Kısa Bildiri/Short Communication *Mikrobiyol Bul 2024;58(1):71-79*/doi: 10.5578/mb.20249950

Geliş Tarihi (Received): 21.06.2023 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 03.12.2023

Acanthamoeba Hücresiz Sıvılarının *Pseudomonas aeruginosa* Karşısında İnhibe Edici Etkisinin Araştırılması

Investigation of the Inhibition Effect of *Acanthamoeba* Cell-Free Supernatants Against *Pseudomonas aeruginosa*

Çise KEBABCI[1] (ID), Zuhal ZEYBEK[2] (ID)

[1] İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
[1] *İstanbul University Institute of Sciences, Department of Biology, İstanbul, Türkiye.*

[2] İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
[2] *İstanbul University Faculty of Science, Department of Biology, Division of Fundamental and Industrial Microbiology, İstanbul, Türkiye.*

**Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 118Z923).*

***Bu çalışmanın bir kısmı İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında tamamlanmış olan 10341199 no'lu ve ''Özgür Yaşayan Amiplerin Hücresiz Sıvılarının Pseudomonas Üzerine Etkisinin Araştırılması'' başlıklı yüksek lisans tezine aittir.*

****Ayrıca, bu çalışmanın bir kısmı, 25. Ulusal Biyoloji Kongresi (13-15 Temmuz 2023, İzmir)'nde poster olarak sunulmuştur.*

*****Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda yapılmış olan patent başvurusu "Acanthamoeba Suşlarının Hücresiz Sıvılarını İhtiva Eden Antibakteriyel Kompozisyon" başlık ve "TR 2021/018203" numarası ile Türk Patent Enstitüsü tarafından kabul edilmiştir, süreç devam etmektedir.*

Makale Atıfı: *Kebabcı Ç, Zeybek Z. Acanthamoeba hücresiz sıvılarının Pseudomonas aeruginosa karşısında inhibe edici etkisinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2024;58(1):71-79.*

ÖZ

Acanthamoeba cinsine ait serbest yaşayan amipler hava, toprak ve sucul ortamlarda yaşayan mikroorganizmalardır. İnsanlarda amibik keratit, granülomatöz amibik ensefalit gibi tedavisi zor, ölümcül olabilen enfeksiyonlara sebep olurlar. Ayrıca, çeşitli bakteriler için konak olma özelliği göstererek bakterilerin çoğalmasına ve patojenitelerini arttırmalarına katkı sağladıkları bilinmektedir. Bununla beraber, bakteriler karşısında inhibe edici özellikleri ve antimikrobiyal maddeler üretmesi konusundaki bilgiler oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmada, *Acanthamoeba* suşlarına ait hücresiz sıvıların *Pseudomonas aeruginosa* izolatları karşısında antibakteriyel etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada ülkemizdeki sucul çevrelerden izole edilmiş dört farklı *Acanthamoeba* suşu (A10, A13, A14, U.GÖL) seçilerek kullanılmıştır. *P.aeruginosa* izolatları (PA2, PA3, PA4, PA5), ülkemizdeki hastalara ait klinik izolatlardan seçilmiştir. Standart suşlar olarak *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. *P.aeruginosa* izolatları nutrient agarda 37 °C'de, *Acanthamoeba* suşları ise *E.coli* yayılmış non-nutrient agarda 30 °C'de aerobik koşullarda üretilmiştir. *Acanthamoeba* suşlarının aksenik kültürlerinin eldesi için penisilin ve streptomisin ilave edilmiş olan "pepton yeast ekstrakt glukoz (PYG)" besiyeri kullanılmıştır. Aksenik kültürlerin 3000 rpm'de beş dakika santrifüj edilmesinden sonra süpernatant kısmının 0.22 µm por çaplı steril filtreden geçirilmesiyle *Acanthamoeba*-hücresiz sıvıları elde edilmiştir. Bu sıvıların *P.aeruginosa* izolatlarına karşı olan antibakteriyel aktiviteleri koloni sayım yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Her bir *Acanthamoeba*-hücresiz

İletişim (Correspondence): *Doç. Dr. Zuhal Zeybek, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+0555 429 5600,* ***E-posta (E-mail):*** *zeybek@istanbul.edu.tr*

sıvısının analizi GC-MS metoduna göre yapılmıştır. *Acanthamoeba*-hücresiz sıvılarının, *P.aeruginosa* izolatları karşısında değişen oranlarda (%3.9-91.5) inhibe edici etki gösterdiği saptanmıştır. En yüksek antibakteriyel etkiyi (%91.5), *A.castellanii* ATCC 50373 suşuna ait hücresiz sıvının, PA5 izolatına karşı gösterdiği saptanmıştır. A14 suşu aynı *Pseudomonas* izolatı karşısında benzer oranda (%89.4) inhibe edici etki göstermiştir. Ülkemize ait *Acanthamoeba* suşlarının çoğunun ortalama inhibe edici etkisinin, *A.castellanii* ATCC 50492 suşuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Çalışmada kullanılan *Acanthamoeba* suşlarının anti-*Pseudomonas* aktivitesinden sorumlu bileşiklerin, major bileşikler olarak saptanan fruktoz, fosforik asit, galaktoz, N-Asetilfenilalanin ve glukopiranoz olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma, ülkemizdeki sularda yaşayan *Acanthamoeba* cinsi mikroorganizmaların anti-*Pseudomonas* aktivitesini gösteren ilk çalışmadır. Doğada yaygın olarak bulunan *Acanthamoeba*, yeni antimikrobiyal maddeler için iyi bir kaynak gibi gözükmektedir.

Anahtar kelimeler: *Antibakteriyel aktivite; Acanthamoeba; hücresiz sıvı; Pseudomonas aeruginosa; GC-MS.*

ABSTRACT

Free-living amoebae belonging to the genus *Acanthamoeba* are microorganisms that live in air, soil and aquatic environments. In humans, they cause infections such as amoebic keratitis, graulamotous amoebic encephalitis that are difficult to treat and can be fatal. In addition, it is known that they contribute to the replication of bacteria and increase their pathogenicity by being a host for various bacteria. However, information on its inhibitory properties against bacteria and its production of antimicrobial agents is very limited. In this context, in this study, it was aimed to investigate whether cell-free supernatants of *Acanthamoeba* strains have antibacterial effects against *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Four different *Acanthamoeba* strains (A10, A13, A14, U.GÖL) isolated from aquatic environments in our country were selected and used in the study, *P.aeruginosa* isolates (PA2, PA3, PA4, PA5) were selected from clinical strains belonging to patients in our country. *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373 and *P.aeruginosa* ATCC 27853 were used as standard strains. *P.aeruginosa* isolates were grown on nutrient agar at 37 °C and *Acanthamoeba* strains were grown on *E.coli* spread non-nutrient agar at 30 °C under aerobic conditions. Pepton yeast extract glucose (PYG) medium supplemented with penicillin and streptomycin was used to obtain axenic cultures of *Acanthamoeba* strains. After the centrifugation of axenic cultures at 3000 rpm for five minutes, *Acanthamoeba*-cell-free supernatants were obtained by filtering the supernatant part through a sterile filter with a pore diameter of 0.22 µm. The antibacterial activities of these supernatants against *P.aeruginosa* isolates were determined using the colony counting method. Analysis of each *Acanthamoeba*-cell-free supernatants was performed according to the GC-MS method. *Acanthamoeba*-cell-free supernatants were found to have varying degrees of inhibitory effects (3.9-91.5%) against tested *P.aeruginosa* isolates. It was determined that the cell-free supernatant of *A.castellanii* ATCC 50373 strain showed the highest antibacterial effect (91.5%) against PA5 isolate. A14 strain showed similar inhibitory effects (89.4%) against the same *Pseudomonas* isolate. The average inhibitory effect of most of the *Acanthamoeba* strains of our country was found to be higher than that of the reference strain *A.castellanii* ATCC 50492. It is thought that the compounds responsible for the anti-*Pseudomonas* activity of the tested *Acanthamoeba* strains may be fructose, phosphoric acid, galactose, N-Acetylphenylalanine and glucopyranose determined as major compounds. This is the first study showing the anti-*Pseudomonas* activity of microorganisms of the genus *Acanthamoeba* living in the waters of our country. *Acanthamoeba*, which is widely found in nature, appears to be a good source for new antimicrobial agents.

Keywords: *Antibacterial activity; Acanthamoeba; cell-free supernatant; Pseudomonas aeruginosa; GC-MS.*

GİRİŞ

Serbest yaşayan amipler (SYA) doğada toprak, hava, deniz, göl ve nehirlerde bulundukları gibi; kontakt lens/lens kapları, yüzme havuzları, diyaliz birimleri, dental üniteler, içme suları gibi çok çeşitli ortamlarda da yaşayabilen mikroorganizmalardır[1,2]. SYA'nın bir cinsi olan *Acanthamoeba* insan sağlığı açısından önemli olan ve hakkında çok şey bilinen ökaryotik bir mikroorganizmadır[1,3].

Acanthamoeba cinsi fırsatçı patojenlerdir, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda az sayıda olsalar bile amibik keratit, granülomatoz amibik ensefalit (GAE), kutanöz yaralar gibi ciddi hastalıklar oluşturabilirler. Neden oldukları hastalıkların görülme sıklığı az olmasına rağmen ölümcül olabilmektedir, teşhis ve tedavileri de oldukça zordur[1,3]. İnsanlarda hastalıklara sebep olmalarının dışında, aynı ortamda bulundukları bakterilerle olan ilişkileri çeşitlilik gösterir: *i)* aynı ortamda bulunduğu bazı mikroorganizmalar ile beslenerek yaşamını sürdürebilirler, *ii)* bazı bakteriler için konak vazifesi görerek onların çoğalmalarına katkı sağlayabilirler. Bazı patojen bakteriler, *Acanthamoeba* hücresi içerisinde çoğalma, patojenitelerini arttırma yeteneği kazandıktan sonra amip hücrelerini parçalayarak dış ortama yayılabilirler[4-9]. Bilindiği gibi doğada bir arada yaşayan farklı mikroorganizma türleri stres koşullarında yaşamlarını sürdürebilmek için çeşitli antimikrobiyal maddeler üretirler. Mikroorganizmalar arasındaki bu ekolojik ilişkiler, yeni antimikrobiyal maddelerin ortaya çıkartılabilmesi açısından önem taşımaktadır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de enfeksiyon etkeni bakterilerin antibiyotiklere dirençli hale gelmesi, enfeksiyonların tedavisinde önemli sorunlar oluşturmaktadır. Bu nedenle yeni antibakteriyel madde/maddelerin keşfi çalışmaları hızla devam etmektedir. Bu bağlamda bu çalışmada, *Acanthamoeba*'nın olası patojeniteleri nedeniyle canlı hücrelerinin değil, bu amiplerin hücresiz sıvılarının (*Acanthamoeba*-CFS), *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı antibakteriyel etkisinin araştırılması, böylece yeni antimikrobiyal etkili madde arayışlarına katkı sağlanılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada, önceki çalışmalarımızda ülkemizdeki sulardan izole edilen ve *Acanthamoeba* cinsi olduğu saptanan suşlar (A10, A13, A14, U.GÖL) ve *A.castellanii* ATCC 50373 suşu kullanıldı[2,10]. Klinik *P.aeruginosa* izolatları (PA2, PA3, PA4, PA5) bir kültür koleksiyonundan sağlandı, standart suş olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

Acanthamoeba Suşlarının Canlandırılması ve Aksenik Kültürlerinin Eldesi

-86 °C'de saklanan suşlar, ısı ile inaktive edilmiş *Escherichia coli* ATCC 25922 içeren non-nutrient agara ekilerek inkübasyona bırakıldı[3]. Her gün invert mikroskopta (x 10) incelendi. Yoğun üreme görüldüğünde, içerisinde 0.5 mg/mL penisilin ve 0.5 mg/mL streptomisin bulunan pepton maya ekstraktı glukoz [pepton yeast extract glucose (PYG)] besiyeri bulunan doku kültürü flasklarına pasaj yapılarak inkübasyona bırakıldı. Tek tabakalı üreme görüldüğünde kültürler antibiyotiklerden arındırılması için 'Page's Amoeba Saline (PAS)' ile yıkandı, takiben flasklara antibiyotiksiz PYG eklendi ve inkübe edilerek aksenik kültürler elde edildi[3,8].

Acanthamoeba Hücresiz Sıvılarının Eldesi

Aksenik kültürlerdeki amip trofozoitlerinin sayımı Thoma lamı ve tripan mavisi (%0.4) kullanılarak gerçekleştirildi. Mavi renkli hücreler ölü, boyanmayanlar canlı olarak değer-

lendirildi. Daha sonra her bir aksenik kültür 3000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Üst sıvı steril filtreden (0.22 µm) (Merck, Almanya) geçirilerek *Acanthamoeba* hücresiz sıvısı (*Acanthamoeba*-CFS) elde edildi[8,9].

Antibakteriyel Aktivite Deneyleri

Nutrient agarda 37 °C'de üretilen *P.aeruginosa* izolatları fosfat tampon çözeltisi [phosphate buffer saline (PBS)] içerisinde süspanse edildi, yoğunlukları spektrofotometrik olarak (OD= 595) (PerkinElmer, ABD) ayarlanarak 10^6 kob/mL'ye seyreltildi.

Acanthamoeba-CFS'lerin antibakteriyel aktivitesinin test edilmesi amacıyla, her bir *P.aeruginosa* süspansiyonu, her bir *Acanthamoeba*-CFS ile karıştırıldı (1:10) ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona kaldırıldı. Sonrasında 10 kat seri sulandırımları hazırlandı. Sulandırımlardan nutrient agara üçer tekrarlı ekimler yapıldı ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona kaldırıldı. Kontrol grubu olarak PBS ve PYG kullanıldı. İnkübasyon sonucunda koloni sayımları gerçekleştirildi, aşağıdaki formül kullanılarak anti-*Pseudomonas* aktivite saptandı[8,9].

İnhibisyon (%)= [(A-B / A) x 100]

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

B: *Acanthamoeba*-CFS'de 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası saptanan bakteri sayısı (kob/mL).

Acanthamoeba-CFS Karakterizasyonu

Acanthamoeba-CFS'lerin karakterizasyonu GC-MS ölçümleriyle yapıldı. Doğrudan amino asit ölçümleri için ticari türevleme ajanlarıyla türevlendirilirken trimetilsilil türevleri için örnekler liyofilize edildi, sonra TMS ve yağ asidi metil esteri türevleri hazırlanarak GC-MS'de analiz edildi.

GC şartları: (Kolon: TG-5MS 0.25 µm; Maximum temperature: 330/350 °C)

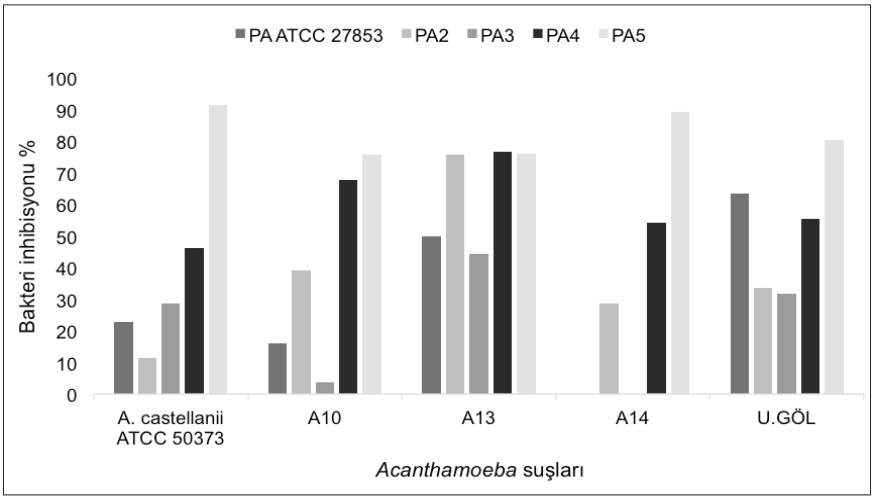
MS Şartları (Sistem: THERMO SCIENTIFIC GC-MS TSQ 9000; Kütle tarama aralığı: 50-950 m/z; Tanımlamalar: İLMER Kütüphanesi; Çevre şartları: Sıcaklık: 22 ± 5.0 °C, Bağıl nem: (50 ± 15) % rh

BULGULAR

Trofozoit şeklindeki canlı amip hücrelerinin sayıları ve test edilen *Acanthamoeba*-CFS örneklerinin *P.aeruginosa* izolatlarının üremesi üzerindeki ortalama inhibe edici etkileri Tablo I'de sunulmuştur. *Acanthamoeba*-CFS örneklerinin, *P.aeruginosa* izolatları üzerinde gösterdikleri ortalama inhibe edici etki değerlerine göre, en yüksek ortalama inhibe edici etkiyi A13 suşu gösterirken (%64.6), en düşük ortalama inhibe edici etkiyi A14 suşu göstermiştir (%34.4). Dört çevresel *Acanthamoeba* izolatından üçünün, *A.castellanii* ATCC 50373'e göre ortalama olarak daha yüksek inhibe edici etki gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo I).

Tablo I. *Trofozoit Şeklindeki Acanthamoeba Suşlarının Hücre Sayıları ve P.aeruginosa İzolatları Üzerindeki Ortalama İnhibisyonları*

***Acanthamoeba* Suşu (Kod)**	**Hücre/mL**	**Ortalama Bakteri İnhibisyonu (%)**
A.castellanii ATCC 50373	8.6×10^5	40.1
A10	9.1×10^5	40.5
A13	8.4×10^5	64.6
A14	7.1×10^5	34.4
U.GÖL	4.5×10^5	52.9



Şekil 1. *Acanthamoeba-CFS'lerin Pseudomonas izolatları üzerindeki antibakteriyel etkisi P.aeruginosa izolatlarının Acanthamoeba-CFS'lere karşı ortalama duyarlılık değerlerine göre, ortalama olarak en çok inhibe edilen izolat PA5 (%82.64), en az inhibe edilen izolat PA3 (%21.72) olmuştur. Ayrıca P.aeruginosa'nın klinik izolatlarından üç tanesinin (PA5, PA4, PA2), P.aeruginosa ATCC 27853 suşuna göre ortalama olarak daha yüksek oranda inhibe edildiği saptanmıştır (Tablo II).*

Şekil 1'de görüldüğü gibi, dört *Acanthamoeba* (*A.castellanii* ATCC 50373, A10, A13, U.GÖL)'ya ait CFS örnekleri tüm *P.aeruginosa* izolatları üzerinde inhibe edici etki (min= %3.9; maks= %91.5) göstermiştir. Öte yandan A14 suşuna ait CFS'nin, üç *P.aeruginosa* izolatı (PA2, PA4, PA5) üzerinde inhibe edici etki göstermesine rağmen (min= %28.6; maks= %89.4), diğer iki suş ve izolat (*P.aeruginosa* ATCC 27853 ve PA3) üzerinde inhibe edici etki göstermediği saptanmıştır. En yüksek antibakteriyel etkiyi (%91.5), *A.castellanii* ATCC 50373-CFS'nin PA5 izolatına karşı gösterdiği saptanmıştır. A14 suşu aynı *Pseudomonas* izolatı karşısında benzer oranda (%89.4) inhibe edici etki göstermiştir.

Test edilen *Acanthamoeba*-CFS örneklerinin hiçbirinde yağ asidi metil esteri tespit edilememiştir. L-valin, N-asetilfenilalanin, fosforik asit, fruktoz, galaktoz, glukopiranoz majör bileşikler olarak saptanmıştır (Tablo III).

Tablo II. *Pseudomonas İzolatlarının Acanthamoeba Suşlarına Karşı Ortalama Duyarlılıkları*

***P.aeruginosa* İzolatları (Kod)**	**Ortalama Duyarlılık (%)**
PA 5	82.64
PA 4	60.02
PA 2	37.76
PA ATCC 27853	30.44
PA 3	21.72

Tablo III. *Acanthamoeba-CFS Örneklerinin GC-MS Analizi*

Bileşik adı	**A10***	**A13***	**A14***	***A.castellanii* ATCC 50373***	**U.Göl***
Butanedioic Asit[a]	0.33	0.33	0.35	0.19	10.45
Aspartic Asit[a]	2.15	4.33	6.35	4.33	5.05
L-Valine[a]	6.93	7.64	8.19	7.12	10.58
L-Leucine[a]	5.62	4.91	-	5.26	6.96
L-Proline[a]	1.10	2.43	2.25	2.13	3.62
L-Phenylalanine[a]	1.00	0.62	0.89	0.91	1.75
N-Acetylphenylalanine[a]	4.68	5.42	6.70	7.05	8.93
Phosphoric Asit TMS[b]	9.97	11.62	10.65	9.51	6.20
Malonic Aasit TMS[b]	0.44	0.41	0.26	0.42	0.11
Fructose 5TMS[b]	22.45	21.81	26.00	22.96	6.14
Galactose-Penta TMS[b]	26.91	26.51	24.20	26.51	31.68
Allose PerTMS[b]	1.37	1.24	1.26	1.38	0.92
Xylose-Tetra TMS[b]	1.58	1.34	1.17	1.78	5.31
Glucopyranose Penta TMS Myo-inositol[b]	31.64	31.73	30.44	31.11	39.44
1,2,3,4,5,6-Hexakis-O-TMS[b]	0.24	0.21	0.23	0.25	0.35
Trehalose TMS[b]	3.25	3.13	3.30	3.12	3.01

*Bileşikler TIC % oranları olarak raporlanmıştır.

a: Amino asit türevleme GC-MS analiz sonuçları.

b: Liyofilize ekstrakt GC-MS analiz sonuçları.

TARTIŞMA

Acanthamoeba, amibik keratit, granülomatöz amibik ensefalit gibi tedavisi zor, ölümcül enfeksiyonlarda etkendir[1,3]. Toprakta, suda beraber yaşadıkları bakterilerle etkileşimde olmalarından dolayı ekosistemde önemlidirler[4-7,11].

Literatürde, *Pseudomonas*'ın amipler için besin kaynağı olmasının yanı sıra *Acanthamoeba*'yı enfekte ettiği, trofozoitlerinin içerisinde çoğalabildiği, yayılabildiği, dezenfektanlara ve antibakteriyellere karşı korunduğu, canlı fakat kültürü yapılamayan *P.aeruginosa*'nın *A.polyphaga* içerisinde kısa sürede canlandığı yer almaktadır[4,6,11]. Buradan SYA-bakteri ilişkisinin çoğunlukla bakterilerin çoğalması ve SYA'nın lizise uğ-

raması şeklinde olduğu anlaşılmaktadır. Bunun aksine, çalışmada "*Acanthamoeba*, *P.aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel maddeler salarak hayatta kalabilir" hipotezi ortaya atılmıştır. Günümüze kadar bakteriler, mantarlar, bitkiler ve böceklerden antibakteriyel maddeler elde edilmiştir. Oysa, *Acanthamoeba*'nın antibakteriyel etkisiyle ilgili çalışmalar azdır. Önceki çalışmamızda *Acanthamoeba*-CFS'nin *Staphylococcus* karşısında inhibisyon etkisi olduğu gösterilmiştir[12]. Iqbal ve arkadaşları, *A.castellanii* ATCC 50492'nin metisilin dirençli *S.aureus*'a %99'dan fazla, vankomisin dirençli *Enterococcus*'a %8 oranında inhibe edici etki gösterdiği halde *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter*'e inhibisyon etkisi göstermediğini saptamıştır[8]. Tashmukhambetov ise *S.pneumoniae*'ya %100, metisilin duyarlı *S.aureus*'a %10.6, *S.epidermidis*'e %3.4, *E.coli*'ye %6.1, *P.aeruginosa*'ya %11.1 ve *H.influenza*'ya %2.5 oranında inhibisyon etkisi olduğunu bildirmiştir[9]. Bu çalışmalarda *A.castellanii* ATCC 50492 ile birer adet bakteri suşu kullanılmıştır ve *P.aeruginosa* karşısında %0 ve %11.5 oranında inhibisyon etkisi tespit edilmiştir. Çalışmamızda tespit edilen daha yüksek inhibisyon etkilerinin (maks= %91.5) sebebi kullandığımız suşların literatürde kullanılanlardan fazla ve farklı olması olabilir.

Çalışmada, *Acanthamoeba*-CFS'lerin en yüksek inhibisyon etkilerini (%75.7-91.5) PA5 izolatı karşısında gösterdiği, bazı *Acanthamoeba*-CFS'lerin bazı *P.aeruginosa* izolatlarına hiç inhibisyon etkisi göstermediği saptanmıştır (Şekil 1). *P.aeruginosa* üzerinde ortalama en yüksek inhibisyon etkisi (%64.6) A13, en düşük inhibisyon etkisi (%34.4) A14 suşuna ait *Acanthamoeba*-CFS'de görülmüştür (Tablo I). *Acanthamoeba*-CFS'lere ortalama olarak en duyarlı *P.aeruginosa* PA5 (%82.64), en dirençli PA3 (%21.72) olmuştur. Üç klinik *P.aeruginosa* izolatı, *P.aeruginosa* ATCC 27853'e göre daha yüksek oranda inhibe edilmiştir (Tablo II). Ayrıca ülkemize ait *Acanthamoeba*-CFS'lerin çoğunun ortalama inhibe edici etkisi, *A.castellanii* ATCC 50492'ye göre daha yüksek saptanmıştır (Tablo II). Bu sonuçlarla mevcut literatür karşılaştırıldığında, *Acanthamoeba*-CFS'lerin *P.aeruginosa* karşısında gösterdiği inhibisyon etkisinin hem *Acanthamoeba* suşlarına hem de *P.aeruginosa* izolatlarına göre farklılık gösterdiği söylenebilir. Bu nedenle ülkemizden izole edilmiş/edilecek olan daha fazla *Acanthamoeba* izolatının anti-*Pseudomonas* etkilerinin araştırılmasıyla antibakteriyel etkili maddeler için potansiyele sahip olduğu desteklenebilecektir.

Acanthamoeba patojenitesini, hücre-hücre temasına bağlı olarak ya da yaşadığı ortama saldığı maddelerle gerçekleştirebilir. Çalışmada anti-*Pseudomonas* etkinin tayini için *Acanthamoeba*'nın kendisinin değil, üretildiği ortama saldıkları maddelerin test edilme nedeni, patojenitelerinin hedef mikroorganizma dışındaki hücrelerde oluşmasını engellemektir. Nitekim önceki çalışmamızda da aynı *Acanthamoeba*-CFS örneklerinin, 3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik olmadığı gösterilmiştir[10].

Acanthamoeba'nın patogenezinin anlaşılması ve virülans faktörlerinin saptanması için yapılan çalışmalarda mekanizma tam anlaşılamamakla beraber 33 kDa serinproteinazın rol oynadığı düşünülmektedir[13]. Son yıllarda hücre dışı veziküller, organizmalarda çeşitli moleküllerin hücre dışı ortama ulaşmasında salgı mekanizmaları olarak tanımlanmıştır. *A.castellanii*'nin hücre dışı veziküllerinden elde edilen lipidlerin GC-MS analiziyle fosfo-

lipidler, sterol, serbest yağ asidi ve steril esterlerin varlığı ortaya çıkarılmış, LC-MS/MS analiziyle protein bileşimi tanımlanmış ve patogeneze aracılık ettiği düşünülmüştür[14,15]. Çalışmada GC-MS analizi sonucunda *Acanthamoeba*-CFS'lerde majör bileşikler olarak fruktoz, fosforik asit, galaktoz, N-Asetilfenilalanin ve glukopiranoz saptanmış (Tablo III), yağ asidi metil esteri saptanmamıştır. Bu bileşiklerin *Pseudomonas* üzerinde inhibisyon etkisi olabilir. Nitekim literatürde fruktozun ve fosforik asitin antibakteriyel aktivitesinin olduğu gösterilmiştir[16,17]. Son yıllarda *P.aeruginosa*'nın üremesini engelleyen çok değerlikli galaktoz ligandlarına sahip biyouyumlu supramoleküler hidrojel tasarlanmıştır[18]. Ayrıca *Streptomyces*'ten elde edilmiş N-Asetilfenilalanin'in, glukopiranoz türevlerinin bakteriler ve mayaları inhibe edebildiği gösterilmiştir[19,20]. *Acanthamoeba*-CFS'lerde saptanan bu maddelerin hem ayrı ayrı hem de farklı kombinasyonlarının anti-*Pseudomonas* aktivitelerinin test edileceği çalışmalarla, *Acanthamoeba*'nın antibakteriyel maddeler için yeni bir kaynak olabileceği gösterilebilir.

Sonuç olarak bu çalışma, ülkemizdeki sularda yaşayan *Acanthamoeba*'ların anti-*Pseudomonas* aktivitesini gösteren ilk çalışmadır ve yeni antimikrobiyal maddelerin arayışına *Acanthamoeba*'nın dahil edilmesine dikkat çekmektedir. *Acanthamoeba*-CFS'lerin, *P.aeruginosa*'ya gösterdiği antibakteriyel etkiden fruktoz, fosforik asit, galaktoz, N-Asetilfenilalanin gibi maddelerin sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayına gerek duyulmamaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, et al. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. Pathol Biol 2012; 60(6): 399-405. https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.002
2. Zeybek Z, Türkmen A. Investigation of the incidence of Legionella and free-living amoebae in swimming pool waters and biofilm specimens in Istanbul by different methods. Mikrobiyol Bul 2020; 54: 50-64. https://doi.org/10.5578/mb.68962
3. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev 2002; 15(3): 342-54. https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.342-354.2002
4. Brown MR, Barker J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: Protozoa and biofilms. Trends Microbiol 1999; 7(1): 46-50. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01425-5
5. Winiecka-Krusnell J, Linder E. Bacterial infections of free-living amoebae. Res Microbiol 2001; 152(7): 613-9. https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01240-2
6. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin Microbiol Rev 2004; 17(2): 413-33. https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004
7. Khan NA, Siddiqui R. Predator vs aliens: Bacteria interactions with *Acanthamoeba*. Parasitol 2014; 141(7): 869-74. https://doi.org/10.1017/S003118201300231X

8. Iqbal J, Siddiqui R, Khan NA. *Acanthamoeba* and bacteria produce antimicrobials to target their counterpart. Parasit Vectors 2014; 7(1): 56. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-56
9. Tashmukhambetov B. An investigation of the effects of an antimicrobial peptide on the survival of *Acanthamoeba* and intracellular bacteria associated with Cystic Fibrosis PhD, University of Essex, Colchester, England, 2016.
10. Zeybek Z, Kebabcı Ç, Gül İB, Akbaş F. Inhibition effect of cell-free supernatants of environmental *Acanthamoeba* strains on the viability of metastatic cell-lines. Mikrobiyol Bul 2023; 57(2): 283-92. https://doi.org/10.5578/mb.20239923
11. Dey R, Rieger AM, Stephens C, Ashbolt N. Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* with *Acanthamoeba polyphaga* observed by imaging flow cytometry, Cytom Part A 2019; 95(5): 555-64. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23768
12. Özcan ŞM, Zeybek Z. The effect of cell-free supernatants of free-living amoeba against some staphylococcus bacteria: First findings from Turkey. Eur J Biol 2021; 80(1): 29-34. https://doi.org/10.26650/EurJBiol.2021.927747
13. Behera HS, Satpathy G. Characterisation and expression analysis of trophozoite and cyst proteins of *Acanthamoeba* spp. isolated from *Acanthamoeba keratitis* (AK) patient. Mol Biochem Parasitol 2016; 205 (1-2): 29-34. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.03.009
14. Gonçalves DS, Ferreira MDS, Liedke SC, Gomes K X, de Oliveira GA, Leão P EL, et al. Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoeba castellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells. Virulence 2018; 9(1): 818-36. https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1451184
15. Lin WC, Tsai CY, Huang JM, Wu SR, Chu LJ, Huang KY. Quantitative proteomic analysis and functional characterization of *Acanthamoeba castellanii* exosome-like vesicles. Parasit Vectors 2019; 12: 1-12. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3725-z
16. Mizzi L, Maniscalco D, Gaspari S, Chatzitzika C, Gatt R, Valdramidis VP. Assessing the individual microbial inhibitory capacity of different sugars against pathogens commonly found in food systems. Lett Appl Microbiol 2020; 71(3): 251-8. https://doi.org/10.1111/lam.13306
17. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Rodríguez E, Liébana-Ureña J, Espigares-García M. Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; 106 (2): 84-9. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.04.002
18. Liu S, Li H, Zhang J, Tian X, Li X. A biocompatible supramolecular hydrogel with multivalent galactose ligands inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* virulence and growth. RSC Adv 2020; 10(56): 33642-50. https://doi.org/10.1039/D0RA06718K
19. Kwon OS, Park HR, Yun BS, Hwang JH, Lee JC, Park DJ, et.al. Antimicrobial activity of N-acetyl-phenylalanine produced from *Streptomyces* sp. G91353. Korean J Microbiol 2006; 34(4): 306-10.
20. Zhang X, Ye X, Chai W, Lian XY, Zhang Z. New metabolites and bioactive actinomycins from marine-derived *Streptomyces* sp. ZZ338. Mar Drugs 2016; 14(10): 181. https://doi.org/10.3390/md14100181