonlara bağlı olarak sıklıkla ve uzun süreli antibiyotik tedavisinin uygulanması söz konusudur (Karaman ve ark., 2013).

Tıbbi önemi olan mantar türlerinin, önem arz eden patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra antibiyofilm etkilerinin de araştırılması biyofilmlerle mücadelede özgün yaklaşımların geliştirilmesi ihtimalini

düşündürmektedir. Özellikle enfeksiyon hastalıklarının sağaltımında biyofilmlerin önemi yeni anlaşıldığından farmosötik endüstrisi tarafından geliştirilen ve özgül olarak biyofilmleri hedefleyen bir antimikrobiyal ajan henüz bulunmamaktadır. Bunun da ötesinde mevcut birçok antimikrobiyale karşı mikroorganizmaların dirençlilik geliştirmesi, klinik öncesi prosedürlerden ötürü yeni antibiyotiklerin piyasaya sürülmesindeki kısıtlayıcı koşullar, antimikrobiyal ajanların tasarlanmasının ve geliştirilmesinin yanında, yeni antibiyofilm stratejilerinin de geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu bağlamda çalışma dâhilinde tıbbi önemi olan üç makrofungus türünün antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerinin araştırılması ve biyofilmlerle mücadelede etkin stratejilerin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Makrofungus örnekleri

Çalışmada antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerin değerlendirilmesi için *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake) ve *Ganoderma lucidum* örneklerinin kültür formları kullanılmıştır (Agromamantar, Denizli, Türkiye). *Lactarius deliciosus* Fr. örneği, mantar pazarından temin edilmiş (Bolu, Türkiye) ve teşhis işlemi Doç. Dr. İlğaz AKATA tarafından yapılmıştır.

Mikroorganizmalar

Antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerin araştırılmasına yönelik çalışmalarda; *P. aeruginosa* DSMZ 50071 ve *S. Typhimurium* SL1344 suşları kullanılmıştır. Söz konusu suşlar, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir.

Yöntem

Makrofungus örneklerinin özütleme

Kuru haldeki makrofungus örneklerinin özütleme %60'lık metanol (Sigma, Almanya) ve %95'lik etanol (Sigma, Almanya) ile yapılmıştır. Özütleme protokolü, kuru ve toz haldeki (20 gr) makrofungus örnekleri için 200 ml %60'lık metanol ve %95'lik etanol içerisinde

30°C’de çalkalamalı koşullarda (150 rpm/dakika) 24 saat boyunca uygulanmıştır. Elde edilen metanolik ve etanolik özütler Whatman No.4 filtre kağıtları kullanılarak süzümüştür. Özütler daha sonra liyofilize edilmiştir (Edwards, Birleşik Krallık). Liyofilize özütler daha sonra antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerin değerlendirileceği çalışmalarda kullanılmak üzere distile su içerisinde çözülmüş ve 0.22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiştir (400 mg/mL) ve -20°C’de muhafaza edilmiştir (Türkoğlu ve ark., 2007).

Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal aktivite denemeleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003) standartları esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Denemelerin ilkinde kuyu difüzyon yöntemi esas alınmıştır. Bu aşamada bakteriyal suşlar Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerlerine (Merck, Almanya) inoküle edilmiş ve 37°C’de 24 saat süresince geliştirilmiştir. İnkübasyon bitiminde agar yüzeylerinden alınan koloniler Mc Farland no. 0.5 standardı referans alınarak %85’lik fizyolojik serum içerisinde süspanse edilmiştir. Hazırlanan süspanسیونlardan 100’er µl alınarak MHA yüzeylerine damlatılmış ve yayma plak yöntemiyle yayılmıştır. Kurutulan petri yüzeylerine steril kuyu açma aparatıyla (R: 9 mm) kuyular açılmıştır. Açılan kuyulara makrofungus örneklerinin etanolik/metanolik özütlerinden (10 ve 100 mg/ml derişimlerde) ve DMSO’dan 50’şer µl, 3 paralelli olacak şekilde transfer edilmiştir. Petriler 37°C’de 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde inhibisyon zon çapları “mm” cinsinden ölçülmüştür. Minimum inhibisyon konsantrasyon testi (MİK) için bakteriyal inokülüm hazırlığı daha önce açıklandığı şekliyle yapılmıştır. Makrofungus özütlerinin derişimleri, 100 µl Mueller-Hinton sıvı besiyeri içeren kuyularda 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.12 mg/ml olacak şekilde seri sulandırma işlemi yapılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan inokülüm süspanسیونlarından kuyulara 10’ar µl transfer edilmiştir. Her bir özüt derişimi için 3 paralel hazırlanmıştır. Pozitif kontrol

olarak özüt içermeyen ancak inokülüm içeren kuyular; negatif kontrol olarak özüt ve inokülüm içermeyen kuyular hazırlanmıştır. Plakalar 37°C’de 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde mikrobiyal gelişimin olmadığı ilk kuyular “MİK değeri” olarak saptanmıştır. MİK değerleri saptandıktan sonra farklı derişimlerde özüt içeren kuyulardan örnek alınarak bir seri sulandırma yapılmış (10-kat) ve bu sulandırmalardan Triptik Soya Agar besiyerlerine (Merck, Almanya) damla plak yöntemiyle inokülasyon yapılmıştır. İnoküle edilen petrilerden daha sonrasında koloni sayımı yapılmış ve bakteriyal koloni sayıları hesaplanarak ve pozitif kontrol örneklerinin sayım sonuçlarıyla kıyaslanarak logaritmik yüzde azalmalar saptanmıştır. Log-3 (% 99.9) azalma saptanan derişim değerleri, minimum “bakterisidal derişim değeri (MBK)” değerleri olarak belirlenmiştir.

Makrofungus Özütlerinin Biyofilm Oluşumu Üzerine (Antibiyofilm) Etkileri

Deneyisel çalışma kapsamında öncelikli olarak her bir mikroorganizmanın optimum biyofilm üretim koşulları belirlenmiştir. *S. Typhimurium* SL1344 suşunun biyofilm üretimi için optimizasyon Vestby ve ark. (2009) önerdiği yöntem referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Yöntemde, biyofilm üretimini teşvik etmek adına düşük ozmolariteli (NaCl içermeyen) Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerinde bir gece boyunca çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) ve 37°C’de geliştirilen suş, inkübasyon bitiminde OD_{595nm}: 0.2’ye yine aynı besiyeri kullanılarak süspanse edilmiştir. Yoğunlukları ayarlanan süspanسیونdan 30’ar µl alınarak 100’er µl NaCl’siz LB besiyeri içeren ve inokülasyondan sonra son derişimleri sırasıyla 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.12 mg/ml olacak şekilde makrofungus özütü içeren kuyulara transfer edilmiştir. Test kuyularından farklı olarak negatif kontrol kuyuları, yalnızca belirtilen derişimlerde makrofungus özütü ve besiyeri içerirken; pozitif kontrol kuyuları yalnızca besiyeri ve inokülüm içermektedir. İnokülasyondan sonra plakalar 20°C’de 24 saat süresince statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. *P. aeruginosa* DSMZ 50071

suşunun biyofilm üretim koşulları, O'Toole ve ark. (1999) tarafından önerilen yaklaşım modifiye edilerek belirlenmiştir. Modifikasyon, *S. Typhimurium* SL1344 suşu için belirlenen inokülüm hazırlığı dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan plakalar 37°C'de 24 saat süresince statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde kuyular aseptik koşullarda aspire edilmiş, ve steril fizyolojik serum ile tutunmayan hücreleri uzaklaştırmak için yıkanmıştır. Oda koşullarında kurutulan plaka kuyularına fiksasyon için 130'ar µl %95'lik metanol (Merck, Almanya) transfer edilmiş ve plakalar 15 dakika süresince oda koşullarında inkübe edilmiştir. Bu aşamayı takiben kuyulardaki metanol boşaltılmış ve plakalar yine kurutulmuştur. Kuruyan plaka kuyularına %0.1'lik kristal viyole çözeltilisinden (Sigma, Almanya) 130'ar µl transfer edilmiş ve plakalar oda koşullarında 30 dakika süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyonundan sonra tutunmayan boyanın uzaklaştırılması için plakalar akan musluk suyunun altında yıkanmış ve kurutulmuştur. Kuruyan plaka kuyularına son olarak tutunan boyanın çözünmesi için 130'ar µl %33'lük glasiyel asetik asit (Merck, Almanya) transfer edilmiş ve plakalar 15 dakika inkübe edilmiştir. Çözünen boyayı içeren plakalar, 595 nm dalga boyunda Elisa okuyucusunda okutulmuştur (Biotek, İsviçre). İşlemler negative kontrol kuyuları (farklı derişimlerde makrofungus özütü içeren kuyular) ve pozitif kontrol kuyuları (inokülüm içeren; özüt içermeyen) için de uygulanmıştır. Negatif kontrol kuyularında elde edilen absorbands değerleri test kuyularından elde edilen absorbands değerlerinden çıkarılarak biyofilm üretim miktarları saptanmıştır (Stepanović, 2000; Vestby ve ark., 2009). Uygulanan makrofungus özütünün biyofilm üretimi üzerindeki etkisini (antibiyofilm) saptamak için pozitif kontrol kuyularından elde edilen değerler göz önünde bulundurularak, üretimdeki yüzde (%) azalma değeri kullanılmıştır. % Azalma; [(C-B)-(T-B)]/[(C-B)] formülü esas alınarak hesaplanmıştır (Pitts ve ark., 2003).

Bu formüle göre;

C: Yalnızca inokülüm içeren kuyular

B: Yalnızca besiyeri ve makrofungus özütü içeren kuyular

T: Mikroorganizmaların inokülümünü ve uygun derişimde makrofungus özütü içeren kuyular

Bulgular ve Tartışma

Antimikrobiyal aktivite bulguları

L. edodes, *L. delicious* ve *G. lucidum* makrofungus örneklerinden hazırlanan etanolik ve metanolik özütlerin (10 ve 100 mg/ml) iki farklı derişiminin agar kuyu difüzyon yönteminde uygulanması sonucunda belirlenen inhibisyon zon çapları Tablo 1'de verilmiştir. Her üç makrofungus örneğinin etanolik özütünde antimikrobiyal aktivite saptanmazken, metanolik özütlerin yüksek derişimlerinde (100 mg/ml) antimikrobiyal etkinlik saptanmıştır. MİK ve MBK test sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Belirtilen MİK ve MBK değerleri metanolik makrofungus özütleri kullanılarak elde edilmiştir.

Makrofungus özütlerinin biyofilm oluşumu üzerine olan etkileri

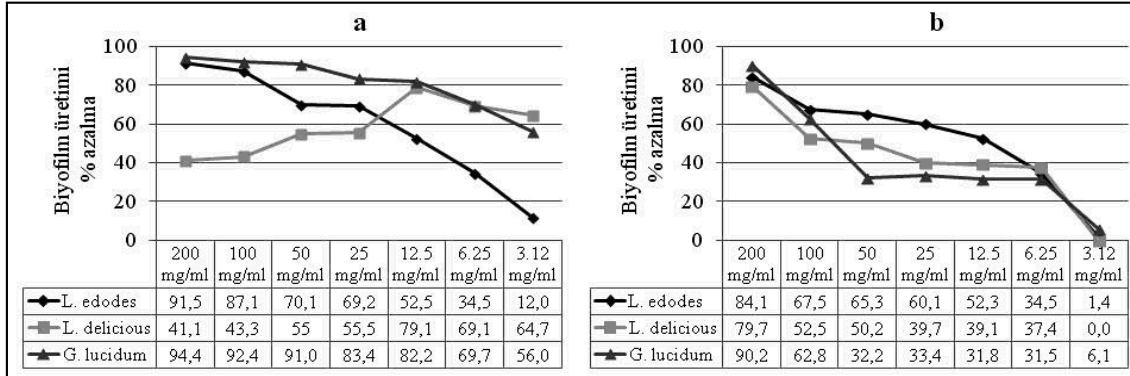
Antibiyofilm denemeleri antimikrobiyal etkinlik saptanan metanolik makrofungus özütleri kullanılarak yapılmıştır. Çalışılan derişim değerlerinde saptanan biyofilm üretim miktarlarındaki yüzde (%) azalma, Şekil 1a ve 1b'de verilmiştir. *S. Typhimurium*'da farklı makrofungus özütlerinin biyofilm üretimi üzerindeki etkilerine bakıldığında, *L. delicious*'un düşük derişimlerinin biyofilm oluşumunu inhibe ettiği saptanırken, *L. edodes* ve *G. lucidum* özütlerinin yüksek derişimlerde biyofilm oluşumunun inhibe olduğu saptanmıştır. *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumundaki inhibisyon ise her üç makrofungus türü için de yüksek derişimlerde görülmüştür. *G. lucidum* özütü, her iki suşun biyofilm üretiminin inhibe edilmesinde en yüksek etkinliği göstermiştir. *L. delicious* özütü ise diğer makrofungus türlerinin özütlerinden farklı olarak düşük derişim değerlerinde antibiyofilm etkinliği gösterebilmiş olmasına karşın görece daha düşük bir antibiyofilm etkinliği göstermiştir.

Tablo 1. Agar kuyu difüzyon test sonuçları (ortalama \pm standart sapma, "mm"; "--": inhibisyon yok).

Suş Adı	<i>L. edodes</i> % 60 Metanol		<i>L. delicious</i> % 60 Metanol		<i>G. lucidum</i> % 60 Metanol	
	10	100	10	100	10	100
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	-	14.60 \pm 0.66	-	11.17 \pm 0.76	-	16 \pm 1.0
<i>P. aeruginosa</i> DSMZ 50071	-	15.67 \pm 0.58	-	14.23 \pm 0.25	-	16.6 \pm 0.66

Tablo 2. MİK ve MBK test sonuçları (verilen MBK derişimlerinde bakteriyal popülasyonda %99.9'luk azalma saptanmıştır).

Suş adı	<i>L. edodes</i> (% 60 MetOH)		<i>L. delicious</i> (% 60 MetOH)		<i>G. lucidum</i> (% 60 MetOH)	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	200 mg/ml	200 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml
<i>P. aeruginosa</i> DSMZ 50071	200 mg/ml	200 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml

Şekil 1. a) Makrofungus özütlerinin *S. Typhimurium*'un biyofilm üretimi üzerine olan etkileri b) Makrofungus özütlerinin *P. aeruginosa*'nın biyofilm üretimi üzerine olan etkileri.

Biyofilm enfeksiyonlarının önlenmesinin ve sağaltımının güç olduğu kanısı günümüzde kabul gören bir durumdur. Biyofilmlerin son derece heterojen bir yapıya sahip olduklarıyla ilgili elde edilen güncel bulgular, planktonik fazdaki mikroorganizmaların yok edilmesinde kullanılan tedavi stratejilerinden farklı olarak yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gereksinimini doğurmaktadır. Yeni antimikrobiyal ajanların yaygın antibiyotiklerle sinerjistik kullanımı, biyofilm yapılarının zayıflatılmasını ve biyofilmlerdeki farklı alt popülasyonların hedeflenmesini daha mümkün kılmaktadır.

Salmonella serovarları dünya genelindeki gıda kaynaklı hastalıklara neden olan etkenlerin başında gelmektedir. *Salmonella* serovarlarının çoğu çeşitli doğal, endüstriyel, klinik ve konakçı çevrelerde gelişebilecek ve hayatta kalabilecek birçok stratejiye sahiptir. Dünya genelinde alınan önlemler ve kontrol uygulamalarına rağmen gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları halk sağlığını tehdit etmeye devam etmektedir. Gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olan etkenler arasında *Salmonella* ilk sıralardaki yerini korumakta, binlerce kişinin etkilendiği ve ölümlerle sonuçlanan salgınlara neden olmaktadır. *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* dünya çapında en sık karşılaşılan serotiplerdir. *Salmonella*'nın sosyal ve ekonomik açıdan önemi, 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren salgınların sayısındaki artış, bilinenlerin yanında değişik gıdaların neden olduğu vakaların ortaya çıkması ve bunlara ek olarak *Salmonella*'nın antibiyotiklere geliştirdiği direnç sonucu giderek artmıştır. Tedavi masrafları dışında bilindiği gibi iş gücü kaybı, hayvan ve ürün kayıpları da önemli bir yere sahiptir. Bilinçsiz ilaç kullanımı, gelişmeyi artırıcı ve koruyucu amaçla düşük doz antibiyotik uygulanması gibi faktörlere bağlı olarak gelişen ve *Salmonella* serotiplerinde de giderek artan antibiyotik dirençliliği bir diğer önemli sorundur (Url1).

P. aeruginosa, kistik fibröz hastalarının akciğerlerinde biyofilm oluşturarak eradike edilmesi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır. *P. aeruginosa*'nın konakçı içerisinde maruz kaldığı konakçı immün yanıtı ve antibiyotik baskısı gibi faktörler

biyofilm yanıtının artmasına neden olabilmektedir. Konakçı içerisinde *P. aeruginosa* bir kez biyofilm oluşturduğunda fagositler, reaktif oksijen türleri ve antimikrobiyal terapi gibi etkenler biyofilmin yok edilmesinde yetersiz kalmaktadır. Söz konusu durum, *Pseudomonas* enfeksiyonlarının sağaltımı için araştırmaları sürekli yeni terapötik ajanların keşfine yönelik çalışmalar yapmaya yönlendirmektedir (Fuente-Núñez ve ark., 2013). Yeni antibiyofilm stratejilerinin geliştirilmesi bugün birçok araştırmacının odaklandığı disiplinler arası yaklaşımları gerektiren son derece güncel bir konudur. Biyofilmlerin yok edilmesine yönelik literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların bazıları hem yaygın kullanımı olan stratejilerin biyofilmler üzerindeki etkilerinin araştırılmasına yönelik hem de yaygın tedavi stratejilerinin biyofilmlerle mücadelede çoğu noktada yetersiz olabilmesinden ötürü yeni stratejilerin geliştirilmesine yöneliktir. Yeni ve etkin stratejilerin geliştirilmesinde başta doğal ürünlerin içerdiği yüksek biyolojik aktiviteye sahip bileşenlerin değerlendirilmesi umut vaat edici sonuçlar doğurmaktadır.

Tıbbi önemi olan makrofungus türlerinin bu yönde değerlendirilmesine ilişkin çalışmalar literatürde az sayıda bulunmakla beraber (Bin ve ark., 2012; Solmaz ve ark., 2013; Petrović ve ark., 2014; Signoretto ve ark., 2014; Soković ve ark., 2014; Alves ve ark., 2014; Carvalho ve ark., 2016), bu çalışma dahilinde kullanılan tıbbi mantar türlerinin ilgili patojen suşlar üzerindeki antibiyofilm etkilerine yönelik bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu bağlamda çalışmadan elde edilen verilerin literatüre mühim katkılar sağlayacak mahiyette olması beklenmektedir. Üstelik tıbbi önemi olan bu makrofungus türlerinde antibiyofilm etkinliğinin saptanmış olması bu araştırma sahasında daha ileri çalışmaların başlatılmasına ön ayak olabilecek niteliktedir. Ayrıca yeni antibiyofilm stratejilerinin geliştirilmesinin yanı sıra çalışmanın *Salmonella* ve *Pseudomonas* suşları ile yürütülmüş olması, bu suşlarda sıklıkla görülen antibiyotik direnç paternlerinin sirayetinin önüne geçilmesinde alternatif ve tamamlayıcı klinik yaklaşımların

geliştirilmesine imkan tanıyacaktır. Zira tüm dünyada alternatif tıbbi yönelim, özellikle antibiyotik dirençli suşların neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının sağaltımında, gün be gün artmaktadır. Üstelik tıbbi önemi olan makrofungus türlerinin çalışma kapsamında değerlendirilmiş olması, klinik kullanımı olan mevcut antibiyotiklerin *Salmonella* ve *Pseudomonas* suşları ile ilişkili enfeksiyonlarda tercih edilmesinde yüksek dozlama stratejilerinin yerine tercih edilmesine imkan tanıyabilecektir

Kaynaklar

- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Lourenço, I., Costa, E., Martins, A., & Pintado, M. (2014). Wild mushroom extracts as inhibitors of bacterial biofilm formation. *Pathogens*, 3(3), 667-679.
- Bin, L., Wei, L., Xiaohong, C., Mei, J., & Mingsheng, D. (2012). In vitro antibiofilm activity of the melanin from *Auricularia auricula*, an edible jelly mushroom. *Annals of microbiology*, 62(4), 1523-1530.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., ... & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1), 1-12.
- Buommino, E., Scognamiglio, M., Donnarumma, G., Fiorentino, A., & D'Abrosca, B. (2014). Recent advances in natural product-based anti-biofilm approaches to control infections. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 14(14), 1169-1182.
- Carson, L., Chau, P. K., Earle, M. J., Gilea, M. A., Gilmore, B. F., Gorman, S. P., ... & Seddon, K. R. (2009). Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Green Chemistry*, 11(4), 492-497.
- Clardy, J., & Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature*, 432(7019), 829.
- Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology*, 3(9), 541-548.
- CLSI. (2003). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard Seventh Edition*, CLSI Document M7-A7, Pennsylvania: USA.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.
- de Carvalho, M. P., Gulotta, G., do Amaral, M. W., Lünsdorf, H., Sasse, F., & Abraham, W. R. (2016). Coprinus lactone protects the edible mushroom *Coprinus comatus* against biofilm infections by blocking both quorum-sensing and MurA. *Environmental microbiology*, 18(11), 4254-4264.
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., & Hancock, R. E. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current opinion in microbiology*, 16(5), 580-589.
- Hawkey, P. M. (2008). The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(suppl_1), i1-i9.
- Karaman, M., Firinci, F., Ayyıldız, Z. A., & Bahar, İ. H. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında İmipenem, Tobramisin ve Curcuminin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi. *Mikrobiyol Bul*, 47(1), 192-194.
- O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B., & Kolter, R. (1999). [6] Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in enzymology*, 310, 91-109.
- Petrović, J., Glamočlija, J., Stojković, D., Nikolić, M., Ćirić, A., Fernandes, A., ... & Soković, M. (2014). Bioactive composition, antimicrobial activities and the influence of *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Food & function*, 5(12), 3296-3303.
- Pitts, B., Hamilton, M. A., Zelter, N., & Stewart, P. S. (2003). A microtiter-plate

- screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of microbiological methods*, 54(2), 269-276.
- Prouty, A. M., & Gunn, J. S. (2003). Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and immunity*, 71(12), 7154-7158.
- Signoretto, C., Marchi, A., Bertocelli, A., Burlacchini, G., Papetti, A., Pruzzo, C., ... & Spratt, D. A. (2014). The anti-adhesive mode of action of a purified mushroom (*Lentinus edodes*) extract with anticaries and antigingivitis properties in two oral bacterial pathogens. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 75.
- Solak, M. H., Kalmis, E., Saglam, H., & Kalyoncu, F. (2006). Antimicrobial activity of two wild mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. and *Rhizopogon roseolus* (Corda) TM Fries collected from Turkey. *Phytotherapy Research*, 20(12), 1085-1087.
- Solmaz, G., Ozen, F., Ekinci, Y., Bird, P. S., & Korachi, M. (2013). Inhibitory and disruptive effects of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) essential oil extract on oral biofilms. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(9).
- Spellberg, B., Guidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H. W., Scheld, W. M., ... & Infectious Diseases Society of America. (2008). The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 46(2), 155-164.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.
- Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., & Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(1), 267-273.
- Url:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>.2014 :(giriş tarihi: 12 Kasım 2016).
- Üstün, O. (2011). Makrofungusların besin değeri ve biyolojik etkileri. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 68(4), 223-40.
- Veldman, K., Cavaco, L. M., Mevius, D., Battisti, A., Franco, A., Botteldoorn, N., ... & Guerra, B. (2011). International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(6), 1278-1286.
- Vestby, L. K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E., & Nesse, L. L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC veterinary research*, 5(1), 20.
- Wilkins, M., Hall-Stoodley, L., Allan, R. N., & Faust, S. N. (2014). New approaches to the treatment of biofilm-related infections. *Journal of Infection*, 69, S47-S52.