

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**Çeşitli Sistemlerde Sorun Oluşturan Hücre Dışı
Polisakkarit Üreten Mikroorganizmaların
Polisakkaritlerinin Biyoparçalanması ve
Parçalanma Etkinliğinin Saptanması**

Nur CEYHAN

**Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu: 401.05.00**

Sunuş Tarihi: 27.02.2008

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR

Bornova-İZMİR

2008

Sayın **Nur CEYHAN** tarafından DOKTORA TEZİ olarak sunulan **“Çeşitli Sistemlerde Sorun Oluşturan Hücre Dışı Polisakkarit Üreten Mikroorganizmaların Polisakkaritlerinin Biyoparçalanması ve Parçalanma Etkinliğinin Saptanması”** adlı bu çalışma, “Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği” nin 24. madde (c) ve (d) bentleri ve eğitim yönergesinin ilgili hükümleri dikkate alınarak değerlendirilmiş olup yapılan sözlü savunma sınavında aday oy ile başarılı bulunmuştur. Bu nedenle Nur CEYHAN’ın sunduğu metnin doktora tezi olarak kabulüne oy ile karar verilmiştir.

27.02.2008

JüriBaşkanı; Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR imza.....

Raportör; Yard.Doç.Dr. Halil BIYIK imza.....

Üye; Prof. Dr. İsmail KARABOZ imza.....

Üye; Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ imza.....

Üye; Doç Dr. Aysel UĞUR imza.....

ÖZET

Çeşitli Sistemlerde Sorun Oluşturan Hücre Dışı Polisakkarit Üreten Mikroorganizmaların Polisakkaritlerinin Biyoparçalanması ve Parçalanma Etkinliğinin Saptanması

CEYHAN, Nur

Doktora Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR

Şubat, 2008, 279 sayfa

Bu çalışmada, bir petrokimya endüstrisine ait soğutma suyu kulelerinde çeşitli problemlere neden olabilen biyofilm bakterileri ve onların hücre dışı polisakkaritleri araştırılmıştır. Buna ilaveten, bu mikroorganizmalar onların polisakkaritlerinin parçalanması açısından da incelenmiştir.

Soğutma suyu kulelerinden 85 adet mukoid karakterli farklı koloni izolat elde edilmiştir. Bunlardan en iyi hücre dışı polisakkarit üretici oniki bakteri izole edilmiş, klasik, ticari ve moleküler sistemler ile tanılamaları yapılmıştır. Elde edilen türler *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Pantoea*, *Sphingomonas*, *Ochrobactrum* ve *Shigella*'ya aittir. Bu türlerin hücre dışı polisakkaritleri glukoz, sakkaroz veya galaktoz ilaveli zenginleştirilmiş bakteriyal kültür ortamlarından propan-2-ol çöktürmesi ve santrifüjleme ile elde edilmiştir. Hücre dışı polisakkarit verimlerinin 1,68-4,95 g/l olduğu saptanmıştır. Bu hücre dışı polisakkarit materyallerinin toplam şeker ve toplam protein içerikleri belirlenmiştir. Toplam şeker içeriği %23,5-56,0 (g şeker/g EPS), toplam protein içeriği %10,1-29,7 (g protein/g EPS) arasında değişmektedir.

Hücre dışı polisakkaritlerin şeker içerikleri high performance liquid chromatography (HPLC) ile tanımlanmıştır. Genellikle hücre dışı polisakkaritlerin daha fazla olarak glukoz ve galaktoz, daha az olarak mannoz, ramnoz, fruktoz, arabinoz, riboz içerdiği tespit edilmiştir.

Tüm bakteriler polisakkarit parçalama etkinlikleri bakımından incelenmiştir. *Pseudomonas sp.* (izolat 12) ile elde edilen hücre dışı polisakkarit sekiz bakteri, *Burkholderia gladioli* (izolat 4) ve *Pseudomonas aureus* (izolat 6Bi)'den elde edilen hücre dışı polisakkaritler 7 bakteri, *Burkholderia cepacia*'dan (izolat 14SS), *Pseudomonas fluorescens* (izolat 22) ve *Shigella dysenteriae* (izolat 14)'den elde edilen hücre dışı polisakkaritler beş bakteri, *Sphingomonas paucimobilis* (izolat 2SS) ve *Ochrobactrum anthropi* (izolat 8SS)'den elde edilen hücre dışı polisakkaritler dört bakteri, *Pasteurella haemolytica* (izolat 21) ve *Aeromonas hydrophila* (izolat 5Bi)'den elde edilen hücre dışı polisakkaritler üç bakteri, *Proteus vulgaris* (izolat 2) ve *Pantoea agglomerans* (izolat 9Ba)'dan elde edilen hücre dışı polisakkaritler sadece bir bakteri tarafından kullanılmıştır ($\Delta A_{620} \geq 0,15$).

Sonuçlar, çalışmadaki bakterilerin soğutma kuleleri biyofilmlerinden elde edilen hücre dışı polisakkaritleri büyük oranda parçalayabildiğini ve başlıca içeriği karbohidrat ve protein olan EPS'nin biyofilm mikroorganizmaları tarafından substrat olarak kullanılabileceğini göstermiştir. İzolatlardan *Pseudomonas sp.* (izolat 12)'nin EPS kullanımı diğer izolatlara göre en fazla olduğu saptanmıştır. Bulgularımız, EPS'yi parçalayan bakteriyal enzimlerin zararlı biyofimler için antibiyofilm ajanlar olarak kullanılabileceğini önermektedir.

Çalışmada başlıca amaç, varolan biyosit ve ticari enzim preparatlarına alternatif olarak daha yüksek polisakkarit üretme ve parçalama kapasitesine/verimine sahip mikroorganizmaların araştırılmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Hücre dışı polisakkarit, Soğutma suyu kulesi, Biyofilm bakterileri, Biyoparçalanma.

ABSTRACT

Determination of Biodegradation and Biodegradation Capability of Polysaccharides of Extracellular Polysaccharides Producing Microorganisms Which Cause Problems in Several Systems

CEYHAN, Nur

PhD in Biology Department

Supervisor : Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR

February, 2008, 279 pages

Biofilm bacteria that can cause several problems in cooling water towers of a petrochemical industry and their extracellular polysaccharides were investigated in this work. In addition, these microorganisms were screened from the standpoint of degradation of their polysaccharides.

Eighty five mucoid colonies were obtained from cooling water towers. Twelve bacteria of them producing the most extracellular polysaccharide were isolated and characterized biochemically by classic, commercial and molecular systems. These were species of *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Pantoea*, *Sphingomonas*, *Ochrobactrum* and *Shigella*. Extracellular polysaccharides of these species were obtained by propan-2-ol precipitation and centrifugation from bacterial cultures in media enriched with glucose, sucrose or galactose. Extracellular polysaccharide yields were of 1.68-4.95 g/l. These EPS materials were characterized for total sugar and protein contents. Their total

sugar content ranged from 23.5% to 56.0% (g sugar/g EPS), total protein content ranged from 10.1% to 29.7% (g protein/g EPS).

Sugar compositions of EPS were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Generally, it was observed that of these extracellular polysaccharides contained more glucose and galactose, and less mannose, rhamnose, fructose, arabinose, ribose.

All bacteria were invested in terms of polysaccharide degradations. Eight of the bacteria were able to utilize EPS from *Pseudomonas sp.* (isolate 12), seven of the bacteria were able to utilize EPS from *Burkholderia gladioli* (isolate 9) and *Pseudomonas aeruginosa* (isolate 6Bi), five of the bacteria were able to utilize EPS from *Burkholderia cepacia*'dan (isolate 14SS), *Pseudomonas fluorescens* (isolate 22) and *Shigella dysenteriae* (isolate 14), four of the bacteria were able to utilize EPS from *Sphingomonas paucimobilis* (isolate 2SS) and *Ochrobactrum anthropi* (isolate 8SS), three of the bacteria were able to utilize EPS from *Pasteurella haemolytica* (isolate 21) and *Aeromonas hydrophila* (isolate 5Bi), only one of the bacteria were able to utilize EPS from *Proteus vulgaris* (isolate 2) and *Pantoea agglomerans* (isolate 9Ba) ($\Delta A_{620} \geq 0.15$).

The results show that the bacteria in the study have a remarkable ability to degrade EPSs from biofilms of the cooling towers and revealed that the EPS which is formed from carbohydrate and protein in a large ratio can be used as a substrate by biofilm microorganisms. The EPS utilization rate by *Pseudomonas sp.* (isolate 12) was the greatest of the isolates. Our findings suggest that bacterial proteases and polysaccharases which degrade EPS, might prove useful as disinfectants or cleaning agents for detrimental biofilms.

In this study, the main aim is that is detected new microorganisms which have more polysaccharide production and degradation capacity than commercial biocides and enzyme preparations.

Key words: Extracellular polysaccharide, Cooling water tower, Biofilm bacteria, Biodegradation.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tezimde yönlenmemde yardımcı olan danışmanım Sayın Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR ve diğer tez izleme komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. İsmail KARABOZ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Halil BIYIK'a, moleküler çalışmalarımda büyük yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. Ali KOÇYİĞİT ve Araş. Gör. Aslı KAÇAR'a, denemelerim ve tezimin yazımı sırasında danıştığım Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı arkadaşlarıma, özellikle her zaman sabırları ve destekleriyle yanımda oldukları için sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenmiştir (2003/Fen/030). Bu nedenle, ayrıca Araştırma Fonu Yönetim Kuruluna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VIII
TEŞEKKÜR	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XX
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XXIV
KISALTMALAR DİZİNİ	XXXIV
1. GİRİŞ	1
1. Literatür Özeti	1
1.1. 1. Polisakkaritlerin Kimyasal Yapısı ve Sınıflandırılması.....	1
1.1.2. Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Mikrobiyal Polisakkaritler	3
1.1.2.1. Ksantan ve asetan.....	3
1.1.2.2. Aljinat	5
1.1.2.3. Jelatin, velan ve ramsan	7
1.1.2.4. Kurdlan ve benzeri polisakkaritler	9
1.1.2.5. Süksinoglikan ve benzeri polisakkaritler	10
1.1.2.6. Laktik asit bakterileri (LAB) EPS'leri	11
1.1.2.6.1. Dekstran.....	13
2.1.2.6.2. Levan	14

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

1.1.2.7. Emülsan.....	14
1.1.2.8. Bakteriyal selüloz.....	15
1.1.2.9. Hiyaluronik asit.....	15
1.1.2.10. Skleroglukan	16
1.1.2.11. Pullulan	17
1.2. Mikrobiyal Biyofilmlerde EPSler	20
1.2.1. Yararlı biyofilm faaliyetleri	24
1.2.2 Zararlı biyofilm faaliyetleri	25
1.3. Biyofilmin Yapısı	29
1.3.1. Katyonlar	32
1.3.2. Anyonlar	33
1.3.4. Polar organik moleküller	33
1.3.5. Apolar ve hidrofobik moleküller	33
1.4. Biyofilm oluşumu.....	34
1.5. EPS Sentezinin ve Biyofilm Oluşumunun Regülasyonu	36
1.6. Biyofilm Hücreleri Arasındaki Etkileşimler	47
1.7. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	49
1.8. Endüstriyel Su Sistemlerinde Biyofilmin Önemi	51
1.9. Zararlı Biyofilmlerin Giderilmesi ve Kontrolü	58

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

1.10. Polisakkarit Parçalayıcı Mikrobiyal Kökenli Enzimler ve	
Substratları	71
1.10.1. Mikrobiyal polisakkaritler üzerinde aktiviteye sahip	
polisakkarazlar	76
1.10.1.1. Aljinat liyazlar	76
1.10.1.2. Jelatin liyazlar	77
1.10.1.3. Ksantan liyazlar	77
1.10.1.4. Glukuronan ve glukuronan liyazlar	78
1.10.2. Bitki ve Algal Polisakkaritler Üzerinde Aktiviteye	
Sahip Polisakkarit Liyazlar	79
1.10.2.1. Pektin ve pektin liyazlar	79
1.10.2.2. Ulvan ve ulvan liyazlar	80
1.10.2.3. α -(1,4)-glukan ve α -(1,4)-glukan liyazlar	81
1.10.3. Glikosaminoglikanlar (GAGs) üzerinde aktiviteye sahip	
polisakkarit liyazlar	81
1.10.3.1. Kondroitin sülfatlar ve kondroitin sülfat liyazlar.....	82
1.10.3.2. Heparin, heparan sülfat ve heparan sülfat liyazlar.....	83
1.10.3.3. Hiyaluronan ve hiyaluronan liyazlar.....	84
1.10.4. Polisakkarit parçalayıcı diğer bazı enzimler	86

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

1.10.5. Polisakkarit parçalayıcı enzimler ve ürünlerinin uygulama alanları.....	87
2. MATERYAL VE METOT	93
2.1. Materyal.....	93
2.1.1. Örnekler	93
2.1.2. Besiyerleri	95
2.1.3. Kullanılan çözeltiler ve kimyasal maddeler.....	99
2.1.4. Kullanılan test kitleri.....	102
2.1.4.1. API 20E test kiti	102
2.1.4.2. API 20NE test kiti	106
2.1.4.3. ZR fungal/bakteriyal DNA kiti	108
2.1.4.4. Fast start tag DNA polymerase dNTP pack kit	109
2.1.5. Kullanılan başlıca cihazlar	109
2.2. Metot.....	110
2.2.1. EPS üretici bakterilerin izolasyonu.....	110
2.2.2. EPS üretici bakterilerin seçimi	110

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

2.2.3. EPS üretici izolatların ön tanılamaları.....	111
2.2.3.1. Kültürel özellikler	111
2.2.3.2. Mikroskopik özellikler.....	111
2.2.3.3. Biyokimyasal özellikler	111
2.2.3.3.1. KOH testi.....	111
2.2.3.3.2. Oksidaz testi.....	112
2.2.3.3.3. Katalaz testi.....	112
2.2.3.3.4. Hareketliliğin saptanması.....	113
2.2.3.3.5. O/F testi.....	112
2.2.3.3.6. Oksijen isteğinin belirlenmesi	113
2.2.3.3.7. MacConkey agar'da üreme	114
2.2.3.3.8. Floresans pigment oluşumunun incelenmesi	114
2.2.4. EPS üretici izolatların ileri biyokimyasal tanılamaları.....	115
2.2.4.1. API 20E tanılama testi	115
2.2.4.2. API 20NE tanılama testi	116

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

2.2.5. İzolatların moleküler tanılamaları.....	117
2.2.5.1. DNA izolasyonu.....	117
2.2.5.2. DNA'ların saflık kontrolü	119
2.2.5.3. PCR	120
2.2.5.4. PCR ürünlerinin elektroforezi	121
2.2.5.5. PCR ürünlerinin 16S rDNA baz sırasının belirlenmesi	123
2.2.5.6. 16S rDNA baz sırası ile tür tayininin yapılması	123
2.2.6. İzolatların en yüksek EPS üretimlerini gerçekleştirdikleri	
ortamların belirlenmesi ve büyüme eğrilerinin çıkarılması	123
2.2.7. İzolatların hücre kuru ağırlıklarının tayini.....	124
2.2.8. EPS ekstraksiyonu	124
2.2.9. EPS kuru ağırlığının belirlenmesi.....	124
2.2.10. EPS verimi katsayısının saptanması	125
2.2.11. EPS'lerin toplam şeker analizleri.....	125
2.2.12. EPS'lerin toplam protein analizleri.....	125

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

2.2.13. EPS'lerin HPLC ile şeker içeriklerinin belirlenmesi.....	126
2.2.14. EPS'lerin emülsifiye edici aktivitelerinin tayini	126
2.2.15. EPS'leri parçalayıcı bakterilerin taranması	127
2.2.16. EPS'lerin hidroliz testleri	127
2.2.17. İndirgenmiş şekerlerin ölçümü	128
3. BULGULAR	129
3.1. İzolatların Tanılamaları	129
3.1.1. İzolatların mikroskopik, kültürel ve biyokimyasal tanılamaları....	129
3.1.2. EPS üretici izolatların moleküler tanılamaları.....	137
3.1.3. İzolatlara ait çoğaltılmış olan 16S rDNA'nın baz sırasının belirlenmesi.....	139
3.2. İzolatların EnYüksek EPSÜretimlerini Gerçekleştirdikleri Ortamlar..	156
3.3. İzolatların Büyüme Eğrileri.....	156
3.4. İzolatların HücreKuru Ağırlıklarının ve EPSVerimlerinin Saptanması	165
3.5. EPS'lerin Toplam Şeker Miktarı Tayini İçin 490 nm'de Çıkarılan Standart Grafik.....	166
3.6. EPS'lerin Toplam Protein Miktarı Tayini İçin 595 nm'de Çıkarılan Standart Grafik	167

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

3.7. EPS’lerin Polisakkaritlerin HPLC ile Şeker İçeriklerinin Sonuçları.....	168
3.8. EPS’lerin Emülsifiye Edici Aktiviteleri	171
3.9. EPS’leri Parçalayıcı Bakteriler	173
3.10. EPS’lerin Hidroliz Test Sonuçları ve İndirgenmiş Şeker Sonuçları.....	175
4. TARTIŞMA	191
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	224
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	227
7. ÖZGEÇMİŞ	279

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. <i>X.campestris</i> 'e ait ksantan yapısı.	4
Şekil 1.2. <i>A.xylinum</i> 'a ait asetan yapısı.	5
Şekil 1.3. Aljinatın (poly β -D-mannuronat) yapısı.	6
Şekil 1.4. Farklı tiplerde aljinat yapıları.	7
Şekil 1.5. <i>Sphingomonas sp.</i> 'ye ait jelan ve jelan-benzeri polisakkaritlerin yapısı.	8
Şekil 1.6. Kurdlanın yapısı.	9
Şekil 1.7. Süksinoglikanın yapısı.	10
Şekil 1.8. <i>Streptococcus mutans</i> tarafından üretilmiş bir α -glukan fraksiyonu.	12
Şekil 1.9. <i>S.thermophilus</i> Sfi6'ya ait EPS'nin yapısı.	12
Şekil 1.10. <i>Lactobacillus lactis</i> NIZO B40'a ait EPS'nin yapısı.	12
Şekil 1.11. <i>L.mesenteroides</i> dekstranının yapısı.	13
Şekil 1.12. Levanın yapısı.	14
Şekil 1.13. Bakteriyal selülozun yapısı.	15
Şekil 1.14. Bakteriyal kaynaklı hiyaluronik asitin yapısı.	16

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.15.	Skleroglukanın yapısı. 16
Şekil 1.16.	Pullulanın yapısı. 17
Şekil 1.17.	Hücre dışı matriksteki (EPS) mikrokolonilerin skanning elektron mikroskopik görüntüsü. 24
Şekil 1.18.	Gr (-) ve gr (+) bakteri içeren bir biyofilmin kısımları 30
Şekil 1.19.	Sucul sistemdeki bir biyofilm içerisindeki farklı ekolojik katmanlar. 32
Şekil 1.20.	Biyofilmin büyümesi 34
Şekil 1.21.	Biyofilm gelişim aşamaları 36
Şekil 1.22.	Soğutma kulesi çalışma şeması. 53
Şekil 1.23.	Bir sucul biyofilmin yapısal elemanları. 55
Şekil 1.24.	Biyofilmlerin zarar şekilleri. 59
Şekil 1.25.	EPS'nin biyoparçalanma mekanizması. 67
Şekil 1.26.	Polisakkarit liyazların β -eliminasyon mekanizması ile glikanohidrolazların hidrolitik aktivitesinin mukayesesi. 71

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.27.	Polisakkarit liyazlar tarafından anyonik ve nötral polisakkaritlerin kesimi..... 73
Şekil 1.28.	Polisakkarit parçalayıcı enzimlerin fıçı-benzeri genel yapısı .. 74
Şekil 1.29.	Çeşitli polisakkarit-parçalayıcı enzimlerin üç-boyutlu yapıları ile heliks ve katlanma yapıları 75
Şekil 1.30.	Jelan liyazlar tarafından deasetillenmiş jelan depolimerizasyonu 77
Şekil 1.31.	Ksantan liyazlar tarafından ksantan depolimerizasyonu..... 78
Şekil 1.32.	Kondroitin-6-sülfat ve Dermatan sülfatın yapısı. 82
Şekil 1.33.	Heparinin yapısı. 83
Şekil 1.34.	Sentetik heparin pentasakkarit üzerindeki antitrombin III-bağlı bölgedeki heparinaz I aktivitesi. 84
Şekil 1.35.	Hiyaluronanın yapısı ve parçalanması. 85
Şekil 1.36.	Hiyaluronanın hiyaluronat liyaz aktivitesi ile parçalanmasının şematik gösterimi. 86

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	PETKİM Petrokimya Holding A.Ş. Aliğa Kompleksi 93
Şekil 2.2.	Tesise ait soğutma kulesi havuz kısmı. 94
Şekil 2.3.	Soğutma kulesinin filtre kısmı.....94
Şekil 2.4.	API 20E'ye ait sonuç çizelgesi.....116
Şekil 2.5.	API 20NE'ye ait sonuç çizelgesi.....117
Şekil 3.1.	İzolat 2SS'in Nutrient Agardaki görüntüsü.....132
Şekil 3.2.	İzolat 2SS'in ESP ortamındaki görüntüsü.....132
Şekil 3.3.	İzolat 9Ba'nın Nutrient Agardaki görüntüsü.....133
Şekil 3.4.	İzolat 9Ba'nın ESP ortamındaki görüntüsü.....133
Şekil 3.5.	İzolat 14SS'in Nutrient Agardaki görüntüsü.....134
Şekil 3.6.	İzolat 14SS'in ESP ortamındaki görüntüsü.....134
Şekil 3.7.	İzolat 9Ba'nın API 20E test kiti sonuç panelinin görüntüsü...135
Şekil 3.8.	İzolat 5Bi'nin API 20E test kiti sonuç panelinin görüntüsü....135
Şekil 3.9.	İzolat 4'ün API 20NE test kiti sonuç panelinin görüntüsü 136
Şekil 3.10.	İzolat 12'nin API 20NE test kiti sonuç panelinin görüntüsü...136

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

Sekil

Sayfa

Şekil 3.11.	Moleküler tanılamaları yapılan izolatlara ait genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezde görünümü.	138
Şekil 3.12.	Moleküler tanılamaları yapılan izolatlara ait çoğaltılmış 16S RNA'yı kodlayan DNA parçasının agaroz jel elektroforezde görünümü.	139
Şekil 3.13.	İzolat 14'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.	141
Şekil 3.14.	İzolat 6Bi'ye ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.	143
Şekil 3.15.	İzolat 5Bi'ye ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.	145
Şekil 3.16.	İzolat 9Ba'ya ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.	147
Şekil 3.17.	İzolat 2SS'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.	149

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.18. İzolat 8SS'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.....	151
Şekil 3.19. İzolat 2'ye ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.....	153
Şekil 3.20. İzolatların 5 günde sıvı kültürde EPS üretim durumları.....	156
Şekil 3.21. 660nm'de izolat 14SS'in büyüme eğrisi.....	159
Şekil 3.22. 660nm'de izolat 22'nin büyüme eğrisi.....	159
Şekil 3.23. 660nm'de izolat 21'in büyüme eğrisi.....	160
Şekil 3.24. 660nm'de izolat 14'ün büyüme eğrisi.....	160
Şekil 3.25. 660nm'de izolat 6Bi'nin büyüme eğrisi.....	161
Şekil 3.26. 660nm'de izolat 5Bi'nin büyüme eğrisi.....	161

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.27. 660nm’de izolat 9Ba’nın büyüme eğrisi.....	162
Şekil 3.28. 660nm’de izolat 2SS’in büyüme eğrisi.....	162
Şekil 3.29. 660nm’de izolat 4’ün büyüme eğrisi.	163
Şekil 3.30. 660nm’de izolat 2’nin büyüme eğrisi.	163
Şekil 3.31. 660nm’de izolat 8SS’in büyüme eğrisi.....	164
Şekil 3.32. 660nm’de izolat 12’nin büyüme eğrisi.	164
Şekil 3.33. Toplam şeker miktarı tayini için 490 nm’deki standart grafik...	167
Şekil 3.34. 595 nm’de çıkarılan protein standart grafiği.	168
Şekil 3.35. <i>B.cepacia</i> (izolat 14SS) EPS’si bulunan besiyerinde bakterilerin EPS’yi hidrolizi	176
Şekil 3.36. <i>P.fluoescens</i> (izolat 22) EPS’si bulunan besiyerinde bakterilerin EPS’yi hidrolizi	177
Şekil 3.37. <i>P.haemolytica</i> (izolat 21) EPS’si bulunan besiyerinde bakterilerin EPS’yi hidrolizi	178

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.38. <i>S.dysenteriae</i> (izolat 14) EPS'si bulunan besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.....	179
Şekil 3.39. <i>P.aeruginosa</i> (izolat 6Bi) EPS'si bulunan besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.....	181
Şekil 3.40. <i>A.hydrophila</i> (izolat 5Bi) EPS'si bulunan besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.....	182
Şekil 3.41. <i>P.agglomerans</i> (izolat 9Ba) EPS'si bulunan besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.....	183
Şekil 3.42. <i>S.paucimobilis</i> (izolat 2SS) EPS'si bulunan besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.....	184
Şekil 3.43. <i>B.gladioli</i> (izolat 4) EPS'si bulunan besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.....	186
Şekil 3.44. <i>P.vulgaris</i> (izolat 2) EPS'si bulunan besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.....	187

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)**Sekil****Sayfa**

- Şekil 3.45.** *O.anthropi* (izolat 8SS) EPS'si bulunan besiyerinde
bakterilerin EPS'yi hidrolizi 188
- Şekil 3.46.** *Pseudomonas sp.* (izolat 12) EPS'si bulunan besiyerinde
bakterilerin EPS'yi hidrolizi 190

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Çeşitli LAB'lar ve ürettikleri polimerler.....	11
Çizelge 1.2. Endüstriyel öneme sahip mikrobiyal polisakkaritlerin uygulama alanları	18
Çizelge 1.3. Biyofilmlerle ilişkili medikal enfeksiyonlar.....	26
Çizelge 1.4. Başlıca endüstriyel, çevresel ve tarımsal biyofilm zararları.....	28
Çizelge 1.5. Bazı biyofilm tiplerine örnekler	29
Çizelge 1.6. Genel biyofilm kompozisyonu	31
Çizelge 1.7. Biyofilm oluşumu ile ilgili tutunma ve diğer hücrel yapılar ..	40
Çizelge 1.8. Biyofilm oluşumu ile ilişkili bazı regülatör sistemler.	45
Çizelge 1.9. Yüzeylere mikrobiyal adhezyonda etkili olan kuvvetler.....	56
Çizelge 1.10. Biyofilm parçalanmasını arttırıcı antibiyofilm ajanlar	69
Çizelge 1.11. Polisakkarit liyaz aileleri.	72
Çizelge 1.12. Aljinat liyazların kesim bölgeleri	76
Çizelge 2.1. API 20E test kiti ayıraçlar, ortamlar ve içerikleri.....	103
Çizelge 2.2. API 20E striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları.	104
Çizelge 2.3. API 20NE striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları.....	107

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.4. PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları.....	120
Çizelge 2.5. Amplifikasyonun sağlandığı PCR koşulları.....	121
Çizelge 3.1. İzolatların temel özellikleri.	130
Çizelge 3.2. İzolatların API test kiti sonuçları.	137
Çizelge 3.3. Moleküler tanılamaları yapılan izolatlardan elde edilen DNA'lara ait 260 nm ve 280 nm'deki absorbands değerleri.....	138
Çizelge 3.4. Oniki izolatın tanılama sonuçları.	155
Çizelge 3.5. İzolat 14SS, 22, 21, 14, 6Bi ve 5Bi'nin besiyerlerinde 660 nm'de zamana karşı gösterdiği absorbands değerleri.	157
Çizelge 3.6. İzolat 9Ba, 2SS, 4, 2, 8SS ve 12'nin besiyerlerinde 660 nm'de zamana karşı gösterdiği absorbands değerleri.	158
Çizelge 3.7. İzolatların 30°C'de 5 gün inkübasyon sonrasındaki hücre kuru ağırlıkları ve EPS verimleri.	165
Çizelge 3.8. 0-100 µg/ml aralıkta glukoz solüsyonlarının 490 nm dalga boyunda absorbands değerleri.	166

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.9. Bradford yöntemi ile 595 nm’de elde edilen absorbans değerleri.....	167
Çizelge 3.10. EPS’lerin toplam şeker ve toplam protein içerikleri.	169
Çizelge 3.11. EPS’lerin şeker kompozisyonları.	170
Çizelge 3.12. EPS’lerin emülsifiye edici aktiviteleri.....	172
Çizelge 3.13. EPS materyallerinin tek C kaynağı olarak kullanıldığında bakterilerin 620 nm’deki büyümeleri.	174
Çizelge 3.14. <i>B. cepacia</i> (izolat 14SS) EPS’si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi.	176
Çizelge 3.15. <i>P. fluorescens</i> (izolat 14SS) EPS’si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi.	177
Çizelge 3.16. <i>P. haemolytica</i> (izolat 21) EPS’si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi.	178

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

Çizelge

Sayfa

- Çizelge 3.17.** *S.dysenteriae* (izolat 14) EPS'si ilave edilen (%3lük)
besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve
48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi..... 179
- Çizelge 3.18.** *P.aeuginosa* (izolat 14SS) EPS'si ilave edilen (%3lük)
besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve
48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi..... 180
- Çizelge 3.19.** *A.hydrophila* (izolat 5Bi) EPS'si ilave edilen (%3lük)
besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve
48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi..... 181
- Çizelge 3.20.** *P.agglomerans* (izolat 9Ba) EPS'si ilave edilen (%3lük)
besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve
48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi..... 183
- Çizelge 3.21.** *S.paucimobilis* (izolat 2SS) EPS'si ilave edilen (%3lük)
besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve
48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi..... 184

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

Çizelge

Sayfa

Çizelge 3.22. *B.gladioli* (izolat 4) EPS'si ilave edilen (%3lük)

besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve

48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi. 185

Çizelge 3.23. *P.vulgaris* (izolat 2) EPS'si ilave edilen (%3lük)

besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve

48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi. 186

Çizelge 3.24. *O.anthropi* (izolat 8SS) EPS'si ilave edilen (%3lük)

besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve

48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi. 187

Çizelge 3.25. *Pseudomonas sp.* (izolat 12) EPS'si ilave edilen (%3lük)

besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve

48. saatlerdeki vizkoziteleri ve % vizkozite indirgenmesi. 189

KISALTMALAR DİZİNİ

EPS : Extracellular polysaccharides (Hücre dışı polisakkarit)

Gr (+): Gram pozitif

Gr (-): Gram negatif

DLVO: Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek Teorisi

LAB: Laktik asit bakterileri

KF: Kistik fibrozis

QS: Quorum-Sensing

QQ: Quorum-Quenching

AHL: Açillenmiş homoserin lakton

HPC: Heterotrophic plate count (heterotrofik petri sayımı)

SRBs: Sülfat indirgeyici bakteriler

PAD: Proton alıcısı ve vericisi

DD: Çift bağ yer değişimi

PM liyaz: Polimannuronat(= β -D-mannuronat) liyaz

PG liyaz: Poliglukuronat(= α -L-glukuronat) liyaz

GAGs:Glikosaminoglikanlar

AOC: Assimilable organic carbon (özümlenebilir karbon)

HMW polymer: Yüksek moleküler ağırlıklı polimer

ATCC American type culture collection

rRNA: Ribosomal RNA

HPLC: High performance liquid chromatography

ESP Ortamı: Enhancing of slime production (slime üretimini teşvik edici) medium

YNB Ortamı: Yeast nitrogen base ortamı

BSA: Bovine serum albumin (Sığır serum albümini)

DNS: 3,5-Dinitrosalisilik asit

NA: Nutrient agar

NB: Nutrient broth

1. GİRİŞ

1.1. Literatür Özeti

1.1.1. Polisakkaritlerin kimyasal yapısı ve sınıflandırılması

Polisakkaritler (glukanlar); çok sayıda monosakkarit veya monosakkarit türevi molekülün ard arda O-glikozid bağları vasıtasıyla bağlanmasıyla oluşmuş molekül yapısındaki karbohidratlardır. Doğada bulunan karbohidratların çoğu, yüksek moleküler ağırlıklı polimerler olan **polisakkaritler** halindedirler. Polisakkaritler, birbirlerinden zincirleri boyunca tekrarlayan monosakkarit ünitelerinin benzerliği, bu üniteleri bağlayan bağların tipi ve dallanma derecesi bakımından farklıdırlar. Şeker fosfatları ve şeker nükleotidleri içeren kondensasyon sonucunda polisakkaritler, di-, tri- ve tetrasakkaritlerin oluşumuna benzer bir yoldan monosakkaritlerden türevlenir. Polisakkaritlerin enzimler veya reaktiflerle hidrolizi moleküllerin ayrılmasını sağlar, fakat sonuçta ortaya çıkan ürünler heksozlar, pentozlar ya da bunların türevleridir. Polisakkarit terimi monosakkaritlerin sülfat esterlerine, üronik asitlere veya amino şekerlere eklenmesi ile sonuçlanan polisakkarit komplekslerini kapsama almak için yararlı olabilir (Gözükara, 1994; Altınışık, 2005).

Polisakkaritler tek tip monomerik ünite içeriyorsa **homopolisakkarit**, eğer tekrarlayan iki veya daha fazla farklı tip monomerik ünite içeriyorsa **heteropolisakkarit** adını almaktadır (Gözükara, 1994; Altınışık, 2005).

Homopolisakkaritler: Bunların bazıları, yakıt olarak kullanılan monosakkaritlerin depo formları olarak işlev görürler, bazıları ise bitki hücre duvarlarında ve hayvan dış kabuklarında yapısal elemanlar olarak işlev görürler. Dekstran, kurdlan, ksilan, galaktan (agar-agar galaktoz üniteleri), arabinan, fruktan (levan, inulin), bakteriyel selüloz, skleroglukan, pullulan, mannan, vb.

Heteropolisakkaritler: Bunlar tüm organizmalar için hücre dışı destek sağlarlar. Ksantan, asetan, aljinat, emülsan, jelan, velan, ramsan, süksinoglukan, hiyaluronik asit, peptidoglukan vb.

Mikroorganizmalar;

- Hücre içi (depo) polisakkaritler,
- Hücre dışı polisakkaritler (EPS) ve

-Yapısal formdaki polisakkaritler olmak üzere 3 ayrı polisakkarit türü sentezlerler (Ramesh ve Tharanathan, 2003.). Hücre dışı makromoleküller olarak duvar yapılarının bir komponenti biçiminde polisakkaritler (EPS) üretirler. Mikrobiyal hücre dışı polimerler, kapsül veya ortama salınmış **slime (slime layer=cıvık tabaka)** formundadır (Sutherland, 1985; Vuyst ve ark., 2001). Daha genel olarak **glükokaliks** terimi de kullanılmaktadır. Esas olarak glükokaliks hücre dışında polisakkarit de içeren yapışkan materyal olarak ifade edilir. Fakat çok sayıda polisakkarit yanında glükoproteinleri, polialkoller ve aminoşekerleri de içerir. Eğer glükokaliks bakteri hücre duvarı dışında 0,2-10µm kalınlıkta, sert, çini mürekkebi ve nigrosin gibi boyaları geçirmeyen, suda çözünemediğinden üretildiği hücreden uzağa gidemeyen, özel boyama yöntemleriyle ışık mikroskopunda görülebilir karakterde ise **kapsül**, bu tabaka ışık mikroskobu ile görülemeyecek kadar ince ise **mikrokapsül**'dür. Eğer glükokaliks birçok hücrenin müşterek bir matriks içinde gömüleceği kadar çok yaygın ve gevşek ise, çini mürekkebi geçirebiliyorsa, suda kolayca eriyip ortamda çözünüyor hatta organizmanın kültürünün yapıldığı sıvı besiyerinin viskozitesini önemli ölçüde arttırıyorsa **slime layer** tarzındadır (Çotuk, 1990; Bilgehan, 1996; Madigan ve ark., 2000).

Mikrobiyal polisakkaritler başlıca 3 ana kategoriye ayrılabilir. Bunlar:

Tip 1 zincirli polisakkaritler; Sialik asit tek bir tip şekerden oluşan linear zincirli iyonik mikrobiyal polimerdir. Aynı zamanda hiyaluronik asit; D-glukuronat ve D-glukozamin'in düzenli polimeridir. Sialik asit doğal olarak düşük molekül ağırlığına sahip iyonik mikrobiyal polimerlerdir. Bakteriyal aljinatlar, L-glukuronik asit ve D-mannuronik asitin düzensiz kopolimeridir. Ancak L-glukuronat içeriği ve zincirler boyunca monomer dizisi farklıdır.

Tip 2 zincirli polisakkaritler; bir veya iki nötral şeker birimlerinin birleşmesinden ibaret yan gruplara sahip olan zincirlerdir. Velan ve ramsan nötral yan grupları olan polisakkaritlerdir.

Tip 3 zincirli polisakkaritler; yüklü yan grupları olan şişkin zincirlerdir. Ksantan ve süksinoglukan sadece yan zincirler üzerinde karışık yükler oluşturan endüstriyel polimerlerdir. İyi bilinen ksantan ve süksinoglukan bunlara örnektir (Crescenzi et al, 1991).

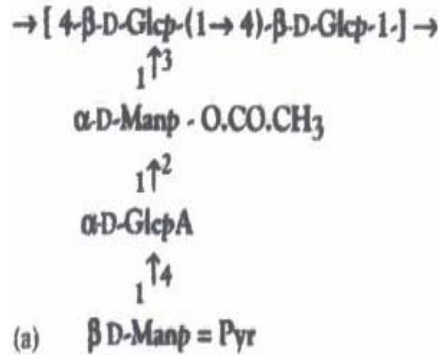
1.1.2. Endüstriyel öneme sahip bazı mikrobiyal polisakkaritler

1.1.2.1. Ksantan ve asetan

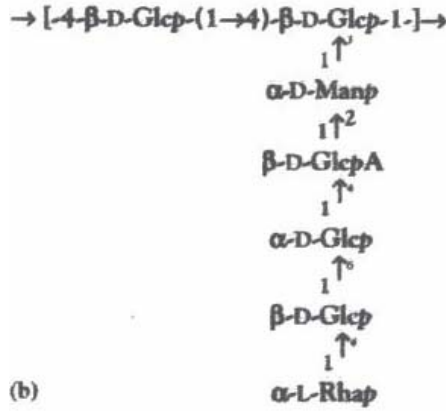
Ksantan fitopatojenik bir bakteri olan *Xanthomonas campestris pv campestris* tarafından üretilen endüstriyel amaçlı en çok kullanılan bakteriyel EPS'lerdendir. Ksantanın, özellikle inceltici, jelleştirici ve emülsifiye edici ajan olarak kullanım alanları vardır. Daha önce *Phytomonas* olarak bilinen *Xanthomonas* cinsinden *X.campestris* (Çetin, 1983; Sutherland, 2001a), *X.phaseoli*, *X.malvacearum* ve *X.corotae*'nın en iyi ksantan üreticileri olduğu belirlenmiştir. Ksantan, selülozik bir omurgaya sahip C-3 pozisyonunda trisakkarit bir yan zincir [β -D-Manp-(1,4)- β -D-GlcpA-(1,2)- α -D-Manp-(1]

taşıyan bir pentasakkarit biriminin tekrarlanmasıyla oluşur: $[4\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1,4)-}\beta\text{-D-Glcp-(1)]_n$ (Şekil 1.1). *X.campestris*'in mutant strainlerinde tespit edilen diğer polisakkaritler ve *Acetobacter xylinum*'dan elde edilen asetan **ksantan benzeri polisakkaritler** olarak adlandırılırlar (Ojnnaka ve ark., 1996; Michaud ve ark., 2003). Tüm bu polimerlerin ortak özelliği sahip oldukları selülozik omurgalarıdır. Ksantanın yan zincirleri ile *Klebsiella* K5, *E.coli* K55'in ve *Pseudomonas gingeri*'nin dorusal EPS'leri arasında yapısal homoloji tespit edilmiştir (Garcia-Ochoa ve ark., 2000).

Ksantanın, nispeten düşük konsantrasyonları yüksek visköz solüsyonlar oluşturmakta ve bu visköz özellik artan sıcaklıklarda da fazla değişmemektedir (Sutherland, 2002). Ksantan, onun ticari üretimi ve bu gibi yegane fiziksel özelliklerinden dolayı büyük bir ilgi odağı olmuştur. *X.campestris*'den üretilen orijinal ürün 1 mol asetat ve yaklaşık 1/3 mol piruvat içeren tekrarlayan bir pentasakkarit içermesine rağmen bazı yabancı-tip strainlerde üretilen ürünler az miktarda asetat ve piruvat içerirler. Ksantanın açıl içeriği ve fiziksel özellikleri bakterilerin büyümelerindeki fizyolojik koşullara bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, mutant bazı türlerinde polisakkarit yapısındaki D-glukoz:D-mannoz:D-glukuronik asit oranları 2:1,7:1-2:0,64:0,48 aralığında saptanmıştır (Melton ve ark., 1976; Sutherland, 1985).



Şekil 1.1. *X. campestris*'e ait ksantan yapısı.



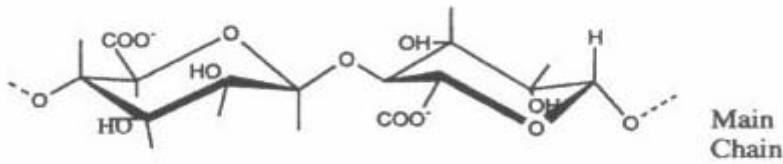
Şekil 1.2. *A. xylinum*'a ait asetan yapısı.

1.1.2.2. Aljinat

Aljinatlar Pseudomonadaceae ve Azotobacteriaceae fam.'larına ait bakteriler tarafından üretilen veya denizsel kahverenkli alglerden (Phaeophyceae'nın hücre duvarı ana bileşeni) ekstrakte edilen bir polisakkarit grubudur. Bakteriyal aljinatlar özellikle *Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya ait ürünlerdir. Aljinatlar β -(1,4)-D-mannuronik asit (M) ve onun C-5 epimeri olan α -(1,4)-L-glukuronik asidin (G) asetillenmiş bir kopolimeridir (Şekil 1.3) (Gimmestad ve ark., 2003; Michaud ve ark., 2003). Aljinik asit, aljinat tuzlarının ve liflerinin üretiminde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Aljinik asit soğuk suda çözünmez, şişer. Sıcak suda az çözünür. Alkali metallerle tuz oluşturur. Karbonatlardan CO_2 açığa çıkarır. Na-aljinat emülgatör, süspansiyon stabilizatörü, tablet dolgu maddesi halinde eczacılıkta kullanılır (Altınışik, 2005). Bakteriyal ve algal aljinatlar arasındaki başlıca farklılıklar C-2 (başlıca) ve/veya C-3 pozisyonundaki D-mannuronik asit üniteleri üzerinde 0-asetil parçalarının varlığına bağlıdır. Hatta bakteriyal aljinatın moleküler ağırlığı algal aljinattan daha büyük olup GM sekansları polimer orijine göre çeşitlilik gösterir. Pseudomonad'ların poliglukuronik asit bloklar üretmediği düşünülmektedir.

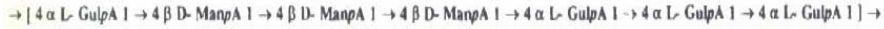
Buna karşın *Azotobacter* ve alg aljinatları arasında önemli benzerlikler belirlenmiştir. Değişik kaynaklardan alınan aljinatlarda G ve M blokların dağılımı ve uzunluğu arasındaki sayısal kombinasyonlar ve farklı fizikokimyasal özellikler gözlenebilmektedir (Şekil 1.4). Ekonomik sebeplerden dolayı ticari aljinatlar daha çok algal kökenlidir (Sutherland, 1995). *A.vinelandii*'nin vejetatif hücre kapsülü ve mikrokistin dış kabuğunda aljinata rastlanılmış, buna bağlı olarak aljinat üretmeyen mutantlarda mikrokist oluşumunun da engellendiği belirlenmiştir. Mannuronik asit:Glukuronik asit oranlarındaki farklılıkların aljinatın kist içi ve dışındaki konumlarındaki farklılıktan kaynaklandığı vurgulanmıştır. Düşük Ca^{++} içeren ortam yüksek polimannuronik asit polimerine neden olmaktadır (Sutherland, 1985).

Aljinatların kistik fibrozis'de (KF), mukoid *P.aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunun stabilitesi ve abiyotik yüzeylerde yaşayabilmesinde önemli role sahip olduğu ortaya konmuştur (Şener, 2002).



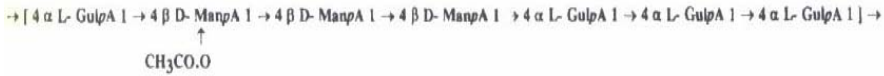
Şekil 1.3. Aljinatın (poly β-D-mannuronat) yapısı.

Algal alginates



Bacterial alginates

Azotobacter vinelandii

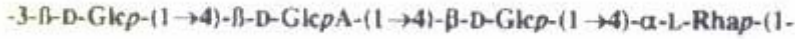


Şekil 1.4. Farklı tiplerde aljinat yapıları.

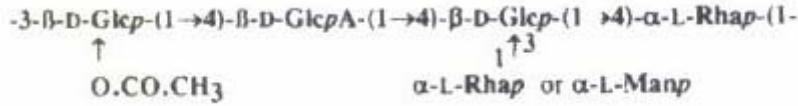
1.1.2.3. Jelân, velân ve ramsan

Jelân *Sphingomonas paucimobilis* (*S. auromonas*=*Pseudomonas elodea*) tarafından üretilen doğal bir EPS'dir (Hashimoto ve ark., 1998; Nampoothiri ve ark., 2003). Bugün kimyasal olarak ise deasetilasyon ile üretilen ticari bir polisakkarittir. D-glukuronik asit ünitesine komşu 3-O-bağlı glukosil parçası üzerindeki 2 açıl grubu (asetat ve gliserat)'nın yerini almasıyla oluşur: [3)-β-D-Glcp-(1,4)-β-D-GlcpA-(1,4)-β-D-Glcp-(1,4)-α-L-Rhap-(1,]_n. Başka bir ifadeyle jelân; D-glukoz (Glc), D-glukuronik asit (GlcA) ve L-ramnoz (Rha)'un 2:1:1 oranında birleşmesiyle oluşan tekrarlayan linear bir tetrasakkarit biriminden oluşmuştur (Şekil 2.5) (Hashimoto ve ark., 1998; Michaud ve ark., 2003). Deasetillenmiş olana göre, doğal jelân formları termoreversible, yumuşak ve elastik jel olup aljinat jellerle benzerlik kurulabilir. Mükemmel bir jelleştirici ajan olup agardan daha düşük miktarlarda dahi iyi jel oluşturma özelliği gösterir (Sutherland, 1997; Sutherland, 2001b).

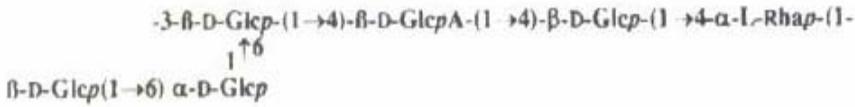
Jelan ile yapısal olarak yüksek benzerlik gösteren farklı polisakkaritler de tanımlanmış ve **jelan-benzeri polisakkaritler** veya **sphinganlar** olarak adlandırılmıştır. Bu polisakkaritler başlıca *S.paucimobilis* tarafından üretilmekte olup, benzer trisakkarit sekans temel omuru üzerinde [3]- β -D-Glcp-(1,4)- β -D-GlcpA-(1,4)- β -D-Glcp-(1,4)- α -L-Xp-(1)]_n (X:Rha veya Man) tekrarlayan birimi şeklindedir (Şekil 1.5). Jelân benzeri polimer farklılıkları yan zincirlerin içerdiği monosakkarit veya disakkaritlerden kaynaklanır. Örneğin, velan için 0-asetilasyonu, 3 bağlı Glcp parçasının C-2 pozisyonu üzerinde yer alır (Michaud ve ark., 2003).



(a) Jelân sakızı



(b) Velan sakızı (S130)

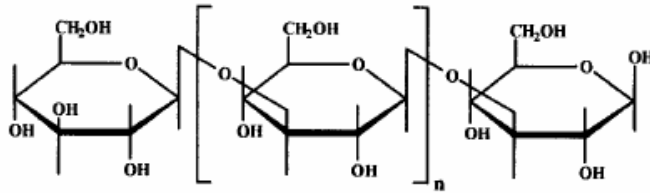


(c) Ramsan sakızı (S194)

Şekil 1.5. *Sphingomonas sp* 'ye ait jelân ve jelân-benzeri polisakkaritlerin yapısı.

1.1.2.4. Kurdlan ve benzeri polisakkaritler

Kurdlan da jel oluşturma kapasitesine sahip mikrobiyal polisakkaritlerden birisidir. Düz (α -1,3) D-glukan'dan oluşan kurdlan (Şekil 1.6), *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* ve ilgili bakterilerden elde edilir. Bazı *Agrobacterium radiobacter*, *A.rhizogenes* ve *Rhizobium trifolii* strainleri tarafından da kurdlan tipi polisakkaritlerin sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir. Özellikle azot-sınırlı kesikli kültürlerde geç duraklama fazındaki hücrelerden yüksek miktarlarda sentezi sağlanmıştır. Soğuk suda çözünmemesine rağmen, 54°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda sabit jel oluşturur. Jelin dayanıklılığı, kullanılan sıcaklığın derecesine bağlıdır. Jel, polisakkaritin alkali solüsyonunun suya karşı dializ olmasıyla elde edilir. Jelin dayanıklılığı 60-80°C arasında sabitken, 80-100°C arasında artmaktadır. Aynı zamanda jelin dayanıklılığının yüksek sıcaklıktaki tutulma süresinden bağımsız olduğu da belirlenmiştir. 120°C'nin üzerinde ısıtılması, moleküler yapısının tek heliksten üç zincirli helikse dönüşmesine neden olmaktadır. Kurdlan jeli, agar ile jelatin arasında bir malzemedir (Sutherland, 1993; Nishinari ve ark., 2000).



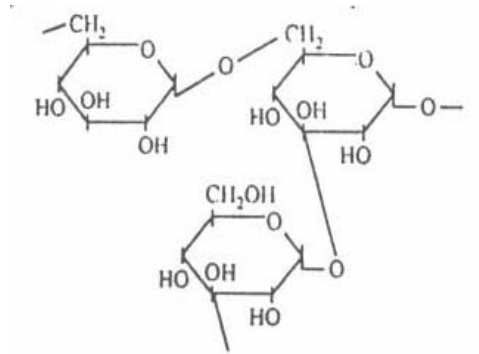
Şekil 1.6. Kurdlanın yapısı.

2.1.2.6. Laktik asit bakterileri (LAB) EPS'leri

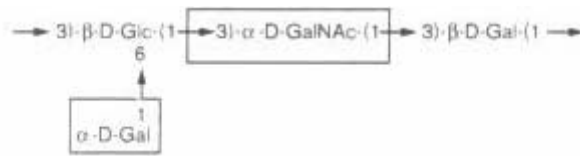
Çeşitli LAB'lar ve ürettikleri polimerler Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir. *Streptococcus mutans* tarafından üretilmiş α -glukanın yapısı Şekil 1.8'de, *S.thermophilus* Sfı6'ya ait EPS'nin yapısı Şekil 1.9'da, *Lactobacillus lactis* NIZOB40'a ait EPS'nin yapısı Şekil 1.10'da görülmektedir.

Çizelge 1.1. Çeşitli LAB'lar ve ürettikleri polimerler (Kılıç ve Karagözlü, 1996a).

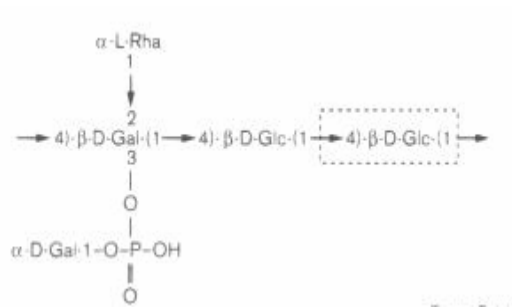
Tür	Üretilen polimer
<i>Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus</i> <i>L. kilgardi</i> <i>L. casei</i> <i>L. lactis sp. lactis</i> <i>L. lactis sp. cremoris</i>	Değişik şeker içeriklerine (başlıca glukoz, galaktoz olmak üzere daha az olarak fruktoz, ramnoz, mannoz, ksiloz, arabinoz, pentoz vb.) sahip heteropolisakkaritler
	Homopolisakkaritler
<i>S. salivarius sp.</i>	α -glukan ya da β -fruktan (levan)
<i>S. mutans</i>	α -glukan ya da β -fruktan (inulin)
<i>S. sobrinus</i>	α -glukan ya da β -fruktan (levan)
<i>S. sanguis</i> <i>S. thermophilus</i>	α -glukan
<i>Leuconostoc mesenteroides sp. mesenteroides</i> <i>L.mesenteroides sp. cremoris</i>	Dekstran



Şekil 1.8. *Streptococcus mutans* tarafından üretilmiş α -glukanın yapısı.



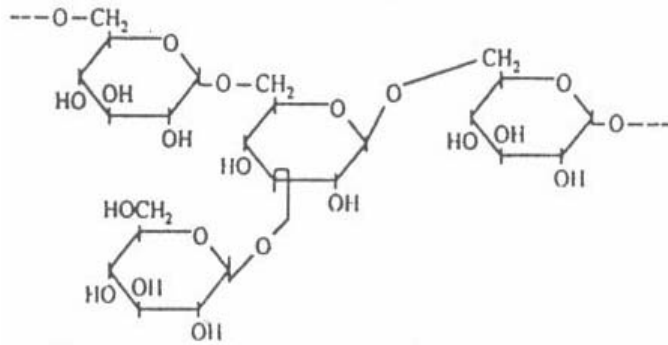
Şekil 1.9. *S. thermophilus* Sfi6'ya ait EPS'nin yapısı.



Şekil 1.10. *Lactobacillus lactis* NIZO B40'a ait EPS'nin yapısı.

1.1.2.6.1. Dekstran

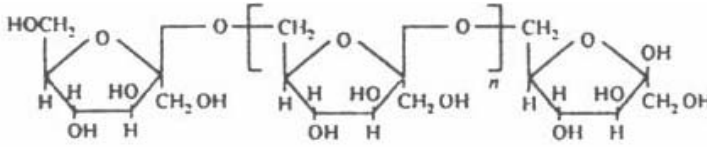
Dekstranlar bakterilerin sakkarozu fermentasyonu sonucu elde edilirler. En iyi ürün verimi *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512'dan elde edilmiştir. Bu bakterinin meydana getirdiği dekstranda %95 oranında 1-6 glikozidik bağlar bulunur (Şekil 1.11) ve ABD'de standart olarak kabul edilmiştir. *L.mesenteroides* strainlerinin dekstranlarının ortak özellikleri 2, 3 ve 4 pozisyonunda dallanmaları yanı sıra 1,6 glikozik bağlarının baskın olmasıdır (Matsuda ve Kobayashi, 1978). Söz konusu dekstran, düşük sıcaklıkta (5°C'de) yumak şeklinde, 30°C'de ise küresel ve yoğun bir hal alır. 25°C'de ikisi arasında bir karakterdedir (Çetin, 1983; Kılıç ve Karagözlü, 1996b). Dekstranların moleküler ağırlıkları çok yüksektir. İstenen molekül ağırlığındaki dekstranlar kısmi hidroliz sonucu elde edilir (Altınışık, 2005, Sutherland, 1993).



Şekil 1.11. *L.mesenteroides* dekstranının yapısı.

1.1.2.6.2. Levan

Bacillus subtilis, *B polymyxa*, *Aerobacter levanicum* ve *Pseudomonas* ile *Corynebacterium* cinsinden bakterilerin bazı türleri polifruktan yapısında, ayrıca *Streptococcus salivarius* ve *S.sobrinus* ise β -fruktan yapısında levan sentezleyebilirler (Şekil 1.12). Levan biyosentez mekanizması, sakkarozdan sentezlenen dekstran sentez mekanizmasına benzer. *B.subtilis*, levansakkaraz ekzoenzimini sentezler, bu enzim de sakkaroz molekülünden fruktoz kısmını levanın büyüyen zincirine doğru götürür. Levan sadece sakkaroz ve rafinozdan elde edilebilmektedir. Sakkarozdan elde edilen levan verimi, rafinozdan elde edilene göre 2 kat daha yüksektir. Akseptör veya ön maddeler kullanıldığında, levan veriminin %44'den %60'a yükseldiği saptanmıştır (Çetin, 1983).



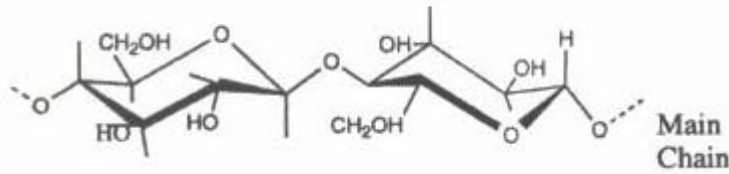
Şekil 1.12. Levanın yapısı.

1.1.2.7. Emülsan

Emülsan, bir *Acinetobacter calcoaceticus* straininden temin edilen kuvvetli emülsifiye edici aktiviteye sahip EPS'dir. Emülsan, D-galaktoz, bir aminoşeker ve bir aminoüronik asitten oluşmuş heteropolisakkarit bir omurgaya sahip kompleks bir moleküldür. Emülsan, hücre dışı yüzeyinde birikir ve duraklama fazından ya da protein sentezinin inhibisyonundan sonra salınabilir (Shoham ve Rosenberg, 1983; Panilaitis ve ark., 2002).

1.1.2.8. Bakteriyal selüloz

1886 yılında Brown, *Acetobacter xylinum* straininin uygun bir besiyerinde kültürü yapıldığında selüloz sentezlendiğini keşfetmiştir (Çetin, 1983, Sutherland, 2001a). Daha sonraları üretilen bakteriyal selülozun biyoteknolojik açıdan yüksek bir değere sahip olduğu hatta bitkisel selüloz gibi kullanımının yaygınlaşabileceği bildirilmiştir (Sutherland, 1998; Sutherland, 2002). Bir süre sonra *Acetobacter pasteurianum*, *A.rancens*, *Sarcina ventriculi* ve *Bacterium xyloides*'in de selüloz sentezledikleri saptanmıştır (Şekil 1.13). Aynı zamanda bu sentez için en uygun besiyeri içeriği (%5-10 heksoz; %0,1 asparagin; %0,5 KH_2PO_4 ; %0,1 NaCl ve %0,5 etanol) ve en uygun inkübasyon koşulları (30°C'de 10 gün) da belirlenmiştir. Bakteriyal selülozların, bitkisel selülozlara nazaran üstünlükleri; pektin maddeleri, lignin ve hemiselüloz içermemeleridir (Çetin, 1983; Yamanaka ve ark., 1989).

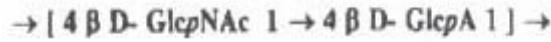


Şekil 1.13. Bakteriyal selülozun yapısı.

1.1.2.9. Hiyaluronik asit

Hiyaluronik asit (HA) olarak da adlandırılan hiyaluronan yüksek canlılarda birçok dokuda (deri, kıkırdak, beyin) ve doku sıvılarında, streptokoklar gibi bakterilerin kültür ortamlarında (kapsüler polisakkarit) bulunurlar. Onun, sülfatlanmamış tekrarlayan disakkarit birimi β -D-N-asetil-

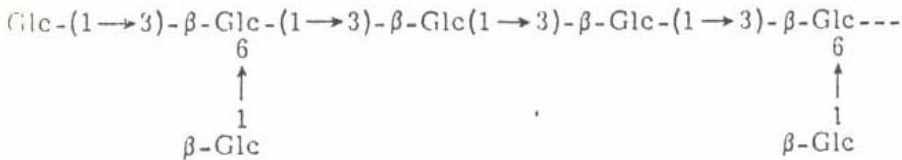
glukozamin ve β -D-glukuronik asit $[3)\text{-}\beta\text{-D-GlcNAc-(1,4)-}\beta\text{-D-GlcA-(1)]_n$ 'in bir birleşimi olup GAG (glikosaminoglukan)'ların en basiti ve stabili olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.14). Hiyaluronanın orijini ne olursa olsun yapısı aynıdır (Jedrzejewski, 2000; Sutherland, 1995). En pahalı bakteriyal polisakkarit ürünü hiyaluronik asit'dir. Biyoteknolojik olarak *Streptococcus equi*, *S.epizooticus* veya yakın türlerden elde edilir (Sutherland, 2002).



Şekil 1.14. Bakteriyal kaynaklı hiyaluronik asitin yapısı.

1.1.2.10. Skleroglukan

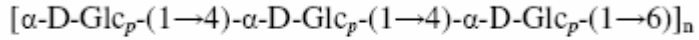
Bir fungus cinsi *Sclerotium sp.* ve ilişkili cinslerden üretilen EPS'ler skleroglukan olarak adlandırılır. Polimer, temel olarak $\beta(1-3)$ bağlı D-glukandır. Bu glukanın esas zincirinin yaklaşık her üç parçasında bir tekil D-glukopiranosil grubu, $\beta(1-6)$ ile bağlanmaktadır (Şekil 1.15). Moleküler ağırlık önemli oranda değişebilir ve polimerizasyon derecesinin yaklaşık olarak 110-1600 aralığında olduğu belirtilmiştir. Solüsyon içerisinde yüksek viskozitesinin olması, yüksek sıcaklıkta, uç pH noktalarında ve elektrolit içerisinde stabilitesini kaybetmemesi genel karakteridir (Sutherland, 1993).



Şekil 1.15. Skleroglukanın yapısı.

1.1.2.11. Pullulan

Pullulan, bir fungus türü olan *Auerobasidium pullulans*'dan elde edilen hücre dışı polisakkarit bir α -D-glukan'dır. Maltotrioze ve maltotetraoze ünitelerinden (α -1,4 bağlı) oluşan α -D-glukan, α -1,6 bağıyla polimer oluşturur (Şekil 1.16). Bu polimerin moleküler ağırlığı, kültürün içinde bulunduğu şartlara bağlıdır (Sutherland, 1993; Sutherland, 1998).



Şekil 1.16. Pullulanın yapısı.

EPS'ler pek çok ilginç fiziki, kimyasal ve reolojik (sıvı haldeki özellikleri) özelliklerinden dolayı yeni biyomateriyaller gibi hareket ederler ve endüstride oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Endüstriyel öneme sahip mikrobiyal polisakkaritlerin uygulama alanları (Çetin, 1983; Sutherland, 1993; Kılıç ve Karagözlü, 1996a; Sutherland, 1996b; Sutherland, 1997; Sutherland, 1998; Van Kranenburg ve ark., 1999; Sutherland, 2001a; Sutherland, 2002'den derlenmiştir).

Polisakkarit	Uygulama
Ksantan	Gıdalarda emülsifiye edici, stabilizer, kıvam arttırıcı ajan olarak, Gıdalarda kristalizasyon inhibitörü olarak, Gıdalarda, yangın söndürücülerde köpük stabilizasyonunda, Petrol kuyusu delicilerinde ve püskürtmeli kartuşlu yazıcılarda viskozitenin kontrolünde, Suyun berraklaşması, temizlenmesinde, Özellikle et ürünlerinde tatlandırıcı, Bazı boyaların stabilizasyonu ve süspansiyonu amacıyla, Petrol kuyularından yayılmayı önlemede ve patlayıcılarda jelleştirici olarak, Tekstil sanayinde, Kozmetiklerde, diş macunlarında, kremlerde kıvam arttırıcı olarak vb.
Asetan	Yoğunlaştırıcı olarak, Jelleştirici olarak vb.
Aljinat	Gıda sanayiinde, Farmakolojide vb.
Jelan ve benzeri EPS'ler (velan, ramsan vb. sphinganlar)	Gıdalarda jelleştirici ajan olarak, Bitki biyoteknolojisi ve bakteriyel kültür ortamlarında jelleştirici ajan olarak (jelrit=fitojel), Hücre ve enzim teknolojisinde jelleştirici olarak vb.
Kurdan ve benzeri EPS'ler	Gıdalarda jelleştirici ajan olarak, Oligosakkarit eldesinde, Tersiyer petrol kazanımında vb.
Süksinoglukan ve benzeri EPS'ler	Sondaj sıvılarında, Tersiyer petrol kazanımında vb.
LAB EPS'leri	Yoğunlaştırıcı olarak, Nemlendirici olarak, İmmunostimülatör aktivite amacıyla, Antitümöral aktivite amacıyla, Kolesterol düşürücü aktivite amacıyla, Özellikle süt ürünlerinde istenen dokunun oluşumunda vb.

Çizelge 1.2. (devam)

Dekstran	Antibiyotiklerin dışlarının kaplanması, Gıda endüstrisinin atık sıvı ve sularından protein elde edilmesinde, Gıdaların dışlarının kaplanması, Tekstil sanayinde kumaş üzerine desen basmada, Absorbant olarak, Jellerde, katılaştırmada, Molekül ağırlığı 70.000 olan dekstran fizyolojik serum olarak, %6'lık dekstran çözeltisi sentetik kan plazması olarak özellikle kan kayıplarında, Mol. Ağı. 40.000 olan dekstran kan hacmi arttırıcı olarak, Demir-dekstran kompleksleri anemilerde, Kalsiyum-dekstran kompleksleri kalsiyum eksikliğinde, Ameliyat ipliği yapımında vb.
Levan	Yoğunlaştırıcı olarak, Nemlendirici olarak vb.
Emülsan	Sıvılaştırıcı, çözücü, aşılarda adjuvant olarak
Bakteriyal selüloz	Yaraların bandajlanmasında sargı malzemesi olarak, Yüksek kalitede akustik-diyafra membranlarda, Seramik tozlarında ve tuzlarında bağlayıcı olarak vb.
Hiyaluronik asit	Kozmetikler ve farmasötiklerde nemlendirici olarak, Cerrahi operasyonlarda vb.
Skleroglukan	Sondaj sıvılarında, Süspansiyonlarda, Tersiyer petrol kazanımında, Jelleştirici ajan olarak, Oligosakkarit eldesinde vb.
Pullulan	Gıda kaplamalarında, Filmlerde, Oligosakkarit eldesinde vb.
Genel olarak glukanlar	Antitümöral aktivite amacıyla, Konukçu-bağışıklık sisteminin arttmasında etki nedeniyle bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı vb.

1.2. Mikrobiyal Biyofilmlerde EPS'ler

Glikokaliks gibi polimerik yapılardan oluşmuş cıvık matriks içerisinde substrata kaynaşmış ve yüksek oranda fonksiyonlaşmış hücreler topluluğu **biyofilm** olarak adlandırılır (Cooksey, 1992). Özellikle ıslak yüzeylerde oluşan mukoid yapılardaki biyofilm bakterilerinin fenotipik olarak planktonik hallerinden farklı oldukları bildirilmiştir. Bu farklılıktan yola çıkarak, bu mukoid topluluklara, İngilizce canlı tabakalar anlamına gelen biofilm isimlendirmesi uygun görülmüştür (Brock, 2003). Mikrobiyal biyofilmlerin temel yapısal bileşeni **EPS**'dir. Biyofilmin mikrobiyal hücreler ve EPS ana iskeletinden oluştuğu, EPS'nin toplam organik karbonun %50-90'ını barındırarak matriksi oluşturduğu kabul edilmiştir (Lazarova ve Manem, 1995; Sutherland, 2001b; Donlan, 2002). Sözü edilen matriks, yani EPS, terminolojide **hücre dışı polimerik maddeler**, **ekzopolisakkaritler** ya da **ekzopolimerler** terimlerinin karşılığı olarak kullanılmaktadır. EPS, biyofilm tabakasında bakterilerin hücre dışına saldıkları maddelerdir ve bakterileri bir arada tutan çimento gibi düşünülmektedir (Zhang ve ark., 1999). Biyofilmin fiziksel özellikleri büyük oranda EPS tarafından belirlenir. EPS biyofilmlerde birçok özelliği etkileyebilir ve kontrol altına alabilir (Allison, 2003).

EPS'nin içeriği belli bir sabitlik göstermeyip; büyüme koşulları ve çevresel streslerce değişkenlik halindedir. Birçok strain, straine özgü tek bir EPS'den ziyade yaşamları boyunca kompozisyonlarında değişimlere uğrayabilen farklı EPS'ler de üretebilmektedir. EPS'ler farklı biyofilm komünitelerinde yapı ve fonksiyon bakımından değişik rollere sahiptir. Biyofilmlerin yeryüzündeki en eski yaşam formlarından birini temsil etmeleri ve ekstrem çevrelerde dahi bulunabilmelerinin mikrobiyal hücreler açısından önemli avantajlar sağladığının işaretleri olduğu düşünülmektedir (Cooksey, 1992;

Sutherland, 2001c; Donlan, 2002; Fang ve ark., 2002; Allison, 2003; Brock, 2003; Chapman, 2003; Jefferson, 2004). Biyofilmin yapısal temelini oluşturan EPS özellikle;

1. Çeşitli substratlara adhezyonda rol oynar.

2. Biyofilmin kohezyonundan sorumlu kuvvetleri sağlar.

3. Hücre için gerekli besin maddelerini, iz miktardaki organik molekülleri, iyonları bağlayabilir. Aşırı besinsizlik durumunda, bakterilerin kendilerinin ya da diğer türlerin ürettiği EPS tabakasını yıkarak beslenme amacıyla tükettikleri de bilinmektedir. Kalın bir biyofilm, yoğun bir yerleşim alanına benzer. Bakterinin böyle bir çevrede nasıl bölünebildiğini hayal etmek zordur. Onları çevreleyen EPS matriks nedeniyle populasyon bölünmesi sınırlanmaktadır. Bu durum, biyokatalitik mühendisliği uygulamalarında kullanılan polimer-kaplı (immobilize) bakterilere (hücrelere) benzer ve bakteri bölünmesi örtüsünden ayrıldıktan sonra görülebilir. Büyük olasılıkla olgun bir biyofilimde hücre bölünmesi sık olmamakta ve hücrenin aşırı enerji yerine, hücrenin sindirebileceği ve ihtiyaç anında kullanabileceği bir EPS (yenilenebilir bir iskelet) yapılmaktadır. Böylece hücre membranı yolu ile kısa süreli enerji deposu olarak da iş görebilir (Christensen, 1989).

4. Jelimsi fakat yüksek oranda hidratlanmış polisakkarit varlığından dolayı kuraklığa, parçalanmaya, pH dalgalanmalarına karşı ayrıca antibiyotikler, biositler, ağır metaller, rekalsitranlar gibi toksik bileşiklerin penetrasyonuna karşı hücreleri fiziksel olarak korur. Şöyle ki, Ophir ve Gutnick (1994); *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Erwinia stewartii*'nin mukoid ve non-mukoid strainlerinin kurumaya karşı dirençliliklerini karşılaştırmışlardır. Sonuçta her 3 EPS-üretici mukoid strainin kuruma koşulları altında daha uzun süre yaşamlarını sürdürdükleri gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada U.V, radyasyon

ve diğ er DNA'yı tahrip edici bazı ajanların bir EPS olan aljinat ile immobilize edilmesiyle *Vibrio fischeri*'nin bu hasardan korunduğı tespit edilmiştir. EPS'lerin üretiminin, *Klebsiella aerogenes*'in bakır ve kadmiyum iyonlarının toksik etkisinden korunduğı gözlenmiştir (Davey ve Ootoole, 2000). Corpe (1975), benzer bir direncin, EPS  retici deniz bakterilerince bakıra karşı görüldüğü vurgulanmıştır. Angell ve Chamberlain de *Sphingomonas paucimobilis*'in ortamda bakır varlığında daha fazla miktarda polisakkarit polimerleri ürettiğini saptamıştır (Davey ve Ootoole, 2000).

5. Biyofilm içindeki hücreler arasında iletişim vasıtası olarak, Quorum-Sensing (QS) sinyallerinin iletiminde ve böylece sintrofik ilişkilerin kurulması için ideal bir ortam sağlar. Bu birliktelikler en çok metanojenik par alamalarda incelenmiştir. Bryant ve ark. tarafından böyle bir ilişkiye örnek 1967'de iki farklı mikroorganizma straininin (strain S ve strain M.o.H) karışık kültüründe sintrofik olarak türler arasında hidrojen transferi ile etanol, asetat ve metana dönüştürülmüştür. Bu iki fermentatif bakteri tek başına etanolde büyüyüp az bir enerji elde ederken, bir aradayken ise daha fazla enerji temin ederler.

Biyofilmlerde sinerjistik etkilerin de gelişmesiyle tek başına yaşayan mikroorganizmalara göre daha yüksek biyosit konsantrasyonlarına dayanıklılık gösterebilirler (Davey ve Ootoole, 2000).

6. Genetik materyalin hücrelerarası transferini gerçekleştirebilir. Yeni gözlenen bazı plazmitlerin denizsel çevrelerdeki biyofilmlerden izole edildiğı bildirilmiştir. Bir *Pseudomonas putida* straininin civa rezistanslığına biyofilm ortamından temin ettiğı plazmitlerden sağladığı belirlenmiştir (Dahlberg ve ark., 1997).

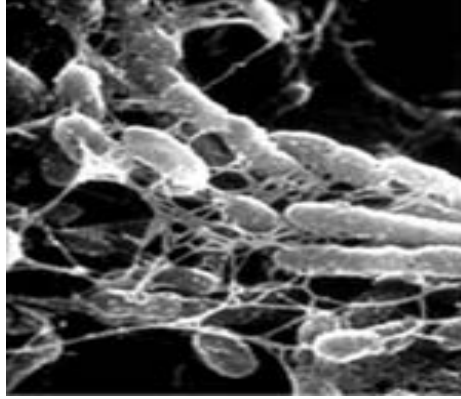
Başka bir çalışmada; *B.subtilis* straininde tespit edilen konjugatif transpozonun sürekli derin fermentörde üretilen dental plak biyofilmindeki *Streptococcus* türlerine geçtiği, sonuçta bu bakterilerin tetrasiklin direncine sahip hale geldiği gözlenmiştir. Bu bulgular, non-oral bakterilerden oral kommensallere gen transferinin varlığını işaret eder (Roberts ve ark., 1999).

Diğer bir çalışmada; Lebaron ve ark. (1997), bir reaktörde cam boncuklar üzerinde genetik olarak modifiye edilmiş (GMO) *E.coli* strainlerinden oluşan biyofilmlerde aralarında plazmit transferi olduğunu saptamışlardır. Reaktöre geliş güzel verilen pCE325 (oriT⁺), pUB2380 (mob⁺), R388 (tra⁺) plazmitlerini içeren verici bakteriler ile biyofilmler muamele edilmiştir. Sonuçta; bu plazmidleri içeren konjugantların varlığı ve biyofilm popülasyonuna taşındıkları gözlenmiştir.

Yine doğadaki biyofilmlerdeki bakteriyal büyümenin faj lizisine çok daha dayanıklı olduğu, biyofilme göre seçici etkide bulunduğu da belirlenmiştir. Yapılan birçok araştırma ile, biyofilmlerde genetik materyalin hücreler-arası aktarımında etkili yapının EPS olduğu tespit edilmiştir (Allison, 2003).

7. Patojenik bazı durumlarda konak canlının makrofajlarının bağlanması ve antikorların penetrasyonuna karşı hücreleri korur. Birçok potansiyel insan patojeninin (*L.pneumophila*, *Cryptosporidium* sp., *Mycobacterium* sp, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *E.coli*, *Staphylococcus* sp., *Helicobacter pylori*, *Rotavirus*, *Giardia*, enteroviruslar, mikoplazmalar, amip gibi protozoonlar, *Candida* sp. vb.) biyofilmlerle ilişkili olduğu saptanmıştır (Costerton ve ark., 1999; Peter, 1999; Watnick ve Kolter, 2000; Donlan, 2001; Donlan, 2002; Douglas, 2003).

8. Özellikle yüksek moleküler ağırlığa sahip EPS'ler koloni stabilizasyonu ve kararlılığında büyük rol oynar.



Şekil 1.17. Hücre dışı matriksteki (EPS) mikrokolonilerin skanning elektron mikroskopik görüntüsü (Allison, 2003)

Biyofilm mikroorganizmaları yüzeye tutunduktan sonra çevresel koşullara bağlı olarak insanlar ve çevre açısından yararlı veya zararlı faaliyetler gösterebilirler (Allison, 2003) .

1.2.1. Yararlı biyofilm faaliyetleri

Biyoteknolojik bazı reaktörler biyofilm üretimini artırıcı bir biçimde dizayn edilirler ve çamur, endüstriyel atıklar, kontamine yeraltı suları gibi çevresel atıkların kontrolünde bir hayli etkilidirler.

Biyofilm matriksi oluşturan mikrobiyal EPS'ler saflaştırıldıktan sonra ilaçlar, gıda katkıları, kozmetikler veya temizlik ürünleri için kimyasal katkı maddeleri olarak kullanılabilirler.

Biyoliçing'de metallerin geri kazanımı amacıyla biyofilmlerden yararlanılmaktadır.

Çevresel biyofilmlerin tutunduğu partiküllerle; kontamineli sucul sedimentlerin, yer altı su kaynaklarının, toprakların, doğaya salınmış zararlı kimyasalların (örn: poliklorlu hidrokarbonlar vb.) degradasyonunda, kullanılmayan çevreye zararlı olabilecek petrol yataklarının çevrelenmesi ve maden yataklarından çevreye yayılan sülfür ve benzeri yan ürünlerin detoksifikasyonunda yani habitat biyoremediasyonunda kullanılabilirler.

Bazı tarımsal ekinlerin, bitkilerin köklerine tutunmuş biyofilmler bitkilere ve ekolojik çevrimlere besin sağlamak suretiyle zirai üretimin artmasına yardımcı olmaktadır.

Özellikle patojenik biyofilmlerin EPS içeriği antijenik özelliğe sahip olup saflaştırılarak neden oldukları enfeksiyonlara karşı aşı olarak faydalanılabilirler. Örneğin: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* gibi (De Beer ve Stoodley, 1994; Edstrom Ind. Press, 2003).

1.2.2 Zararlı biyofilm faaliyetleri

EPS üreten mikroorganizmalar birçok su temaslı yüzey, insan dokusuna yerleştirilen medikal araç-gereç, ekipman ve protez üzerinde biyofilm oluşturmakta ve dezenfektanların hedef patojene ulaşmasını güçleştirmektedir (Donlan, 2002). Biyofilmlerle ilişkili yaygın enfeksiyonlar ve etken mikroorganizmalar Çizelge 1.3.'de verilmiştir. Bunun yanı sıra yine biyofilmden kopan parçalar vücudun diğer bölgelerine yayılmasında (sepsis) rol oynayabilmektedir. Biyofilmler konakçı immün sisteme karşı direnci de sağlamaktadır.

Bütün mikrobiyal kaynaklı enfeksiyonların %60'ından fazlasının biyofilm orijinli olması dikkat çekicidir. Örneğin: *Candida albicans* ve *C. parapsilosis* katetere yapışarak kolonizasyon sonucunda nozokomiyal (hastane

kaynaklı) enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Katetere bağlı fungemi ve bakteriyemi oranının 1985 yılında %7,7 iken 1991’de %28,8’e yükselmesi dikkat çekicidir (Yücel ve Kantarcıoğlu, 2001). Son yıllarda nozokomiyal enfeksiyonların önemli etkenleri olan koagülaz negatif stafilokoklarda (KNS’larda) biyofilm pozitifliğinin %80 gibi yüksek oranlarda oluşu da dikkat çekicidir (Ay ve ark., 2002).

Çizelge 1.3. Biyofilmlerle ilişkili medikal enfeksiyonlar (Raad, 1998; Sönmez, 1998; Costerton ve ark., 1999; Davey ve Otoole, 2000; Watnick ve Kolter, 2000; Donlan, 2001; Donlan ve Costerton, 2002’den derlenmiştir).

Enfeksiyon veya hastalık	Etken Mikroorganizmalar
Dental plaklar (diş çürüğü, dişeti iltihapları)	Asidojenik gr (+) koklar (<i>Streptococcus sanguis</i> vb.)
Periodontitis	Gr (-) anaerobik ağız bakterileri (<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Actinobacillus</i>), <i>Candida albicans</i>
İnatçı enfeksiyonlar	
Otitis media	Non-tipik <i>Haemophilus influenzae</i>
Kaslar, iskelet enfeksiyonları	Gr (+) koklar (<i>Staphylococcus</i> sp.)
Safra yolu enfeksiyonları	Bağırsak bakterileri (<i>Escherichia coli</i> vb.)
Osteomyelitis	Çeşitli bakteriyel ve fungal türler-genelde karışık olarak
Enfeksiyöz böbrek taşları	Gr (-) basiller
Kronik tonsillit	Değişik türler
Kistik fibrozis pnömonisi	<i>P.aeruginosa</i> ve <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>P. pseudomallei</i>
Bakteriyel prostat	<i>E. coli</i> ve diğer gr (-) bakteriler
Nektorizan fasiit	Grup A streptokoklar
Gastrointestinal ve bilier traktus enfeksiyonu	<i>E. coli</i> gibi bağırsak bakterileri

Çizelge 1.3. (devam)

İmplant kaynaklı enfeksiyonlar	
Yapay kalp kapakçığı (endokarditis, sepsisemi)	<i>S.epidermidis</i> , <i>S.sanguis</i> , <i>S.aureus</i> (koagülaz (-) <i>Staphylococcus</i> sp.)
Kontakt lensler (keratitis)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i> (gr(+) koklar)
Üriner kateter enfeksiyonları (bakteriüri)	<i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>E.faecalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Candida</i> sp.
İntravasküler kateterler (sepsisemi, endokarditis)	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , Gr(-) bakteriler
Merkezi venöz kateterler (sepsisemi)	<i>S.epidermidis</i> ve diğerleri (koagülaz (-) <i>Staphylococcus</i> sp.), <i>Enterococcus</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>C.albicans</i>
Hickman kateterleri (kontaminasyon, borularda tıkanma)	<i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i>
Kırık, çıkıklarda yerleştirilen platin vb. ortopedik aletler (sepsisemi)	<i>S. epidermidis</i> , <i>S.aureus</i> , <i>Peptokoklar</i> , <i>Streptokoklar</i> , Gr (-) bakteriler, <i>Propionibacterium acnes</i>
ICU pnömoni	Gr (-) basiller
IDUs	<i>Actinomyces israelii</i> ve diğerleri
Endotrakeal tüpler (pnömoni)	<i>P.aeruginosa</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.epidermidis</i> , <i>S.aureus</i> , geniş bir bakteri ve fungus çeşitliliği
Yapay ses telleri	<i>Streptococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Candida</i> sp.
Peritoneal dializ (CAPD) peritonitisi	Çeşitli türler
Penis protezleri	<i>S.epidermidis</i> , <i>S aureus</i>

İnsanlarda mikrobiyal enfeksiyonlar yanında biyofilmler birçok endüstriyel üretimde ürün kontaminasyonu ve bozulması, ekipman hasarı, üretimde düşüşler ve artan enerji giderlerinden dolayı milyarlarca-trilyonlarca lira kayıplara yol açarlar. Biyofilm kontaminasyonu ve kirliliği hemen hemen tüm su arıtımı ve dağıtımındaki su ilişkili endüstriyel proseslerde sıkça oluşmaktadır (Morton ve ark., 1998; Türetgen, 2006). Biyofilmlerin endüstriyel ve tarımsal alanda verdiği çeşitli zararlar Çizelge 1.4’de listelenmiştir.

Çizelge 1.4. Başlıca endüstriyel, çevresel ve tarımsal biyofilm zararları (Morton ve ark., 1998; Donlan, 2002; Meyer, 2003; Tyson ve ark., 2004'den derlenmiştir).

Sistem	Biyofilm Zararları
Endüstriyel ve çevresel	
Soğutma suyu kuleleri	Isı ve yoğunluk iletiminin azalması, verimde düşüş, biyofauling
Isı değiştiriciler - Vantilatör sistemleri	Isı iletiminin azalması, sağlık sorunları
Kağıt ve kağıt hamuru tesisleri	Ürün kalitesinde ve verimde düşüş, biyofauling
Gıdaların işlenmesi	Kontaminasyonlar, sağlık sorunları, Ekipman hasarları, üretimde düşüş
Metal işçiliği	Metal işçiliği sıvısının degradasyonu
Madencilik	Madenlerin liçinginde biyofauling
Fotoğrafçılık	Hatalı basımlar, makina hasarları
Reverse osmosis	Membran geçirgenliğinin azalması, materyal degradasyonu
Yüzme havuzları	Sağlık sorunları
Lavabo, tuvalet vb. boruları, drenaj sistemleri	Akış hızında azalma, kontaminasyonlar
Klozetler	Kozmetik degradasyonu
Proses ekipmanları	Korozyon ve biyodeteriorasyon
Enerji santralleri kondansatörleri	Isı transfer dayanıklılığında artıştan dolayı enerji kayıpları
Petrol ve gaz direnajları, boru hatları	Su enjeksiyon kuyularının tıkanması, ekşime (H_2S üretimi), korozyon
İçme suyu boruları - Su dağıtım sistemleri	Sağlık sorunları, kontaminasyonlar, kötü koku, kötü lezzet, bulanıklılık, biyofauling, tıkanıklık
Gemi gövdeleri	Sıvı sürtünmesine duyarlılığın artışı nedeniyle güç kayıpları ve yüksek maliyet
Tarımsal	
Üzümler ve turunçgiller	Pierce's hastalığı
Patatesler	Halka-kök hastalığı
Sığırlar	Mastitis

1.3. Biyofilmin Yapısı

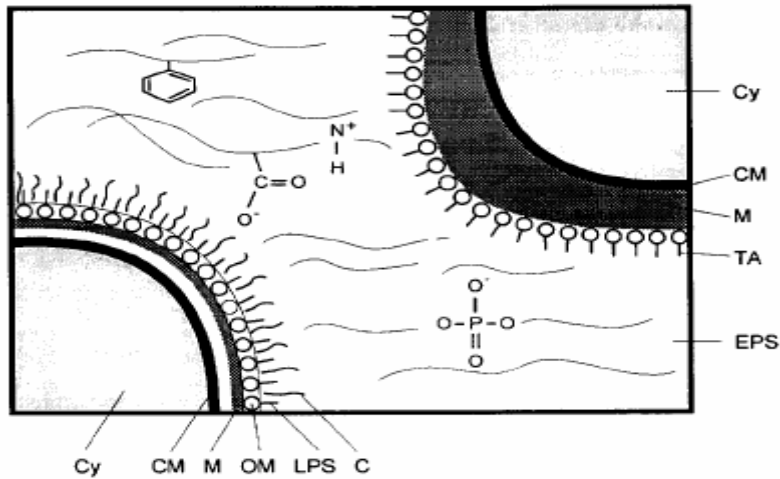
Bir biyofilm komunitası; bakterileri, fungusları, algleri (ışık varlığında), protozoa hatta nematod, rotifer ve çeşitli larvaları içerebilir (Donlan, 2002).

Biyofilmler, bir EPS matriks içinde gömülü olarak yerleşmiş yüzeye-tutunucu mikroorganizmaların yoğun agregatları halindedirler. Bugün biyofilmin immobilize fakat çevresel değişikliklere yanıt verebilen dinamik bir mikrobiyal sistem olduğu bilinmektedir (Sutherland, 2001b).

Çizelge 1.5. Bazı biyofilm tiplerine örnekler (Stahl ve ark., 1988; Characklis, 1990; Buret ve ark., 1991; Van Der Kooij ve ark., 1995; Donlan ve Costerton, 2002; Dunne, 2002'den derlenmiştir).

Çevre	Biyofilm tipi	Kalınlık (mm)	Kommunité
Doğal	Fotosentetik mikrobiyal yığınlar, sıcak su kaynakları ve hipertuzcul göller	1-10	Karışık algal ve bakteriyal komunitas
	Cyanobacteria fosillerini içeren kayalıklar, kalıntılar	1	Bakteriyal
	Bentik/nehir sedimentleri	3-10	Karışık bakteriyal, algal ve protozoan komunitaslar
Medikal	Dental plak	4-10	Karışık bakteriyal komunitas
	Enfeksiyonlar	3-10	Sıklıkla bakteriyal veya fungal tekli kültürler
Endüstriyel	Isı değıştiricileri	3-10	Karışık bakteriyal ve fungal komunitaslar
	İçme suyu boruları	2-10	Karışık bakteriyal ve fungal komunitaslar
	Atık su arıtımı	3-10	Karışık bakteriyal ve fungal komunitaslar, biyofilmler, agregatlar ve floklar
	Filtrasyon üniteleri	4-10	Karışık bakteriyal ve fungal biyofilmler
	Gemi ekipmanları, gövdeleri	2-10	Karışık bakteriyal, algal ve denizel mikroorganizmalar

Çalışmalar doğadaki biyofilmlerin heterojenik bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Mikrobiyal hücreler ve hücre yığınları, sıvı-dolu bölgeler ve kanallar bulunan EPS matriks içerisinde aralara serpilmiş durumdadır (Şekil 1.18). Bu yapı ve biomass dağılımının heterojenitesi sayesinde biyofilm içinde besinlerin, oksijenin ve artık metabolitlerin taşınımını sağlayan difüzyon mekanizmaları oluşturulmaktadır. Bu maddelerin biyofilmin içlerine kanallar ve porlar aracılığıyla akıntı ile iletildiği düşünülmektedir (James ve ark., 1995; Sutherland, 2001c). Biyofilmler içerdikleri su nedeniyle ısı ileticiliğine sahiptirler. Çizelge 1.6’da bir biyofilmin temel içeriği görülmektedir. Biyofilm gelişimine bağlı olarak, bir bölgenin kalınlığında çok küçük bir artış bile olsa, bu ısı transfer yüzeyinde önemli bir etki yaratır (Christensen ve Characklis, 1990).



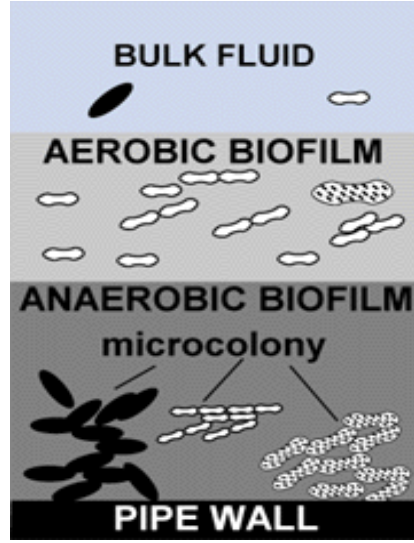
Şekil 1.18. Gr (-) (solda) ve gr (+) (sağda) bakteri içeren bir biyofilmin kısımları. CY:Sitoplazma, CM:Sitoplazmik membran, M:Peptidoglukan, OM:Dış membran, LPS:Lipopolisakkarit, C:Kapsül, TA:Teikoik asit, EPS:Hücre dışı matriks

Çizelge 1.6. Genel biyofilm kompozisyonu (Sutherland, 2001b).

Bileşik	Matriksdeki Yüzde (w/w)
Su	%95-98
Mikrobiyal hücreler	%2-5 (birçok tür)
EPS (Hücre dışı polimerik maddeler) Polisakkaritler (homo- ve heteropolisakkaritler) Proteinler (hücre dışı ve lizisle açığa çıkanlar) DNA ve RNA	%1-2 (nötral ve polianyonik) <%1-2 (çoğu enzimdir) <%1-2 (lizise uğramış hücrelerden çıkar)
İyonlar	Değişken (bağlı ve serbest)
Konakçı ve çevreden gelen EPS'ye tutunan materyaller (çözünmeyen çeşitli partiküller, yıkıntı, kil, kristaller, toprak, metal, korozyon artıkları, kan pıhtısı, eritrositler vb.)	Değişken

Biyofilmin fiziksel özelliklerinin büyük oranda EPS ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir. EPS'nin jel ya da viskoelastik davranış sergileyebileceği, bu fazlara geçişinde protein, Ca^{+2} iyonları, polisakkaritler ile yapının daha da sağlamlaştığı bildirilmiştir. Tabakalı yapının alttaki hücreleri stabilize ettiği, biyofilmde antibakteriyal direnç ve oksijen kullanımı açısından değişkenlik gösteren tabakalar olduğu vurgulanmıştır (Jenkinson ve Lapin-Scott, 2000; Leriche ve ark., 2000).

Besin ya da oksijen gibi yaşamsal moleküller için var olan rekabet, biyofilm içerisinde farklı ekolojik katmanların oluşmasına dolayısıyla birbiriyle ilişkili koloniler veya konsorsiyumların oluşumuna yol açar (Şekil 1.19) (Borenstein, 1994; Zhang ve ark., 1994). Hibiya ve arkadaşları (2004), yaptıkları çalışmada biyofilm tabakasında derine indikçe çözünmüş oksijen miktarının hızla azaldığını ve anaerobik bakteriler için de yaşam alanı oluştuğunu belirtmişlerdir.



Şekil 1.19. Sucul sistemdeki bir biyofilm içerisindeki farklı ekolojik katmanlar (Borenstein, 1994).

Biyofilmlerin yapıları mikrobiyal hücrelere, onların fizyolojik durumuna, etkili fiziksel koşullar ve besin varlığına bağlı olmakla beraber genel olarak 5 bölgeden meydana gelmektedir (Flemming, 1995).

1. EPS; amino şekerlerin katyonik gruplarını ve proteinleri ($-\text{NH}^+$ gibi), üronik asitlerin anyonik gruplarını ve proteinleri ($-\text{COO}^-$; $-\text{HPO}_4^{2-}$ gibi), proteinlerin apolar grupları (aromatik aminoasitlerdeki gibi) ve polisakkaritler gibi yüksek hidrojen bağı potansiyeline sahip grupları içerir.

Katyonlar

Biyofilimde gr(+) bakterilerin varlığında EPS katyonik yapı gösterir ve ana yapı teikoik asit ve proteinden oluşur (Hussain ve ark., 1993). EPS; karboksil, fosforil ve sülfat grupları vb. anyonik gruplar içerebildiği için bir katyon değişim potansiyeli olarak iş görür. Çok sayıda deniz ve tatlı su bakterileri üzerinde yapılan bir araştırma, bakteriyal EPS'lerinin

polisakkaritlerinin %20-50'sini üronik asitlerin oluşturduğunu göstermiştir. EPS'nin metal bağlama kapasitesinin teorik olarak karboksil ve hidroksil grupların sayısı bilhassa asidik polisakkaritlerin varlığına bağlı olduğu düşünülmektedir (Sutherland, 1984; Flemming, 1995).

Anyonlar

Biyofilmlerdeki bağlı anyonlar ile ilgili pek az bilgi mevcuttur. Üronik asitlerin (D-glukuronik asit, D-galakturonik asit, mannuronik asit ya da ketal bağlantılı piruvatlar anyonik özellik kazandırır (Sutherland, 2001b). Bunun yanında anyonların biyofilmlere tutunumu sözkonusudur. Şekerlerdeki amino grupları, şeker asitler ve proteinler vb. anyon bağlayan bölgeler olarak davranabilen pozitif değişikliklere yol açarlar. Nitekim, *Pseudomonas diminuta*'nın bir biyofilminin nutrient brothda sülfat, fosfat ve nitrata akümüle ettiği belirlenmiştir (Flemming, 1995).

Polar organik moleküller

Bu maddeler substrat olarak kullanıldığı için, aminoasitler sucul çevrelerde biyofilmler tarafından zapt edilir. Bu moleküller için EPS'nin affinitesi hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır (Flemming, 1995).

Apolar ve hidrofobik moleküller

Bazı EPS'ler (örn: emülsan), özellikle yağ, iç yağ, sıvı yağ gibi hidrofobik besinler üzerinde büyütüldükleri zaman yüzey aktivitesi göstermektedirler. Bazı pestisitler gibi çözünmeyen hidrofobik maddelerin kalıntıları varlığında yüzey aktivitesi, bir biyofilmin bağlama ve taşınım özelliklerini değiştirecektir. Wolfaardt ve ark., Scanning Confocal Laser mikroskopisi kullanarak herbisitlerin EPS'deki yoğun akümülyasyonlarını

göstermişlerdir. Dohse ve Lion, phenanthrene taşınımındaki yüksek artışa, phenanthrene-parçalayıcı organizmaların özellikle EPS'lerinin etkili olduğunu saptamışlardır (Flemming, 1995).

2. Gram (-) hücrelerin lipopolisakkaritlerden oluşan lipid membranı ve dış membranı, gram (+) hücrelerde lipoteikoik asitler.

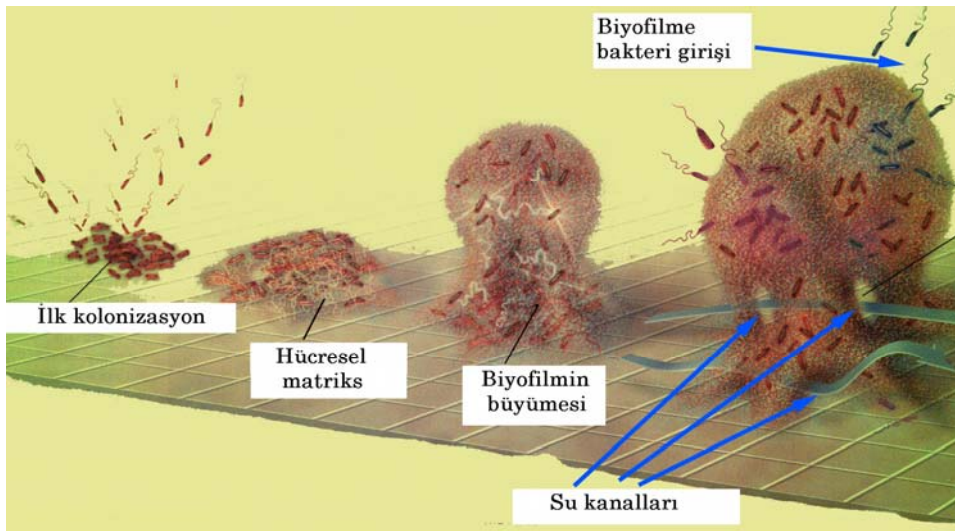
3. N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asitten oluşan hücre duvarı. Bunlar katyonik ve anyonik kısımlar olarak düşünülür.

4. Lipofilik bir bölge olarak sitoplazmik membran.

5. Sitoplazma (çevresel sudan ayrılmış hücre içi kısım).

1.4. Biyofilm Oluşumu

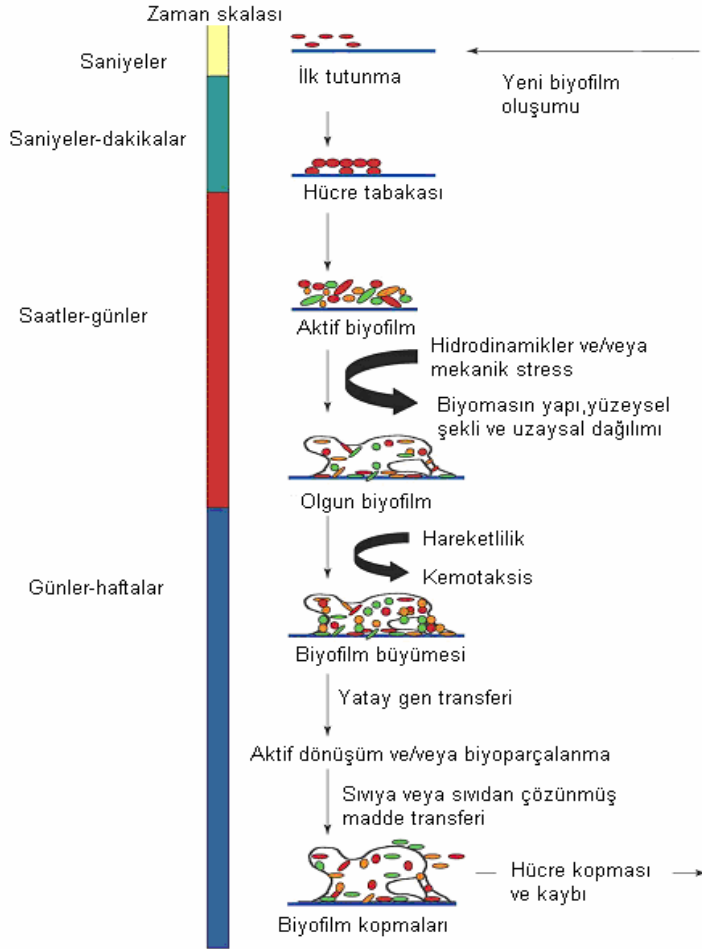
Biyofilm birikimi birbirini izleyen fiziksel, kimyasal ve biyolojik proseslerin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Şekil 1.20).



Şekil 1.20. Biyofilmin büyümesi (Costerton ve Stewart, 2001).

Temel olarak biyofilmin gelişim aşamaları sırasıyla şunlardır:

1. Substrat yüzeyinde sıvı ortamdan gelen organik/inorganik materyallerin hazırlayıcı filmi oluşturmaları.
2. Sıvı ortamdan substrata planktonik hücrelerin taşınımı ve hücrelerin kısa bir süre içerisinde substrata geri-dönüşümlü adsorbsiyonu.
3. Sıvının akış hızı ve kesici kuvvetlerin etkisiyle adsorbe hücrelerin yeniden substrat yüzeyinden ayrılması.
4. Kalan adsorbe hücrelerin yüzeye geri-dönüşümsüz adsorbsiyonu (ilk 4 adım adsorbsiyon).
5. Tutunmuş hücrelerce substratın metabolizasyonu.
6. Hücre büyümesi, bölünmesi ve EPS matriks üretimi ile yeni hücrelerin, cansız kalıntıların bağlanması ve birikimi.
7. Kesici kuvvetlerin etkisiyle erozyon, sloughing gibi prosesler sonucu biyofilm materyalinin yüzeyden kopup ayrılması (Şekil 1.21) (Singh ve ark., 2006).



Şekil 1.21. Biyofilmin gelişim aşamaları (Singh ve ark., 2006).

1.5. EPS Sentezinin ve Biyofilm Oluşumunun Regülasyonu

EPS sentezinin genetiğinin karmaşık olması bazı bakteriler tarafından üretilen tekrarlayıcı monosakkarit üniteleri ile ve diğer bazı bakterilerin birden fazla EPS üretebilme yetenekleri ile kısmen ilişkilidir (Sutherland, 1998). EPS'deki yapısal ve düzenleyici genlerin üretimi kromozomal veya plazmit DNA kodlu olabilir. EPS üretiminin düzenlenmesi oldukça komplekstir ve hem

pozitif hem de negatif regülatörler içermektedir. Bu regülatörlerden bazıları global regülatörlerdir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğer hücre metabolizmalarının sentezini de düzenlemektedir (Shankar ve ark., 1995).

Bakteriyal EPS'lerin çoğunluğu düzenli oligosakkaritlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarit yapıda, bazı bakteriyal EPS'ler ise tek tip şekerden meydana gelen bir homopolisakkarit yapıdadır. EPS'yi oluşturan homopolisakkaritlerin çoğunluğu nötr olmasına rağmen bir çok bakteriyal EPS(-) yük taşır ve yüksek kütleyle sahiptir. Ayrıca polisakkaritler hidrofilik özellik taşımakla birlikte çoğu polimerler lipofilik, hidrofilik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir (Kenne ve Lindberg, 1983; Calazans ve ark., 1997; Lee ve ark., 1997; Gugliandola ve ark., 2003).

Polisakkaritler, bakteri şuşlarının çoğalmaları sırasında straine ve çoğalma evresinin farklı kademelerine göre değişen koşullarda sentezlenir. Sentez olayı hücre dışında olduğu kadar membranda da meydana gelebilir (Sutherland, 1998). EPS sentezinin Sutherland tarafından önerilen genel modele göre gerçekleştiği düşüncesi ağırlık kazanmıştır. EPS'lerin oluşumunda (Sutherland, 1977);

- UDP-glukoz-dehidrogenaz
- glukozil-transferaz
- galaktozil-transferaz 1 ve 2
- polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev alır.

Heteropolisakkaritler hücre içinde sentezlenirler ve daha sonra hücre dışına çıkarılarak hücrenin etrafını sararlar. Bu işlemler için birçok enzimin

varlığına ihtiyaç duyulur. Bu enzimlerden bazıları lipopolisakkaridlerin sentezinde de kullanılmaktadır. Nötral homopolisakkaritlerin sentezi farklıdır. Örneğin, nötral levan ve dekstran homopolisakkaritin sentezi birbirinden farklıdır. Hücre dışında üretilen bu EPS'ler sakkaroz varlığında sırasıyla, levansükraz ve dekstransükraz enzimlerinin aktivitesi ile hücre dışı olarak üretilmektedirler (Sutherland, 1990). Üretilen polimerin molekül ağırlığının, bakterinin çoğalma miktarına bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Sutherland, 1977).

EPS üretiminde görev alan yapısal genlerin keşfi, EPS üretiminin plazmit kökenine bir delildir (Van Kranenburg ve ark., 1997). Bunun tersine termofilik yoğurt bakterilerinin, EPS üretiminin kromozomlar tarafından kodlandığı bulunmuştur (Stingle ve ark., 1996; Almiron-Roing ve ark., 2000).

Kolanik asit sentezinin regülasyonunun kromozomal veya plazmit üzerindeki genlerle kontrol edildiği bildirilmiştir. *S.typhimurium*'da L-fukoz veya kolanik asit için esas olan GDP-mannoz sentezinin kontrolü rfb genler grubu tarafından gerçekleştirilmektedir. *E.coli*'de capS gen haritaları yaklaşık 23 kb'lık olup kapsüler polisakkarit sentezi ve UDP-galaktoz oluşumu için bitişiğinde bulunan galU gen lokusu gereklidir. capS'e çok yakın pozisyondaki cur geni de yine EPS üretiminin kontrolünde ve antibiyotik duyarlılığında etkilidir. *S.typhimurium*'daki kolanik asit regülasyonunda etkili capR geni ile benzer pozisyonda *E.coli*'de bulunan 17 kb'lık galE geni tarafından UDP-galaktoz-4-epimeraz üretimi kontrol edilmektedir (Sutherland, 1985).

X.campestris'in ksantan verimi ve üretim artışı destekleyen mekanizmalara ilgi de oldukça artmıştır. Ayrıca asetilasyonu, pirüvilasyonu ve yan zincir oligosakkaritleri değişik ksantan elde etmenin mümkün olduğu kanıtlanmıştır. *X.campestris*'de mutasyonlar, polisakkarit biyosentezinin

kontrolünü sağlayan 13 kb'lık bir DNA'da gerçekleşmektedir. Bu kümeye bağlı genlerden biri ksantanın pirüvilasyonuna, diğeri 0-asetilasyonuna karışmaktadır. Bu geni içeren plazmitlerin, ksantanın pirüvilasyonunu %45 arttırdığı saptanmıştır. Oysa diğeri genler polisakkarit sentezini yaklaşık %10 arttırmaktadır (Sutherland, 1996a). Vanderslice ve ark. (1989), DNA'nın 16 kb'lık bir bölgesinde ksantan üretimine karışan bir gen grubunu göstermiştir.

E.coli strainlerinde, EPS sentezini kontrol eden gen kümelerinin birkaç türde benzer organizasyonda olduğu gözlenmiştir. DNA'nın yaklaşık 17 kb'lık bir bölgesi 3 fonksiyonel segmenti oluşturmuştur. Yaklaşık 9 kb'lık ilk bölgenin, polisakkaritin bakteriyal yüzeye translokasyonunda işlev gören genleri kodladığı belirlenmiştir. Yaklaşık 5kb'lık ikinci bir bölge spesifik transferaz ve polimeraz gibi polimere spesifik şeker nükleotidlerin biyosentezinde rol alan enzimler için gerekli genleri içermektedir. Bu bölgede mutasyon olduğunda bakterinin EPS üretim verimi düşük olmaktadır. Üçüncü bölgenin görevi ise, hücre yüzeyine ulaşıldıktan sonra EPS'nin modifikasyonuna karıştığı net olarak ifade edilmemektedir. Genlerin analizi polipeptit gruplarını açığa çıkarmıştır. Sentez bölgesinden olgun polisakkaritin polimerizasyonu ve taşınımından sonraki EPS'nin modifikasyonu *E.coli* strainlerinde birbirine benzer mekanizmalardır ve bu polisakkarit yapısından bağımsızdır. Diğeri taraftan biyosentez için sorumlu genlerin merkezi kısmı her bir bakteri için tektir ve baz sıralaması ile tekrarlanan ünitelere bağlı olarak, büyüklük ve ihtiyaç duyulan genetik bilginin miktarı değişiktir (Sutherland, 1985; Sutherland, 1996a).

Diğeri polisakkarit sentezleyen bakterilerde, genetik organizasyon farklı olabilmektedir. Buna göre, *Rhizobium meliloti*'de polisakkarit üretimi ile ilgili 3 lokus (exoA, exoB, exoF) bir plazmitte bulunurken *Agrobacterium tumefaciens*'te ise EPS sentezinde rol oynayan tüm lokusun kromozomal olduğu

saptanmıştır. Bazı bakterilerdeki biyofilm oluşumu ile ilgili hücesel yapılar Çizelge 1.7’de görülmektedir.

Çizelge 1.7. Biyofilm oluşumu ile ilgili tutunma ve diğer hücesel yapılar (Lejeune, 2003).

Tür	Yapı
<i>E.coli</i>	Flajel Tip I fimbria Lipopolisakkarit Curli proteinik yapısı Konjugatif fimbria Ototaşıyıcılar NpIE lipoprotein
<i>K.pneumoniae</i>	Tip III fimbria
<i>P. aeruginosa</i>	Flajel Tip IV fimbria Putatif organel (CupA)
<i>P. fluorescens</i>	Flajel Lap ABC salgı proteini
<i>Salmonella sp.</i>	Flajel Lipopolisakkarit
<i>Salmonella enterica</i>	Curli proteinik yapısı Selüloz Lipopolisakkarit
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bap adhesin Teikoik asitler
<i>S. epidermidis</i>	AtIE otolisin SSPI adhesin
<i>Streptococcus gordonii</i>	Peptidoglukan
<i>Vibrio cholerae</i>	Flajel Mannoz-duyarlı hemaglutinin fimbria

Emülsan yapısal analogları transpozon-mutagenezli *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1’den sadece üretimde değil şeker omurunu süsleyen yağ

asidi açıl zincirlerinin modifikasyonunda da değişiklik meydana gelerek üretilmiştir (Johri ve ark., 2002).

EPS üretimi üzerinde büyüme ortamının direkt bir etkisi vardır. Örneğin; katı yüzeyde büyütülen bakterilerin sıvı besiyerinde yetiştirilenlerle karşılaştırıldıklarında çok daha büyük miktarda EPS molekülü ürettikleri saptanmıştır. Bununla beraber büyüme oranı ve besin azlığı gibi diğer çevresel faktörler de bu yanıtın oluşmasına katkıda bulunur, ayrıca katı yüzeyde büyüyen biyofilm oluşturan hücreler düşük büyüme oranında bile planktonik olanlardan çok daha fazla miktarda EPS üretirler (Shankar ve ark., 1995). Bu konu hakkındaki en önemli genetik çalışmalardan biri *P.aeruginosa*'da aljinat sentezinin kontrolü ve regülasyonu üzerine yapılanlardır. Aslında, *P.aeruginosa*'da aljinat sentezi non-mukoid strainler çevresel strese maruz kaldıklarında oluşur. *algD* olarak adlandırılan aljinat biyosentez geninin transkripsiyonu yüksek ozmolarite, dehidrasyon, besin eksikliği gibi çevresel sinyaller ve AlgR1, AlgR2, ve AlgR3 olarak bilinen proteinler tarafından stimüle edilir. AlgR1 proteini iki komponentli sistem içinde yer alan cevap regülatör proteinleridir (May ve Chakrabarty, 1994). Son çalışmalar *algU* mucABCD grubunda yer alan *mucA* geninde oluşan mutasyonların mukoid özelliğinin değişmesine yol açtığını ortaya çıkarmıştır. Katı yüzeyin varlığı durumunda *P.aeruginosa*'daki *algD* geninin transkripsiyonu aktive edilir. *P.aeruginosa*'da bulunan AlgU proteini stres koşulları altında oluşturulan yanıtları kontrol eder, ayrıca bu protein *algD* ve *algR* genlerinin transkripsiyonu içinde gereklidir. MucA, MucB, MucC ve MucD proteinleri AlgU protein aktivitesinin negatif regülatörleridir (Boucher ve ark., 1997).

EPS üretimi, ozmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarılardan da etkilenmektedir (Shankar ve ark., 1995). EPS'ler bakterinin olumsuz çevre

şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Polisakkaritler, üretici strainler tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler, buna karşılık mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya düşman bir ortamdan uzaklaştırırlar (Moriello ve ark., 2003; Ophir ve Gutnick, 1994). EPS, bakteriyi koruyucu bir örtü şeklinde sarmakta ve olası tehlikelere karşı onları korumaktadır. Yani EPS koloninin direncini ve kararlılığını ortaya koymaktadır (Gugliandola ve ark., 2003; Denny, 1995).

Bugün bakterilerin izole varlıklar olarak yaşamadıkları, değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası haberleşme sistemleri kullanan topluluklar halinde bulundukları giderek artan bir yaygınlıkla kabul edilmektedir (Boşgelmez, 2003). Hücre dışı sinyallerin ve Quorum-Sensing (QS) düzenleme sistemlerinin EPS üretimi ile biyofilm oluşumu ve devamlılığı için önemli olduğu kabul görmüştür (Kjelleberg ve Molin, 2002; Karaboz ve Sukatar, 2004). Genel olarak bu mekanizmalar, hücre dışı işaretleşmeler yolu ile çalışır. Bakteriler bu işaretleri, yerel yoğunluklarını değerlendirmek amacı ile kullanırlar. Bu işaretler yeterli yoğunluğa ulaştığında (örneğin yüksek yoğunluklara), düzenleyici bir geri bildirim (feed back) çemberi uyarılmakta, bunun sonucunda da hücre nüfusundaki fenotiplerin ifadesinde hızlı bir artış olmaktadır (Davies ve ark., 1998; Lynch ve ark., 2002; Labbate ve ark., 2004). Çevreyi algılama, bir bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izlemesine olanak veren **otoinducer** veya **feromon** olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin üretimine bağlıdır. EPS lifli ve gözenekli bir yapıya sahiptir. Dolayısıyla düşük molekül ağırlıklı, yoğunluğa bağlı hücre-sinyal moleküllerinin hücreler arası geçişine izin verir. Değişik bakteri türlerinde, biyofilm oluşumu yanında biyoluminesens, antibiyotik biyosentezi, konjugasyon ve hayvan, bitki ve balık patojenleri tarafından oluşturulan virulens faktörlerinin üretimi gibi çeşitli fizyolojik işlemler, QS ile regüle edilir (Boşgelmez, 2003; Baskın, 2006). Bugün

biyofilmin oluşum evrelerinden her birinde QS mekanizmalarının rol oynadığı bilinmektedir. *S.aureus*, *H.pylori* ve *S.enterica* 'nın bu mekanizmaları kullanarak tutundukları ve biyofilm oluşumunu başlattıkları kanıtlanmıştır (Parsek ve Greenber, 2005).

Otoinducerların ortamdaki konsantrasyonları yeterli seviyeye ulaştığında bakteri bu sinyalleri algılar ve bunları belirli hedef genlerin aktivasyonunda yada baskılanmasında kullanır. Bulgular, türe özgü olan bu sinyallerle bakterinin diğer bakteri hücreleri tarafından tanınabildiğini göstermiştir (Greenberg, 1997). Hücre yoğunluklarının yüksek olduğu biyofilmlerde QS işlemlerinin sıkça meydana gelmesi olasıdır. Gram (-) bakterilerdeki yaygın otoinducerlar N-açıl-homoserin lakton (AHL) molekülleridir (Davison, 1999, Boşgelmez, 2003). Davies ve ark. (1998), bu konuda en iyi araştırılmış türlerden olan *P.aeruginosa* 'ya ait biyofilm oluşumu ile ilgili genlerden *lasR-lasI* ve *rhlR-rhII* uyarım sistemlerini göstermişlerdir. Bu genlerden herhangi birinin uyarımı sonucu, yeterli sayıda biyofilm oluşturma yeteneğindeki bakterilerin önce mikro koloniler oluşturduğu, daha sonra ince bir biyofilm tabakası meydana getirdikleri saptanmıştır. Aynı çalışmada, uyarılmış biyofilmin tutunma yüzeyinden sürfektanlar ile kolayca yerinden söküldüğü gözlenmiş, bunu takiben mikrokolonilerin olduğu ortama homoserin lactone eklendiğinde, normal yükseklikte bir biyofilm oluştuğu bildirilmiştir. *P.aeruginosa* 'daki *lasA* ve *lasB* proteaz genleri QS sistemi tarafından kontrol edilir. *LasB* promotorunun non-mukoid hücrelerde aktif ve mukoid hücrelerde inaktif olmasından dolayı *P.aeruginosa* 'nın izogenik mukoid ve non-mukoid strainlerinin *lasB* ve *algD* genlerinin ekspresyonlarını karşılıklı olarak koordine ettikleri ortaya atılmıştır. Yapılan araştırmalarda *algD* ekspresyonu ile *lasB* ve *lasA* genlerinin ekspresyonları arasında pozitif bir bağlantı gözlenmiştir. Bu genler biyofilm oluşumu gibi çevresel bazı uyarılara ya da fizyolojik uyarılara cevap verirler. Belli koşullar altında bu genlerin

kontrolü spesifik bazı sigma faktörleri (stress-induced sigma factor) tarafından yapılır (Dong ve Zhang, 2005).

AHL moleküllerinden başka gram (-) bakterilerde farklı QS sinyal molekülleri tanımlanmıştır. Örneğin; Yine *P.aeruginosa*'da 2-heptil-3-hidroksi-4-quinolon (PQS) molekülü, *P.aeruginosa* ve diğer bazı bakterilerde diketopiperazin molekülleri belirlenmiştir (Boşgelmez, 2003). Gram (+) bakterilerde ise hücre yoğunluğuna bağlı gen regülasyonu genel olarak bazı oligopeptid molekülleri tarafından sağlanır. Yakın geçmişte ise, ilk kez *Vibrio harveyi*'de keşfedilen ve hem gram (+) hem de gram (-) bakteriler tarafından kullanılan otoinducer-2 (AI-2) olarak adlandırılan yeni bir QS sinyal molekülü bulunmuştur. AHL sistemi bir grup gr (-) bakteride, otoindükleyici 2 sistemi (AI2) gr (+) ve gr (-) bakterilerde, peptit bağlantılı sistem ise gr (+)'lerde tanımlanmıştır. AHL-temelli QS sisteminin hem biyofilm oluşumunu hem de bakterilerin iletişimini sağladığı ve topluluktaki hücrelerin QS ajanı olan AHL'nin yoğunluğu ile, çoğunluk oranlarını çözdükleri belirtilmiştir. Aynı çalışmada, AHL'in diğer QS ajanlarından farklı olarak, kolonizasyondan da sorumlu olduğu ortaya konmuştur (Kjelleberg ve Molin, 2002).

Gr (-) ve gr (+) bakterilerde biyofilm oluşumu ile ilişkili bazı regülatör sistemler fonksiyonlarıyla beraber Çizelge 1.8'de sunulmuştur.

Çizelge 1.8. Biyofilm oluşumu ile ilişkili bazı regülatör sistemler (Eberl ve ark., 1996; Puskas ve ark., 1997; Atkinson ve ark., 1999; Kohler ve ark., 2000; Huber ve ark., 2001; Prouty ve ark., 2002; Lynch ve ark., 2002; Dow ve ark., 2003; Merritt ve ark., 2003; Michaud ve ark., 2003; Yarwood ve Schlievert, 2003; Cole ve ark., 2004; Parsek ve Greenberg, 2005’den derlenmiştir).

Regülatör gen(ler)	Bakteriyal türler	Biyofilm oluşumundaki fonksiyon
Gram (-) bakteriler		
barA/uvrY	<i>E. coli</i>	Biyofilm oluşumunun aktivasyonu
cpxRA	<i>E. coli</i>	Düzensiz yüzeylere hassasiyet ve optimal hücreler-arası iletişim ihtiyacı
Crp	<i>E. coli</i>	Biyofilm oluşumunun engellenmesi (katabolit represyon)
csrAB	<i>E. coli</i>	Biyofilm oluşumunun önlenmesi, kopmanın aktivasyonu
Hns	<i>E. coli</i>	Oksijensiz koşullarda adhezyonun indirgenmesi
ompR/envZ	<i>E. coli</i>	Tutunmanın ve selüloz gene aktivasyonunun artırılması
rcsB-yojN-rscC	<i>E. coli</i>	Hücre yüzey kompozisyonunun yeniden modellenmesiyle biyofilm oluşumunun aktivasyonu
rpoS	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	Biyofilm kalınlığının azaltılması veya artırılması Biyofilm kalınlığının azaltılması
Crc	<i>P. aeruginosa</i>	Normal biyofilm gelişimine ihtiyaç (tip IV hareketliliğinin aktivasyonu)
gacAS	<i>P. aeruginosa</i>	Mikrokolonilerin oluşumuna ihtiyaç
mvaT	<i>P. aeruginosa</i>	cup geninin indirgenmesiyle abiyotik yüzeylere adhezyonun azaltılması
rpoN	<i>P. aeruginosa</i> <i>Vibrio fischeri</i>	Adhezyonda ve biyofilm mimarisinde rol oynar Biyofilm mimarisinde rol oynar
bopABCD	<i>Enterococcus faecalis</i>	Plastik yüzeyler üzerindeki biyofilm oluşum operonu
lasI	<i>P. aeruginosa</i>	3OC12-HSL quorum-sensing sinyalinin sentezi, biyofilm oluşumu
lasI	<i>P. aeruginosa</i>	QS, swarming hareketin kontrolü
SwrI	<i>Serratia liquefaciens</i>	QS, swarming hareketinin regülasyonu
bsmA ve bsmB	<i>S. liquefaciens</i>	Biyofilmin gelişiminde iş görür
ahyR/I	<i>Aeromonas hydrophila</i>	QS, biyofilmin olgunlaşmasında rol oynar
ypsl/R	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	QS, agregasyonda fonksiyon gösterir
Ups	<i>Vibrio cholerae</i>	EPS biyosentezi
luxS	<i>Salmonella enterica</i> <i>serovar typhimurium</i>	İnsanların safra taşları üzerinde biyofilm oluşumunda etkili

Çizelge 1.8. (devam)

LuxS	<i>Helicobacter pylori</i>	Adezyonda etkili
cepI/R	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>H111</i>	Olgun biyofilmin oluşumu için gerekli
RpfF	<i>Xanthomonas campestris</i>	DSF (Difüzelebilir sinyal faktörü)*nın üretimi, DSF/rpf quorum-sensing sistemi, ekstraselüler mannosidaz sentezi ile yine kendi ürettiği ksantan polisakkaritinin ve biyofilmin dağılımı, parçalanması
Cer	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	QS, agregasyonun hücresel kontrolü
Gram (+) bakteriler		
AbrB	<i>Bacillus subtilis</i>	Biyofilm oluşumunun önlenmesi
CcpA	<i>B. subtilis</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Biyofilm oluşumunun engellenmesi (katabolit represyon)
SpoOA	<i>B. subtilis</i>	Olgun biyofilm oluşumunda gerekli (abrB'nin engellenmesi)
SpoOH	<i>B. subtilis</i>	Olgun biyofilm oluşumunda gerekli
ArlRS	<i>Staphylococcus aureus</i>	Polistren'e primer yapışmanın indirgenmesi
Rbf	<i>S. aureus</i>	Abiyotik yüzeyler üzerinde olgun biyofilm oluşumunda gerekli
SarA	<i>S. aureus</i>	Biyofilm oluşumunun aktivasyonu, PIA/PNAG aktivasyonu
Agr	<i>S. aureus</i>	QS, konak hücresi ile teması sağlayan yüzey adhesinlerin çalışmasında rol alır
SigmaB	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Biyofilm oluşumunun aktivasyonu
BfrAB	<i>Staphylococcus gordonii</i>	PVC ve tükürük kaplı biyofilm oluşumu aktivasyonu
hk11/rr11	<i>S. mutans</i>	Biyofilm mimarisinde rol oynar
BrpA	<i>S. mutans</i>	Abiyotik yüzeyler üzerinde olgun biyofilm oluşumuna ihtiyaç
LuxS	<i>S. mutans</i>	QS, biyofilmin gelişimi
GbpA	<i>S. mutans</i>	Polisakkarit oluşumu

1.6. Biyofilm Hücreleri Arasındaki Etkileşimler

Bakteriler belirtildiği gibi hücre-hücre haberleşmesiyle çevre şartlarına göre davranışlarını düzenler. Ayrıca, besin varlığı, diğer mikroorganizmalara karşı savunma, toksik maddelere direnç gibi değişkenlere cevap vererek canlılıklarını sürdürür (Kaiser, 1996).

Hücreden-hücreye iletişim mekanizmasının (QS), bakteri topluluklarında gen sunumunun uyumu ve işlevsel yönetiminde temel roller oynadığı belirtilmişti. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak bakteriler, küçük işaret molekülleri ile bulundukları mikroçevreyi tararlar, bu moleküllerden gelen yanıtlara göre yanıt verirler ve bu tür etkileşimlerin sonucunda da bir grup hedef genin düzenlenmesini sağlarlar (Dong ve Zhang, 2005).

Son yirmi yıl içinde bir çok tipte hücreden-hücreye iletişimi sağlayan çeşitli enzimler tanımlanmıştır: AHL (Pearson ve ark. 1994), hidroksil palmitik asit metil ester (Flavier ve ark., 1997), furanozil borat (AI-2) (Chen ve ark., 2002), metil dodesenoik asit (Wang ve ark., 2004) bunlardan başlıcalarıdır. Bu enzimlerin birçoğu bakterinin virulanslığında da rol almaktadır.

Biyofilmdeki hücrelerin birbirine yakınlığının; besin sentezi, gen değişimi ve QS için ideal bir ortam sağladığı mutlaktır. Farklı mikrobiyal hücrelerden oluşan biyofilmlerde azot, sülfür, karbon, oksijen gibi çok çeşitli molekülün alışverişinin görüldüğü bildirilmiştir (Williams ve Fletcher, 1996).

Bakterilerin genetik yapısında meydana gelen değişikliklerin çok çeşitli olduğu, bunların hücrenin bulunduğu ortam, diğer hücrelerle etkileşimleri ve kendi içlerindeki değişimlere bağlı olarak, geniş bir perspektif sergiledikleri bildirilmiştir (Davison, 1999). Plazmitler ve konjugasyon, transformasyon, transdüksiyon, füzyon ve supresyon bunlardandır. Biyofilmin ekstrakromozomal

DNA (plazmit) değişimi için ideal yapı olduğu ortaya konmuştur. Konjugasyonun biyofilm hücrelerinde, planktonik yapıdakilerden daha fazla görüldüğü belirtilmiştir (Ehlers ve Bouwer, 1999; Hausner ve Wuertz, 1999). Ghigo (2001), konjugasyona hazır plazmid içeren bakterilerin biyofilm oluşturmaya yatkın olduğunu öne sürmüştür. *E.coli*'ye ait F plazmidinin aktive olarak sentezlettiği, F konjugatif pilusunun hem hücre yüzeyi hem de hücre ile başka bir hücre arasında yapışma faktörü olduğu ortaya konmuştur. Verici hücrelerden, alıcı hücrelere aktarılan DNA yapısında patojenite, toksijenite, antibiyotik ve dezenfektan direncini kodlayan genler olabileceği belirtilmiş ve buna bağlı olarak, biyofilmin antibakteriyal ajanlara karşı gelişen direncin yayılmasında önemli rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.

YüzeYE tutunan hücrelerin genlerinde yukarı seviyeye (up-regulation) doğru ya da aşağı seviyeye (down- regulation) doğru düzenlemelerin olduğuna dair değişik çalışmalar bulunmaktadır. Davies ve ark. (1998), akışın olduğu bir sistemde tutunan *P.aeruginosa*'da ilk birkaç dakika içinde yukarı seviye *algC* düzenlemesinin oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Bu düzenlemenin, *P.aeruginosa*'ya özgü olmadığı, biyofilm yapısındaki bütün bakterilerde ya yukarı ya aşağı bir genetik düzenleme oluştuğu bildirilmiştir. Prigent-Combaret ve ark (1999) genlerin %22'sinin bakteri biyofilm yapısına katılınca yukarıya doğru düzenlendiğini, %16'sının aşağıya doğru düzenlendiğini ortaya koymuş ve düzenlemenin vre ile etkileşimli bir fenomen olduğunu, ayrıca hücre içi sentez yollarının açıklanmasının çok güç olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca, *S.aureus* biyofilminde glikoliziz ve fermentasyon ile ilgili genlerin yukarı doğru düzenlendiğini bildirmişler, bunu da oksijen azlığına bağlı olarak bakterinin canlılığını sürdürebilmesi için fermentasyona başlaması gerektiği düşüncesi ile açıklamaya çalışmışlardır. Pulcini (2001) yaptığı çalışmada *algD*, *algU*, *rpoS* ve

polifosfokinaz (PPK) sentezini kontrol eden genlerin, *P. aeruginosa* biyofilminde yukarı düzenlendiğini ortaya koymuştur.

Her biyofilimde, her bir noktada birçok farklı etkileşim meydana gelmektedir. Organizmalar birbirleri ile rekabet halindedir ve bazı kültürler belirli bir ortamda uzun süre hayatta kalamazlar. Bazı kültürler kommensal ilişkide bulunurlar ve sintrofi gösterirler. Ayrıca farklı türler tükürükteki mukus gibi bazı substratları parçalamak için işbirliği yaparlar (Marsh ve Bowden, 2000). Sucul biyofilm bakterilerinin, humik ve fulvik asit moleküllerini daha küçük moleküllere parçalamak için işbirliği yapabilmeleri olasıdır. Farklı biyofilm bakterilerinin sıkı yakınlığı hücreler arası genetik değiş-tokuşları iletilebilir. Biyofilm bakterileri arasındaki konjugasyonla yatay gen transferi oranları, eşdeğer planktonik bakterilerden daha yüksektir. Bu, esas olarak biyofilmdeki hücre çiftlerinin fiziksel kararlılığından ve temas süresinin uzunluğundan kaynaklanmaktadır (Ehlers ve Bouwer, 1999).

1.7. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Yüzeylerde bakteriyal hücre adhezyonun gerçekleşebilmesi için öncelikle sudaki cansız partiküller, elementler, organik ve/veya inorganik moleküller yüzeye yapışır ve ince bir yapışmayı hazırlayıcı filmin oluşumu gerçekleşmelidir (Christensen, 1989; Morton ve Gaylarde, 2001; Donlan, 2002). Tutunma hücrenin yüzey özellikleri, substrat yüzey özellikleri, sıvı ortamın kompozisyonu ve hidrodinamiğinden etkilenmektedir (Rosenberg ve Kjelleberg, 1986; Scheuermann ve ark., 1998; Morisaki ve ark., 1999). Planktonik hücrelerin suda hareket ederken proton ve sinyal moleküller saldığı bilinmektedir. Bu proton ve sinyal moleküller bakteri herhangi bir yüzeye uzak iken radyal olarak yayılırlar. Mikroorganizmalar difüzyon, Brown Hareketi, aktif hareket ya da su akışı ile tutunacağı yüzeye yaklaşır. Bakteri yüzeye yakınsa proton ve sinyal

moleküller yüzeye çarpıp geri döner ve bakteri ile yüzey arasında bu moleküllerin konsantrasyonları artar (Costerton, 1999; Morisaki ve ark., 1999). Yüzeye kritik uzaklıkta olduğu anda (yaklaşık 1 nm), bakteri itici ve çekici güçlerin etkisiyle ya yüzeye yapışır ya da itilir. Bu itici ve çekici kuvvetler Çizelge 1.9’da gösterilmiştir. Bakteri ve yüzeyin yük özellikleri nedeniyle ortamın pH ve iyonik güç parametreleri yapışmada önemlidir (Christensen, 1989). Ortamın pH değeri bakterinin izoelektrik noktasından düşük ise bakteri pozitif yüklüdür. Bu durum genellikle 1.5-4.5 arasındaki pH değerlerinde görülür ki, şebeke ve soğutma kuleleri suyunun pH değeri genellikle 6.5’in üzerindedir (Batte ve ark., 2003).

Hücrelerin substrata tutunması 2 evreli bir mekanizmadır (ZoBell, 1943).

Çizelge 1.9. Yüzeylere mikrobiyal adhezyonda etkili olan kuvvetler (ZoBell, 1943).

Tutunma fazı	Mekanizma	Net etkiler	Fizikokimyasal faktörler	Yaklaşık etkileşim enerjisi
Geri-dönüşümlü (rastgele yerçekimi kuvveti etkisiyle, difüzyon ve akıntının etkisiyle)	Elektrostatik güçler, London-Van der Waals etkileşimi, hidrofobik ilişkiler	Adherent hücrelerle substrat arasında uzun mesafe ($0,20A^{\circ}$), düşük spesifte, hücreler yıkama ile kolaylıkla ayrılabilirler.	pH, elektrolit konsantrasyonu, organik konsantrasyonu, sıvı hareketi	20-50 kJ/mol
Geri-dönüşümsüz (pilus, flajel ve adhesin gibi hücre yüzeyi uzantıları veya EPS matriks vasıtasıyla)	Biyolojik adhezyon, dipol-dipol birleşimi, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim, iyonik kovalent bağlanma	Kısa mesafe, dirençli adherent hücreler, yüzey ve hücreler biyolojik adhezyon köprüleri ile bağlıdır, adhezyonun değiştirilmesi veya sert fiziksel yöntemlerle (fırçalama yada kazıma vb.) uzaklaştırılabilirler.	Zaman, sıcaklık, serbest yüzey enerjisi (q), kritik yüzey basıncı (q_C), parametrelerin etkileşimi (d), adhezyonun serbest enerjisi (WF)	40-400 kJ/mol

Hücrelerin yüzeye yapışmasıyla ilgili iki temel teori vardır. Bunlardan biri araştırmacıların ismine atfen **DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) Teorisi**, diğeri ise **Termodinamik Teori**'dir ve her ikisi de fizikokimyasal güçlerle ilgilidir. DLVO Teorisi, hücre çeşidi ya da yüzey farklılığı gözetmeden tamamen hücre yüzey özellikleri ile ilişkilidir. Cam ya da polimer bazlı yüzeylerde mikrobiyal yapışma süreci, itici ve çekici güçlerin eşit olduğu durumda dengededir, buna DLVO Yaklaşımı da denir (Francolini ve ark., 2003; Bos ve ark., 1999; Hermansson, 1999). Ancak elektrostatik itme kuvveti göz önüne alındığında negatif yüklü partiküllerin negatif yüklü yüzeylere yapışması DLVO teorisine ters düşmektedir. Termodinamik Teori ise hücre ve malzeme yüzeyinden açığa çıkan serbest yapışma enerjisi temeline dayanmaktadır. Fakat bakterilerin hücre yükü ve hidrofobisite değiştirebilme özellikleri nedeniyle uygun bir yapışma teorisi ortaya atılamamıştır (Scheuermann ve ark., 1998). Oysa ki Rosenberg ve Kjelleberg (1986) çoğu hücrenin negatif yük taşımakta olduğunu, bunun da sıvı akışına rağmen yüzeye yapışmayı kolaylaştırdığını bildirmişlerdir.

Mikroorganizmaların yapışma yeteneklerinin logaritmik üreme fazında daha yüksek olduğu tespit edilmiş, bunun nedeninin de hücre duvarının üreme fazında artan hidrofobik özelliğinden ileri geldiği açıklanmıştır (Loosdrecht ve ark., 1990).

1.8. Endüstriyel Su Sistemlerinde Biyofilmin Önemi

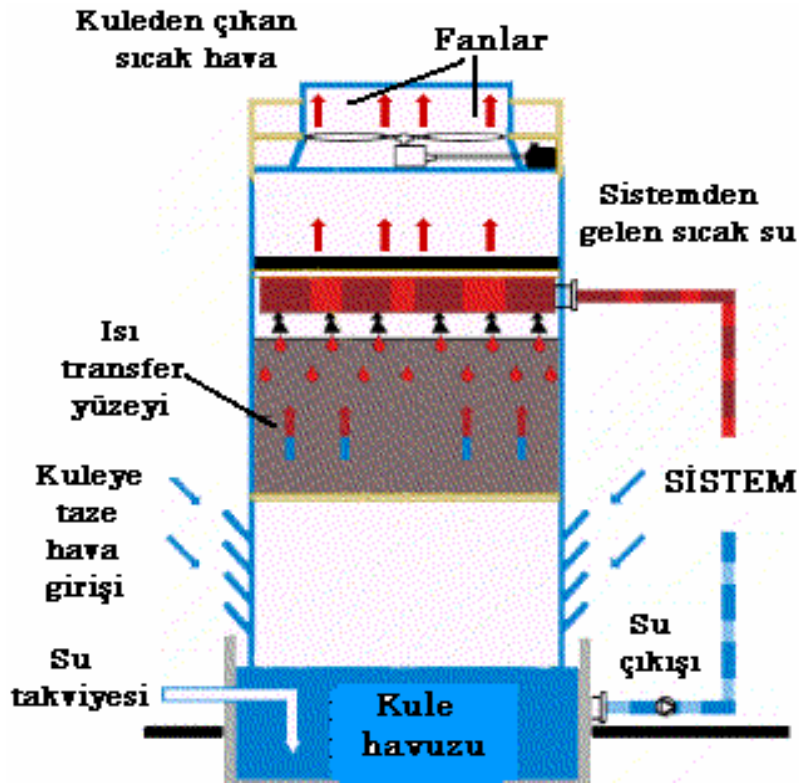
İnsan yapımı su sistemlerinde, polimer matriks iskelet için gereken karbonhidrat ve mineral, mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu besin maddelerinin su tarafından sağlandığı bildirilmiştir. Bu sistemlerde, ısı değişim yüzeylerindeki biyofilm oluşumunun mikroorganizmaların gelişmesi için uygun ortamı sağladığı ortaya konmuştur (Lindsay ve ark., 2002).

Biyofilmlerin varlığı su sistemlerinde çeşitli problemlere neden olur:

1. Su kalite kriterlerinin dağıtım sisteminde başarısız olmasına neden olur (koliformlar, heterotrofik plak sayımları).
2. Spesifik bakteriyal türler içme suyunda bulanıklılık, lezzet ve kötü koku oluştururlar.
3. Heterotrofik bakteri sayısı (HPC)'nın yüksek rakamlara ulaşması koliformlar ve hijyen indikatörlerinin kontaminasyonunu sağlar.
4. Tutunucu bakteriler daha yüksek organizmalara besin teşkil ederek üremelerini sağlarlar.
5. Biyofilm tarafından akümüle edilen biyomass, biyokorozyonu artırır.
6. Biyofilmlerin yarattığı sürtünme dağıtım sistemindeki su akış hızında azalma meydana getirir (Morton ve Gaylarde, 2001; Mara ve Horan, 2003; Långmark, 2004).

En hızlı biyofilm gelişiminin yeterli besinlerin bulunduğu su temelli sistemlerde meydana geldiği ortadadır (Rusin ve ark., 1997a, 1997b). Soğutma kuleleri endüstriyel tesislerde çalışan sistemleri soğutmak için kullanılan, suyun ısıdıktan sonra tekrar soğutularak sisteme geri gönderilmesi işlemi sırasında suyun soğutulması görevini yapan yardımcı tesisleridir. Su tüketimini azaltıcı tesisler olması nedeniyle soğutma kuleleri birçok kimya endüstrisi ile ilgili fabrikanın en önemli kısımlarındandır. Soğutma kuleleri soğutulacak sistemlerin ölçüsüne göre farklı ebat ve çözümlerde inşa edilmektedir. Esasta soğutma prensibi aynıdır. Sıcak su yüzeyinin gerekli oranda soğuk hava yüzeyi ile temas etmesi sağlanmaktadır. Sıcaklığın düşürülmesi ilk etapta, suyun bir miktar buharlaşmasıyla kendiliğinden sağlanır. Soğutma sürecinin hızlandırılması

amacıyla su ile hava akımı arasında maksimum temas gerçekleşmelidir. Bunun için sıcak su basınçla, yüzeyi genişletilmiş metal çubuklara püskürtülür, yada suyun metal plaklar üzerinde film tabakası halinde yayılması sağlanır. Böylece suyun sıcaklığı havaya verilmiş olur. Su sürekli yukarıdan aşağıya akar, kulenin tabanında birikir, sonra tekrar soğumuş olarak sisteme pompalanır. Soğutmayı hızlandırmak için sürekli bir fan çalışır. Soğuyan su tekrar ısı değiştiricisine pompalanır (Şekil 1.22). İşte bu sirkülasyon esnasında gerek püskürtme işlemi, gerekse fan aktivitesi ile solunabilir aerosoller üretir (Barker ve ark., 1992; Türetgen, 2005).



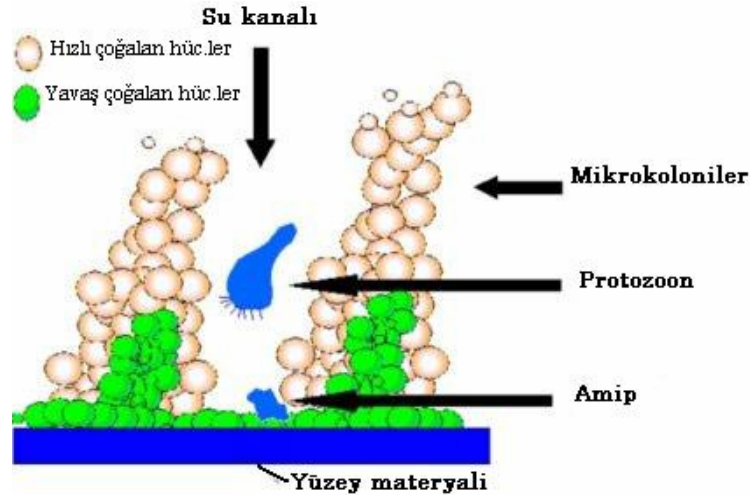
Şekil 1.22. Soğutma kulesi çalışma şeması (Türetgen, 2005’den modifiye edilmiştir).

Bu özelliklerinden dolayı soğutma kuleleri ideal inkübatörler olarak düşünülebilir. Bakteriler ve algler, kulelerdeki ılık su ortamı ve nemli parçalardan dolayı yaygın biyofilm oluşumuna neden olurlar (Turetgen ve ark., 2004). Soğutma kulelerinde suyun soğutulduğu metal levhalarda biyofilm tabakasının birikimi, levhalar arasındaki alanı doldurmakta ve soğutma yüzeyini azaltmaktadır. Biyofilm, tek tabakalı bakteri olarak birikmeye başlar ve çok tabakalı, kalın algal katmanlara kadar ulaşabilir (Christensen, 1989). Suyun saf olarak buharlaşması sonucu biriken karbonat, fosfat, sülfat, magnezyum ve kalsiyum tuzları tabakalaşmaya yol açarak korozyonu hızlandırır (Cloete ve Brözel, 1992). Bazı biyofilm bakterileri metabolizmaları sonucu asitler ve hidrojen gazı gibi korrozif kimyasallar üretirler. Biyofilmdeki anaerobik zonlar genellikle sülfat indirgeyici bakteriler (SRBs) içerirler. Bu grup bakteriler sülfatı metalleri korroze eden hidrojen sülfüre indirgerler. SRB'nin sayısını sınırlamanın bir yolu da, fosfor, azot, sülfat gibi onların başlıca besinlerin konsantrasyonunu azaltmaktır. Korozyona uğramış yüzeylerin artan pürüzlülüğü nedeniyle daha fazla sayıda bakteri barındırdığı bilinmektedir (Batté ve ark., 2003). Biyofilm kalınlaşmasını önleyici fırçalama, sanitasyon, çatlakların giderilmesi, suya organik besinsel girişin engellenmesi gibi tüm uygulamalar biyokorozyona neden olabilen mikrobiyal grupları minimize edecektir (Edstrom Industry Press, 2003).

Soğutma kuleleri, dış ortamla alışverişi olan açık sistemlerdir. Fan yardımıyla içeri sürekli hava alırlar, genellikle çatıda bulunduklarından dolayı güneş ışığına maruz kalırlar, sirkülasyondan ötürü ortamda bol miktarda serbest ve suda erimiş oksijen mevcuttur. Bu koşullar biyofilm tabakasının oluşmasını destekler (Cunliffe ve ark., 1999; Chauret ve ark., 2001).

Buharlaşmayla su kaybı esnasında, içinde bulundurduğu suda çözünmüş bileşikler soğutma kulesinde bırakıldığından dolayı, kule suyundaki çözünmüş

organik ve inorganik bileşik miktarı sürekli artmaktadır. Bunun sonucu olarak paslanma, dipte fauling ve tortu oluşma süreci hızlanır, bakterilerin yaşaması ve çoğalması için gerekli nem, sıcaklık ve çözünmüş inorganik maddeler sağlanmış olur. Temizliği genellikle göz ardı edilen soğutma kulelerinin iç yüzeylerinde çeşitli bakterilerin hücre dışına saldıkları polimerik maddelerce siyanobakteriler, amip ve siliatlar da yığına katılarak biyofilm tabakası büyür (Şekil 1.23). Bu tabaka, bakteriyi soğutma kulesi suyunun yüksek pH değerinden, uygulanan klor ve diğer temizlik amaçlı kimyasal maddelerden korur, ciddi çevre kirliliği ve sağlık riski oluşturur (Costerton, 1993; Cunliffe ve ark., 1999; Hallam ve ark., 2001; Skjevrak ve ark., 2004).



Şekil 1.23. Bir sucul biyofilmin yapısal elemanları (Boe-Hansen, 2001).

Soğutma kulelerinde kirliliğin sebep olduğu oluşumlar, paslanma, çeşitli tuzların oluşturduğu tabakalar, fauling ve mikrobiyal popülasyonlardır (Costerton, 1993). Soğutma kulelerinde paslanmanın önüne anodik veya katodik

inhibitörlerle geçilirken, çözünmez tuzların oluşturduğu tabakalar, sülfürik asit yardımıyla çözünür hale getirilerek sistemden uzaklaştırılır. Fauling kapsamına çözünmez pas bileşenleri, çamur, balçık, havadan gelen toz içindeki mikroorganizmalar, böcek, polen ve bitki parçacıkları girer. Fauling, sisteme basınçlı su verme ve bunu takiben mekanik filtrasyon ile ortadan kaldırılır (Costerton, 1993; Schulte, 2003).

Soğutma kulelerinde mikrobiyal aktiviteyle mücadele, biyositlerle gerçekleştirilir. **Biyosit**, mikroorganizmaları öldüren kimyasallara verilen genel bir isimdir. Biyositler, okside edici ve redükleyici olmak üzere iki büyük gruba ayrılırlar. Ancak doğru seçilmiş ve iyi uygulanmış bir biyosit etkili olacağından, yapılacak seçim ve uygulanacak işleme uzmanlar karar vermelidir. Ayrıca biyodispersan adı verilen kimyasallar da, biyositin film tabakasına penetrasyonunu arttırmak için kullanılmaktadır. Böylece soğutma kulelerinde gerçek anlamda temizliğin, hem kimyasal hem de mekanik müdahale gerektirdiği anlaşılmaktadır (Costerton, 1993; Bott, 1998; Cunliffe ve ark., 1999; Chauret ve ark., 2001; Schulte, 2003).

Genel olarak biyositler klor ya da brom türevli kimyasallardır. Bunlar su ile birleşerek asit oluştururlar. Bu asit, mikrobiyal populasyonun hücre materyaline, enzim sistemine ya da proteinlerine zarar vererek onu öldürür. Eğer biyodispersan kullanılmaz ise uygulanan kimyasallar biyofilm tabakasına etki edemeyecek ve mikrobiyal populasyonlar biyosit kullanılmasına karşın aktivitelerine devam edeceklerdir (LeChevalier ve ark., 1988; Bott, 1998; Morton ve ark., 1998).

Eğer kullanılmıyorsa, soğutma kuleleri boşaltılmalı ve temizlenmelidir. Kullanımda olan soğutma kuleleri yılda 4 kez mekanik olarak temizlenmeli, tortu

ve sediment tamamen uzaklaştırılmalı, organizmaların üremesini engellemek için uygun biyositler düzenli olarak kullanılmalıdır (Bott, 1998).

Biyofauling, yüzeyler üzerinde istenmeyen organizmaların birikimi olarak bilinir ve biyofauling oluşumunun en önemli sebeplerinden biri, soğutma kulelerinde artan organik karbon miktarıdır. Özümmlenebilir organik karbon (AOC) mikrobiyal üremeyi teşvik eden en önemli substrattır (Meesters ve ark., 2003). Tüm bu kirlilik, ısı iletimi veriminin düşmesine, aşırı enerji tüketimine, tıkanmaya ve sonuç olarak da sistemin durmasına yol açmaktadır. Biyofilm tabakası nedeniyle ısı iletiminin %50'ye varan oranlarda azaldığı tespit edilmiştir (Wirtanen, 1997; Flemming ve Wingender, 2001). Enerji santralleri yada endüstriyel üretim yapan tesislerde kullanılan soğutma kulelerinin temizlik nedeniyle kapatılması büyük maddi kayıplara yol açmaktadır (Harris, 2000). Biyofilm tabakası ile ilgili sorunlar hijyenin son derece önemli olduğu gıda endüstrisi ve tıp alanında da mevcuttur (Hall-Stoodley ve Stoodley, 2002; Donlan ve Costerton, 2002; Meyer, 2003; Stepanović ve ark., 2003; Gilbert ve ark., 2003).

Korozyona neden olan anaerobik sülfat indirgeyen bakterilerle birlikte aynı koşullarda yaşayabilen ve Lejyoner Hastalığı'nın etkeni olduğu bilinen *Legionella pneumophila* bakterileri su tesisatındaki biyofilmlerde bulunabilmektedir (Rusin ve ark., 1997a, 1997b; Brown ve Barker, 1999; Sungur, 2001; Meesters ve ark., 2003).

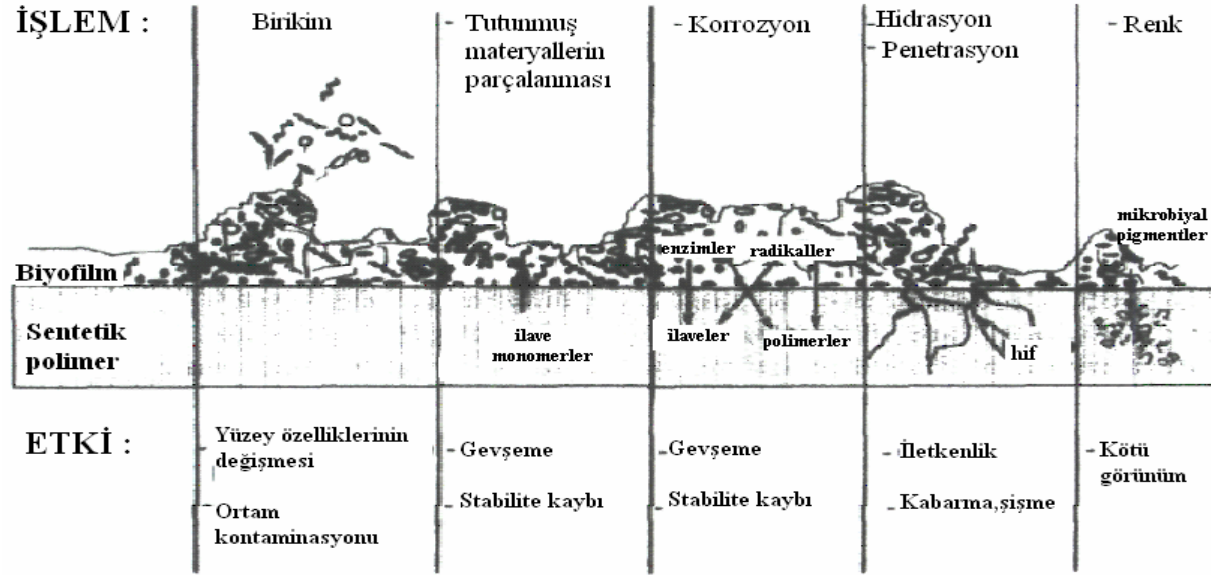
Şebeke suyu gibi umumi sularda üreme imkanı bulan patojen bakteriler bir anda binlerce kişiye bulaşabilir (Batte ve ark., 2003). Fırsatçı patojen *E.coli* ya da gastrik ülser etkeni *H.pylori* cinsi bakterilerin de biyofilm tabakası içinde çoğalarak şebeke suyu taşıyan tesisatlarda sağlık riski oluşturduğu bildirilmiştir (Boe-Hansen, 2001; Srikanth ve Berk, 1993). Bakterilerin yanı sıra enterik

virionlar ve bakteriyofajlar da biyofilmde çoğalabilmektedir (Storey ve Ashbolt, 2001).

Son yıllarda belirtilen çeşitli epidemilerin soğutma kulelerinde saptanılan bakteriler ile yakından ilişkili olduğu dikkat çekicidir (Karlicki, 2002).

1.9. Zararlı Biyofilmlerin Giderilmesi ve Kontrolü

Biyofilmlerin başlıca zararlı etkileri Şekil 1.24' de görüldüğü gibi; biyofauling, korozyon, hidrasyon ve penetrasyon ile renk değişimidir.



Şekil 1.24. Biyofilmlerin zarar şekilleri (Melo ve ark., 1993) .

Su sistemlerinde yüzeylerdeki biyofilm oluşumları sudaki mikroorganizma sayısını belirgin derecede arttıran bir rezervuar gibi çalışmaya başlar. Bu mikrobiyal birikim bazen kötü koku oluşturabilir ve sistemden çıkan suda biyofilm materyalinin küçük partikülleri gözle görülebilir. Biyofilmdeki bazı mikroorganizmaların çeşitli polimerleri okside etmesi sonucu hidrojen peroksit gibi toksik radikaller de açığa çıkmaktadır (Momba ve ark., 2000). Temel içeriğinin su olması bakımından biyofilmler yüzey iletkenliğini arttırıcı bir elektrolit görevi görürler. Bu durum elektronik ekipmanın çalışmasına olumsuz etkide bulunur (Melo ve ark., 1993). Su sistemlerindeki biyofilmler, paslanmaz çelik borulardaki demiri indirgeyerek korozyona neden olur ve borularda yeni tutunma yüzeyleri oluştururlar (Costerton ve ark., 1999; Edstrom Industry pres., 2003).

Olgun biyofilm tabakasında mikrobiyal çoğalma hiçbir zaman durmaz. Özellikle suyun akış gücü ile kopan hücre ya da hücre kümelerinin yeri hemen doldurulur. Tek bir hücre kopabildiği gibi 500 µm çapında bir hücre kümesi de yüzeyden ayrılabilir. Biyofilmden kopma süreci, enfeksiyonların yayılması ve su sistemlerinin uzak uçlarının kontaminasyonunda klinik ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Hücrelerin tabakadan tek tek kopması **erozyon**, kütleler halinde kopması ise **sloughing (dökülme)** olarak adlandırılır. Erozyon ya da dökülme suyun akış hızıyla doğrudan ilişkilidir (Telgmann ve ark., 2004). Biyofilmden ayrılma çoğunlukla erozyon ile gerçekleşirken, dökülmeye gözlenen hücre sayısının türe bağlı olarak 10 ila 300 hücre arasında değiştiği bildirilmiştir (Wilson ve ark., 2004). Özellikle besinin bol bulunduğu (ötrofik) sularda biyofilm tabakası çok hızlı gelişirken, düşük düzeyde besin bulunan (oligotrofik) sularda bu süreç yavaştır, çünkü düşük düzeyde besin maddesinin bulunduğu ortamda bakteri üremekten çok hücre canlılığının devamı için mücadele eder. Bu strateji, bakteri için önemli bir hayatta kalma çabasıdır.

Yetersiz besin ve enerji nedeniyle bakterilerin üremesi uzun bir süre engellenebilir. Oligotrofik ortamda bakterilerin açlık stresine karşı farklı bir fenotipe büründüğü, küçülerek yuvarlak bir şekil aldığı ve besin miktarı arttığında tekrar eski şekline döndüğü bildirilmiştir (Corpe ve Jensen, 1996).

Biyofilm üreten kökenler ile oluşmuş dezenfektanlara dirençli mikroorganizmaların yol açtığı salgınlar bildirilmiştir. Hidrojen peroksitin subinhibitör dozları ile karşılaşmış gram (-) bakterilerin bu maddeye tolerans kazanması da fizyolojik uyuma örnektir. Stafilokoklar gibi gram (+) bakterilerin hücre duvarı dezenfektanlara karşı etkili bir engel oluşturmaz. Mukoid ve/veya slime faktörü taşıyan stafilokoklar kloroksilenol, setrimid ve klorhekzidine daha dirençlidir. Slime faktörü uzaklaştırıldığında dirençli stafilokoklar daha duyarlı hale gelmektedir (Chapman, 1998).

Bakterilerin biyofilm yapısında bulundukları zaman çeşitli antimikrobiyellere, antiseptik ve endüstriyel biyositlere, biyofilm bakterilerinin planktonik hallerine göre, 10-1000 kat daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Douglas, 2003; Långmark, 2004). Bakterilerdeki dışarı atım pompaları, enzim modifikasyonları, belli hedef bölge mutasyonları gibi antibiyotik direnç mekanizmalarının biyofilm bakterilerinde işe yaramadığı ortaya konmuştur. Örneğin *K.pneumoniae*'ya ait β -laktamaz (-) strainin planktonik halinin 2 mg/ml ampicilin bulunan sıvı ortamda inhibe olduğu, aynı planktonik bakterinin biyofilm geliştirdikten sonra inhibisyonu için 5000 mg/ml ampicilin gerektiği ve bu miktarın planktonik hücrelerin ancak %66'sının inhibisyonuna yeterli olduğu bildirilmiştir (Komlos ve ark., 1999; Teale, 2002).

Biyofilm bakterilerindeki direncin, bakteriler arası konjugasyon, plazmit, EPS'ler gibi biyofilm spesifik maddeler ve QS spesifik etkilerin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Watnick ve Kolter, 2000; Donlan, 2001). Bazı

antimikrobiyal ajanlar oksijenli ortamda daha etkindir. Bu tür ajanın etkisinin biyofilmin anaerob ve mikroaerofilik alanlarında azalacağı, üst tabakalarda bulunan bakterilerinse antibiyotikten etkilenseler bile engelleyici özelliklerini koruyacakları ortaya konmuştur (Mah ve O'Toole, 2001). Biyofilmlerde topluluk içerisinde iş bölümü görülmekte ve enerjilerinin eldesini diğer hücrelerin ürünlerinden veya oluşan çeşitli parçalanma ürünlerinden temin edebileceği metabolitlere döndürebilmektedir. Bunun yanında biyofilmlerde üreme hızları çok yavaşladığından, metabolizmalar üzerinde biyokimyasal etki gösteren biyositlere karşı dirençleri artmaktadır (Cloete, 2003). Biyofilmdeki dirençlilik mekanizmaları olarak;

- Bakterilerdeki fenotipik değişiklikler,
- Hücre dışı polimerler veya modifiye edici enzimler tarafından antimikrobiyallerin inaktif hale gelişi,
- Besin azlığı sonucu üremenin yavaşlaması,
- Antimikrobiyalın biyofilm içine girişinin engellenmesi veya azaltılması,
- Diğer fizyolojik değişiklikler gösterilmektedir (Mah ve O'toole, 2001).

Antimikrobiyallerin yüksek doz uygulamaları gerek çevresel döngüleri olumsuz yönde etkilediğinden gerekse toksik etki gösterdiklerinden pek tercih edilmez. Su dezenfeksiyonunda sıklıkla kullanılan klor ve türevlerinin düşük miktarları büyük, yaygın, kalın biyofilmler için yetersiz kalmaktadır. Yetersiz dezenfeksiyonların ve temizlik ürünlerinin bilinçsiz kullanımının patojenik biyofilm organizmalarının neden olduğu hastalıkları arttırıcı özellik göstereceği kaçınılmazdır (Stewart, 2002).

Yapılan bir araştırmada *Listeria sp.* ve diğer tutunucu mikroorganizmaların hipoklorik aside (pH:7,0), serbestlere göre 150-3000 defa daha dirençli olduğunu bulmuştur (Ronner ve Wong, 1992). Eldeki

konvensiyonel antimikrobiyaller ve biyositlerle biyofilmi tamamen yok etmenin mümkün olamayacağı açıktır. Kontamineli su veya besin içeren sıvıların bulaştığı tüm yüzeylerde biyofilm oluşumunun kaçınılmaz olduğu, oluşan biyofilmin, bakterileri kalkan gibi koruyacağı ve bakterilerin biyofilm yapısına katıldığında genetik değişimlere uğrayabilecekleri göz önüne alınmalıdır (Stewart, 2002; Meyer, 2003).

Biyofilm tabakasının, biyositlere toleransına ek olarak karmaşık fiziksel yapısı ve dinamik doğasından ötürü ölçümü, izlenmesi, kontrolü zor olmakta ve mücadele stratejilerinin etkinliğini azaltmaktadır. Biyofilm tabakasının kontrolü, endüstriyel su sistemlerinin sağlıklı işletilmesinde çok büyük bir paya sahiptir (Türetgen, 2006).

Bir yandan antimikrobiyallere karşı gelişen direnç, diğer taraftan yeni geliştirilen antimikrobiyallerin sayısındaki azalma EPS üretici biyofilm mikroorganizmaları ile mücadelede önemli bir sorun oluşturmaktadır. Günümüzde yeni antimikrobiyal hedeflerin saptanmasına yönelik araştırmalar arasında, bir bakteri topluluğu içindeki hücrelerin birbirleri arasındaki iletişimin engellenmesi konusundaki çalışmalar, henüz pratiğe yansımamış olsa da, gelecek için umut vaatetmektedir. Kısaca QS adıyla bilinen ve bakteri hücresinin aynı topluluk içindeki türdeşlerinin yoğunluğunu algılaması ve bunun sonucunda topluluk içindeki tüm bireylerin koordine biçimde davranış değişikliği göstermesi olarak tanımlanabilecek bu özellik çok sayıda gram (+) ve gram (-) mikroorganizmada saptanmıştır. Bu mekanizmanın farklı biçimlerde inhibisyonunun antibakteriyal etki gösterebileceğine dair gözlem ve kanıtlar mevcuttur (Akova, 2005).

Bakterilerde slime üretimi ve/veya biyofilm oluşumu gibi virulans faktörlerde etkili genlerin ekspresyonunun engellenmesinin hem endüstriyel hem

de klinik açıdan önemli bir strateji olabileceği kabul edilmektedir (Hentzer ve Givskov, 2003). Bu amaçla örneğin *P.aeruginosa*'da AHL sinyal moleküllerinin tahrip edilmesi veya sentezlerinin inhibisyonu veya LuxR/AHLkompleksinin oluşumunun blokajı ile QS inhibisyonu yeni bir tedavi şekli oluşturabilecektir (Camara ve ark., 2002; Hentzer ve Givskov, 2003; Suga ve Smith, 2003).

Quorum-Quenching (QQ) olarak ifade edilen bu yaklaşım, mikroorganizmalar arası sinyal iletişimini bozarak mikroorganizma topluluklarının kontrol altında tutulmasını hedefler (Dong ve ark., 2002; Molina ve ark., 2003; Park ve ark., 2005; Rasmussen ve Givskov, 2006). Bu amaçla üzerinde çalışılan moleküllerden halojenlenmiş furanon türevleri en çok umut vaadedenler arasındadır. *Delisea pulchra* adı verilen bir deniz yosunu tarafından üretilen doğal maddeler olan halojenlenmiş furanonlar, bu yosunların bakteriler tarafından kolonize edilmesini önlemektedir. Bu tipte furanon türevlerinin çeşitli bakterilerde biyofilm üretimi dahil çeşitli AHL-aracılığı ile gelişen virulans faktörlerinin sentezini engelleyebildiği gösterilmiştir. Bu moleküllerin temel etki mekanizması LuxR proteininin parçalanmasını artırması olarak saptanmıştır. Ne yazık ki furanon türevleri insan ve diğer memelilerde toksik etki göstermektedir. Ancak temel etki mekanizmalarından hareketle toksik olmayan yeni türevlerin elde edilebilmesi için çalışmalar sürmektedir. Bazı çalışmalarda makrolid antibiyotiklerin *P.aeruginosa*'da AHL sentezini baskıladıkları gösterilmiştir. Örneğin eritromisin *P.aeruginosa*'da hemagglütininlerin, proteaz, hemolizin sentezini ve AHL sinyallerini baskılamaktadır (Hentzer ve Givskov, 2003). Ancak bu antibiyotiklerin QS mekanizmasının hangi aşamasında etkili oldukları henüz bilinmemektedir. Benzer şekilde bu antibiyotiklere karşı gelişen direncin, antibiyotiğin QS inhibe edici etkisi üzerinde yaratacağı etki de bilinmeyenler arasındadır. Henüz pratiğe yansımamış olsa da QS regülasyonu ve QQ çalışmaları aracılığıyla antibakteriyal etki elde edilmesi biyofilmlerin

engellenmesinde gelecek için umut vaat etmektedir (Xu ve ark., 2003; Park ve ark., 2005; Rasmussen ve Givskov, 2006).

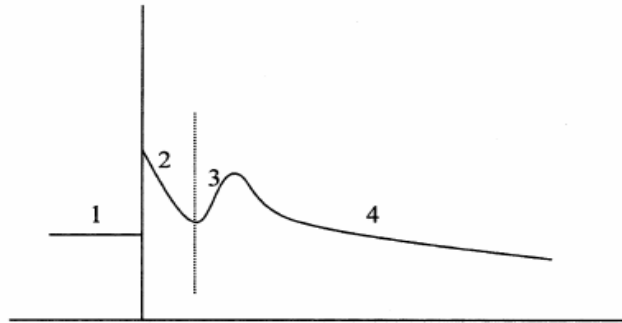
Biyofilm matriksinin polisakkarit içeriği biyofilmin stabilitesini belirleyen önemli faktörlerden biridir. Örneğin polianyonik EPS'ler metal iyonlarıyla etkileşime girebilir. Demir gibi bazı metaller biyofilm matriksi içerisine dahil edilerek matriksin stabilizasyonunda katkıda bulunabilirler (Yılmaz ve Çelik, 2007). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, memeli bağışıklık sistemi tarafından üretilen ve demir bağlayıcı özelliği bulunan laktoferrinin *P.aeruginosa*'nın biyofilm yapabilme yeteneğini ortadan kaldıracak şekilde gösterilmiştir (Singh ve ark., 2002). Bazı su bitkileri biyofilm oluşmasını engelleyen bileşikler salgılamaktadır (Manefield ve ark., 1999; Rasmussen ve ark., 2000).

Biyofilm oluşumu ile ilişkili problemlerin önlenmesi çoğunlukla insan ve çevre açısından toksik olan biyositlerle giderilmeye çalışılmaktadır. Bugün çevresel yaklaşımlara artan ilgi nedeniyle ve sağlık açısından biyofilm kontrolü için alternatif yöntemler araştırılmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri mikrobiyal birikimin yapısallaşmasından sorumlu EPS'nin biyoparçalanmasıdır. Bu amaçla incelenen/mekte olan çeşitli parçalayıcı mikroorganizmalar ve enzimler vardır (Türetgen, 2006). Örneğin; bir çalışmada kağıt hamuru fabrikasındaki oluşan biyofilm laboratuvar ortamında hazırlanmış. Daha sonra proteaz, α -amilaz ve β -glukanaz enzimlerinden oluşan enzim karışımı uygulandığında etkili bir temizlik sağlanmıştır (Wiatr, 1991). Diğer bir çalışmada, canlı hücrelerdeki glukoproteinlere benzeyen deglikosilat biyopolimerlerine karşı endoglikosidaz enzimi geliştirilmiştir. rDNA tekniği kullanılarak geliştirilen endo- β -N-asetilglukazaminidaz H (endo H) enzimi bir temizleme ajanı gibi iş görmektedir. Endo H enziminin sahip olduğu eşsiz özelliği; çeşitli yüzeylerden gelen *E.coli* ve *Staphylococcus sp.*'yi gidermesidir (Speybroeck ve ark., 1996). Ayrıca, biyofilm

oluşumunun önlenmesi ve giderilmesi için *Streptomyces* izolatlarından elde edilen EPS parçalayıcı enzimler, özellikle de kolanik asit parçalayıcı preparasyonlar hazırlanmıştır.

Klinik açıdan önemli mikrobiyal biyofilmler olan dental plakların 2 ticari enzim preparasyonu ile in vitro muamelesi sonucu parçalanması ve önlenmesi sağlanmıştır. Çalışma, yapışmayı sağlayıcı glukanların sentezinin engellenmesi, sentezlenen polisakkaritlerin yapışkan özelliğinin giderilmesi ve enzimlerin dental plak kontrol ajanı olarak kullanılabilirliğinin tayini açısından önemlidir (Marotta ve ark., 2002).

Zhang ve Bishop (2003), besin kıtlığına ya da tükenmesine bağlı olarak, EPS'nin mikroorganizmalarca parçalanmasının Şekil 1.25'de belirtildiği gibi 4 evreli bir mekanizma olduğunu ifade etmişlerdir.



0

Zaman

Şekil 1.25. EPS'nin biyoparçalanma mekanizması. **1.Aşama:** Mikrobiyal hücrelerin substrat olarak EPS'ye herhangi bir eğiliminin olmadığı faz. **2.Aşama:** Kolay parçalanabilir EPS'nin hızlı bir şekilde tüketimi. **3.Aşama:** Mikroorganizmaların ilk ilave edilen EPS'nin geri kalanı ile yeni EPS sentezi. **4.Aşama:** Yeni üretilen EPS'nin zamana bağlı olarak tüketilmesi ve aktivitenin yavaş yavaş durması.

Araştırmacılar, EPS bir substrat olarak kullanıldığında, içeriğindeki şekerlerin proteinlerden daha hızlı tüketildiği de eklemişlerdir (Zhang ve Bishop, 2003).

Uygulamada enzimlerin; ultrasonik uygulamalar, şelatlayıcı ajanlar, sürfaktanlar gibi yüzey aktif maddeleri ve enzim stabilize edici diğer antibiyofilm etkenlerle kombine halde kullanılmaları önerilmektedir (Turakhia ve ark., 1983; Oulahal ve ark., 2007). Biyofilm parçalanmasını artırıcı antibiyofilm ajanlar Çizelge 1.10'da listelenmiştir. Yapılan bir çalışmada, 10 sn 40 kHz'lik ultrason uygulaması tek başına *E.coli* ve *S.aureus* cıvık matriksleri üzerinde sırasıyla 49 ± 5 ve 39 ± 5 'lik, enzim solüsyonları ve şelatlayıcı ajan (EDTA) ilavesiyle ise sırasıyla 75 ± 4 ve 100 ± 15 'lik daha yüksek giderim sağlamıştır (Oulahal ve ark., 2007). Bilhassa metal, cam paslanmaz çelik, plastikten yapılmış endüstriyel yüzeylerdeki tutunucu bakteri EPS'lerinin bu tarz kombine uygulamalarla parçalanmaları ve/veya yapışkan özelliğinin giderilmesi ile biyofilm birikiminin önleneyeceği ortadadır (Turakhia ve ark., 1983; Johansen ve ark., 1997; Xavier ve ark., 2005; Oulahal ve ark., 2007). Başka bir çalışmada, doğal bağışıklıkta iş gören bir memeli proteini olan laktoferrinin demir-şelatlayıcı mekanizma vasıtasıyla *P.aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu önleyebildiği saptanmıştır. Buna göre, laktoferrin gibi doğal veya sentetik demir-

şelatlayıcı maddelerin genel olarak antibiyofilm ajanlar olabileceği düşünülmektedir. Yine *B.subtilis*'ten elde edilen sürfaktin ve *Lactobacillus* türlerinden elde edilen sürfaktanlar; EPS matriksin substrat yüzeyine tutunması için gerekli fiziko-kimyasal adhesif kuvvetlerin engellenmesinde rol oynayan önemli biyosürfaktanlardır (Danese, 2002).

Çizelge 1.10. Biyofilm parçalanmasını arttırıcı antibiyofilm ajanlar (Xavier ve ark., 2005).

Ajan	Orijin	Substrat	Bilgi
Enzimler			
Ham selüloz preparasyonu	<i>Trichoderma viride</i> (Maxazyme CL2000)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> B40'ın defosforillenmiş ve kısmi deramnozillenmiş EPS'si	EPS çeşitli enzim preparasyonları ile inkübe edildi ve parçalanma için analize alınmıştır. Ham enzim-hazırlama testlerinde, tek bir enzim spesifik etki göstermiştir.
Polisakkarit depolimeraz	Bakteriyofaj	Tek bakteriyal türden oluşan <i>Enterobacter agglomerans</i> GFP biyofilmleri ve <i>K.pneumoniae</i> G1'in de bulunduğu iki-türden oluşan biyofilmler	Faj glikanazlar çok speiftir. Enzim aktivitesi faj-duyarlı tek türden oluşan biyofilmlere ilave edildiği zaman gözlemlenmiştir. Bir polisakkaraz ile 60 dk muamele 2 türden oluşan biyofilm adhezyonunda %20lik azalma meydana getirmiştir.
Aljinat liyaz	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> aljinatı	<i>P. aeruginosa</i> strainlerinin aljinat liyazı aşırı üretimi yabancı tipten daha yüksek bulunmuştur. Bunun yanında diğer çalışmalar; <i>P. aeruginosa</i> filminin yapılanması için ajinat liyazın ilavesinin kopmalara neden olmadığını göstermiştir.
Agregasyon engelleyici enzim	<i>Methanosarcina mazei</i>	Hücre agregasyonu aracılığıyla <i>Methanosarcina mazei</i> heteropolisakkarit kapsülü	Büyüme için genellikle çok elverişli olmayan koşullar disagregataz aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir.
Geniş spesifiteye sahip esterazlar	Çok çeşitli bakteriler	Bakteriyal polimerlerden gelen açıl parçacıkları ve diğer esterler.	<i>Arthrobacter viscosus</i> 'dan izole edilmiş hücre içi karboksilesteraz (EC 3.1.1.1)'dan gelen asetil kalıntıları; ksantandan, aljinattan, glukoz pentaasetattan, sellobiyoz oktaasetattan, <i>A.viscosus</i> tarafından üretilen hücre dışı polisakkaritten, deasetillenmiş p-nitrofenil propiyonattan, naftil asetattan, izopropenil asetattan ve triasetinden gelen asetil kalıntılarını ortadan kaldırmıştır. Esterazlar bir biyofilm yapısının fiziksel özelliklerini değiştirebilmektedir.
Dispersin B (veya DspB)	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Değişik bakteriyal türlerin biyofilmleri için bir adhezyon faktörü olarak poli-b-1,6-GlcNAc	Solüsyondaki <i>A.actinomycetemcomitans</i> biyofilminden hücrelerin kopa sebepleri ve <i>A.actinomycetemcomitans</i> yığınlarının disagregasyonuna neden olabilmektedir. Dispersin B ile <i>S.epidermidis</i> biyofilmlerinin muamelesi; EPS matriksin disolüsyonunu ve yüzeyden biyofilm hücrelerinin kopmasına neden olmaktadır. <i>E.coli</i> , <i>S.epidermidis</i> , <i>Yersinia pestis</i> ve <i>P.fluorescens</i> tarafından biyofilm oluşumunu bozmaktadır.

Çizelge 1.10. (devam)

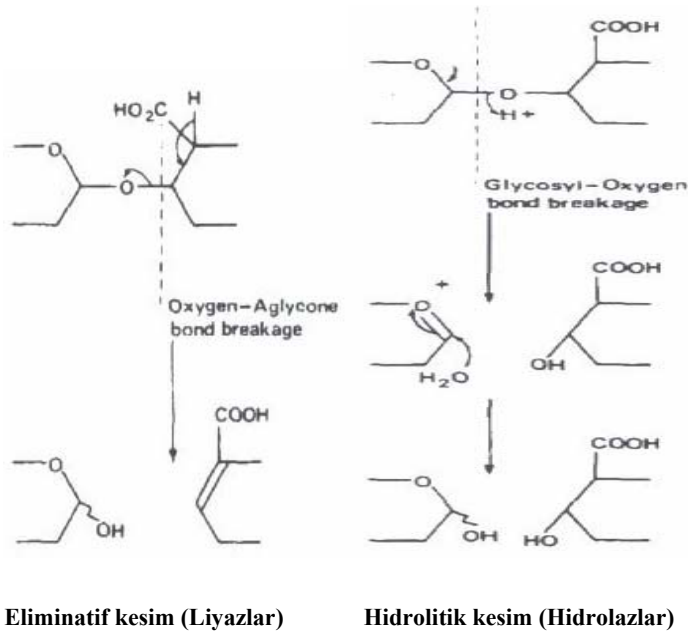
DNaz I	Ticari (Sigma-Aldrich)	<i>P. aeruginosa</i> biyofilmlerinden hücre dışı DNA'lar	DNaz ilk gelişme fazındaki biyofilmlerin oluşumu için <i>P. aeruginosa</i> 'nın kapasitesini etkilemiştir. Kurulmuş olan biyofilmler DNaz'ın varlığından oldukça az etkilenmişlerdir.
Enzim karışımı	Ticari	Çelik ve polipropilen substrat yüzeyindeki <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. fluorescens</i> ve <i>P. aeruginosa</i> biyofilmleri Tükürük kaplı hidroksiapatit substrat yüzeyindeki <i>S. mutans</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> ve <i>Fusobacterium nucleatum</i> biyofilmleri	Pektineks UltraSP (Novo Nordisk A/S, bir çoklu enzim preparasyonu) herhangi bir belirli bakterisidal aktivitesiz paslanmaz çelik üzerindeki biyofilmlerdeki bakteriyal hücrelerin sayısını azaltmıştır. Pektineks Ultra'nın aktivitesi; başlıca hücre dışı polisakkaritlerin parçalanmasıdır.
<u>Diğer ajanlar</u>			
Şelatlayıcı ajanlar		<i>P. aeruginosa</i> biyofilmi veya mukoid <i>P. aeruginosa</i> 'dan aljinat	Mutanaz ve dekstranaz hidroksiapatit'ten ağız içi plağı uzaklaştırmada kullanılmıştır, fakat bakterisidal değildir (Novo Nordisk A/S)
NaCl, CaCl ₂ veya MgCl ₂		<i>P. aeruginosa</i> biyofilmi veya mukoid <i>P. aeruginosa</i> 'dan aljinat	Bir kalsiyum-spesifik şelatlayıcı ajan olan EDTA; <i>P. aeruginosa</i> biyofilminin mikrobiyal aktiviteyi etkilemeksizin hızlı ve büyük parçalar olarak kopmasını sağlamaktadır. EDTA ve diğer şelatlayıcı ajanlar aljinat jel dayanıklılığının azalmasını sağlamaktadır. EDTA, <i>P. aeruginosa</i> ve <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin (heriki türü içeren) biyofilmlerinin süspansiyonunun viskozitesini azaltmıştır.
Biyosüpfaktanlar		<i>P. aeruginosa</i> ve <i>K. pneumoniae</i> 'nin iki türden oluşmuş biyofilmleri	Sodyum tuzları ve şelatlayıcı ajanları içeren çeşitli slime dispersantlarının kullanıldığı deneyler, aljinat jel dayanıklılığının sodyum tuzları tarafından şelatlayıcı ajanların kullanımı ile gözlenenden daha az da olsa azaltıldığı saptanmıştır. Zarar görmemiş biyofilmin NaCl, CaCl ₂ veya MgCl ₂ ile muamelesi; toplam biyofilm proteininin belirli bir yüzdesinin hızla kopması ile sonuçlanmıştır. Ortamın iyonik dayanıklılığını artırarak biyofilm yapışkanlığı azaltılmaktadır.
Üre		<i>P. aeruginosa</i> ve <i>K. pneumoniae</i> 'nin iki türden oluşmuş biyofilmleri	Toplam biyofilm proteininde azalma gözlenmiştir. Muhtemelen biyofilm matriksin çapraz bağlanması ile ilişkili hidrofobik ilişkileri bozmaktadır. Üre ile muamele; biyofilm süspansiyonunun viskozitesinde %46'lık bir azalma sağlamıştır. Hidrojen bağının biyofilme çapraz bağlanmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

1.10. Polisakkarit Parçalayıcı Mikrobiyal Kökenli Enzimler ve Substratları

Glukanların yapılarını kesen, parçalayan enzimler genel olarak **polisakkarit-parçalayan enzimler (polisakkarazlar)** olarak adlandırılırlar ve etki tarzlarına göre başlıca 2 gruba ayrılırlar:

1. Polisakkarit liyazlar ve
2. Polisakkarit hidrolazlar olarak.

Genellikle, polisakkarit liyazlar (EC4.2.2) polimerik şekerleri parçalamak için **proton alış-verişi (PAD=Proton Acceptance and Donation)** ve benzeri mekanizmalara dayanan **β -eliminasyon prosesi** (Şekil 1.24) kullanır. Polisakkarit liyazların parçalama mekanizmaları temel olarak enzim tarafından substrattan bir protonun alınımı ve daha sonra enzimden β -1,4 bağlı glikozidik oksijene farklı bir protonun verilimi ile gerçekleşmektedir (Jedrzej, 2000)



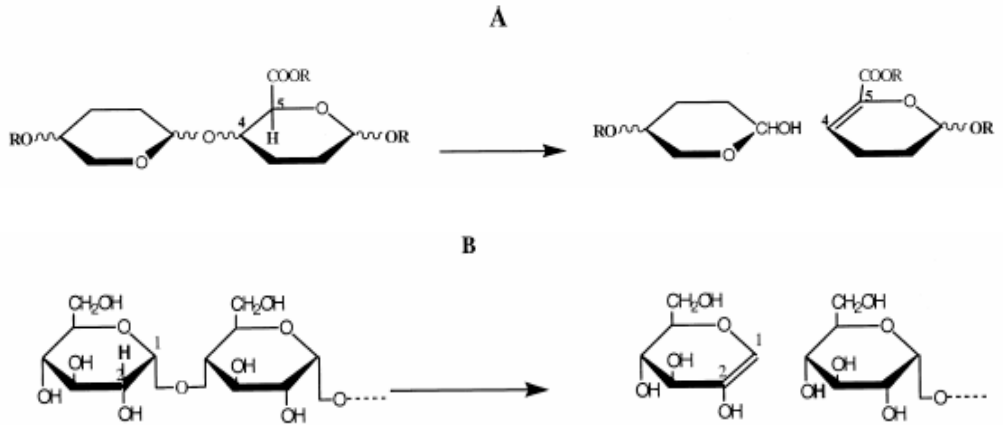
Şekil 1.26. Polisakkarit liyazların β -eliminasyon mekanizması ile glikanohidrolazların hidrolitik aktivitesinin mukayesesi (Sutherland, 1995).

Michaud ve ark. (2003), polisakkarit liyaz ailelerini Çizelge 1.11'deki gibi sınıflandırmışlardır.

Çizelge 1.11. Polisakkarit liyaz aileleri (Michaud ve ark., 2003).

Aile no'su	Tanımlanmış aktivitesi	EC numarası	Sekans sayısı	Organizmalar
1	Pektin liyaz Pektat liyaz	EC 4.2.2.2 EC 4.2.2.10	133	Bakteriler, funguslar, bitkiler
2	Ekzo-poligalakturonat liyaz Pektat liyaz	EC 4.2.2.9 EC 4.2.2.2	6	Bakteriler
3	Pektat liyaz	EC 4.2.2.2	24	Bakteriler, funguslar, nematodlar
4	Rhamnogalakturonan liyaz	EC 4.2.2.-	11	Bakteriler, funguslar, bitkiler
5	Aljinat liyaz	EC 4.2.2.3	6	Bakteriler
6	Aljinat liyaz Kondroitinaz B	EC 4.2.2.3	3	Bakteriler
7	Aljinat liyaz α -L-guluronat liyaz	EC 4.2.2.4	9	Bakteriler
8	Hiyaluronat liyaz Kondroitin ABC liyaz Kondroitin AC liyaz	EC 4.2.2.3	25	Bakteriler
9	Pektat liyaz Ekzo-poligalakturonat liyaz	EC 4.2.2.11	17	Bakteriler
10	Pektat liyaz	EC 4.2.2.1	7	Bakteriler
11	Rhamnogalakturonan liyaz	EC 4.2.2.4	9	Bakteriler
12	Heparin-sülfat liyaz	EC 4.2.2.5	7	Bakteriler
Sınıflan- dırılma- yanlar	Jelan liyaz Aljinat liyaz Oligo aljinat liyaz	EC 4.2.2.2	16	Bakteriler, viruslar

Polisakkarit hidrolazlar ise, substratlarının parçalanmasında **direkt bir yer değişimi (DD=Double Displacement)** mekanizmasını kullanarak **hidrolizis prosesi** (şekerler arasındaki glikozidik bağların hidroliz) ile özellikle anyonik ve nötral polisakkarit polimerler üzerindeki 1,4 glikozidik bağları keserek iş görürler (Şekil 1.26). Bunun yanında tüm bu enzimler kendi içlerinde glikozidik uçların kesimi için uçlara göre spesifiteye sahip veya sahip olmayan çeşitli seçici mekanizmalara sahiptir (Şekil 1.27) (Jedrzejewski, 2000).

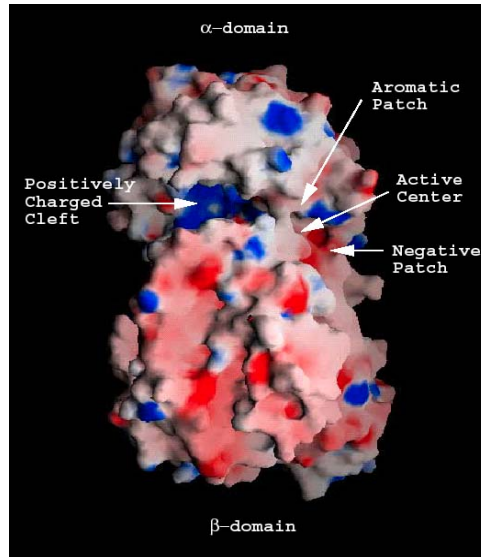


Şekil 1.27. Polisakkarit liyazlar tarafından anyonik (A) ve nötral (B) polisakkaritlerin kesimi (Sutherland, 1995).

Enzimler faaliyetlerini genelde pH:7,5-11 aralığında gerçekleştirmekte, 230-235 nm'de UV ışığı altında artan absorpsiyondan enzim ürünlerindeki artışla aktiviteleri rahatlıkla saptanabilmektedir. Polisakkarit liyazların büyük çoğunluğu mikrobiyal, daha nadir olarak da ökaryotik orijinlidir. Substratları ökaryotik kaynaklı olabildiği gibi mikrobiyal EPS de olabilmektedir. Bazı bakteriyal patojenler konak savunma mekanizmasını çökertmek ve konağa

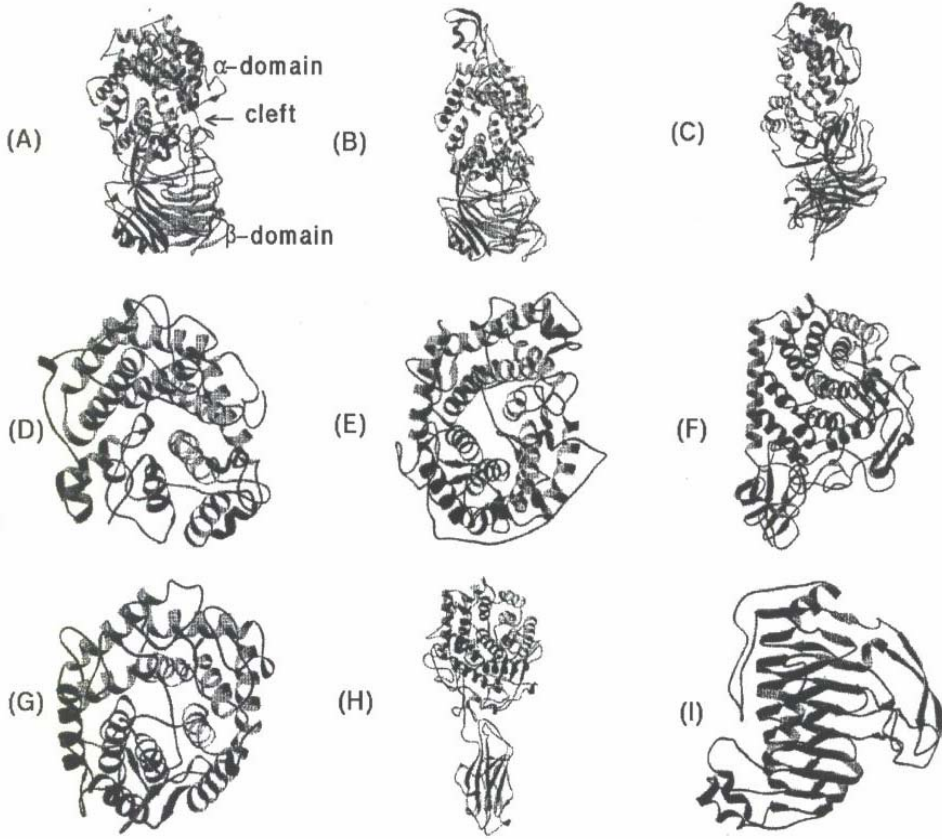
bakteriyal invazyon amacıyla glukon-degrade edici enzimleri sıklıkla kullanırlar (Michaud ve ark., 2003).

Polisakkarit zincirlerini parçalayıcı enzimlerin üç boyutlu yapıları son yıllarda X-ışını ile detaylı incelenmesiyle aydınlatılmaktadır (Şekil 1.28). Bu enzimlerin çoğunluğu benzer temel bir yapısal modele sahiptir. Öyle ki bu yapı $\alpha 6/\alpha 6$, $\alpha 6/\alpha 5$ veya $\alpha 5/\alpha 5$ topolojili fıçı-benzeri katlanmaya sahiptir (Jedrzejask, 2000).



Şekil 1.28. Polisakkarit parçalayıcı enzimlerin fıçı-benzeri genel yapısı (Li ve ark., 2000).

Fıçı-benzeri bu yapının, birbirine kısa bir peptit bağı ile bağı olan α -domain (N-uca sahip α -helikal katalitik kesim bölgesi) ve β -domain (C-uca sahip β -katlanmalar bölgesi) olmak üzere 2 farklı yapısal domainden oluştuğu düşünülmektedir (Şekil 1.29). Heliks ve katlanmaların oluşturduğu bu yapının bir ucu diğerine göre daha dar olup helikslerin sayısında ve katlanmaların detaylarında büyük farklılıklar mevcuttur (Jedrzejask, 2000).



Şekil 1.29. Çeşitli polisakkarit-parçalayıcı enzimlerin üç-boyutlu yapıları ile heliks ve katlanma yapıları. **(A)** *S. pneumoniae* hiyaluronat liyazı; **(B)** *S.agalactiae* hiyaluronat liyazı; **(C)** *Flavobacterium heparinum* kondroitin AC liyazı; **(D)** *Sphingomonas sp.* aljinat liyazı A1-III; **(E)** *Aspergillus awamori* glukomilazı; **(F)** *Clostridium thermocellum* endoglukanazı CelD; **(G)** *C.thermocellum* endoglukanazı CelA; **(H)** *Thermomonospora fusca* endo/ekzoselülaz; **(I)** *Aspergillus niger* pektin liyazı (Jedrzejewski, 2000).

1.10.1. Mikrobiyal polisakkaritler üzerinde aktiviteye sahip polisakkarazlar

1.10.1.1. Aljinat liyazlar

Aljinatlar sadece aljinat liyazlar (endo veya ekzo) tarafından β -eliminasyon prosesi ile enzimatik olarak depolimerize edilirler. Bu enzimler ilk kez Preiss ve Ashwell tarafından tanımlanarak 2 kategoride toplanmışlardır:

1. PM (polimannuronat= β -D-mannuronat) liyaz (EC 4.2.2.3)
2. PG (poligulukuronat= α -L-gulukuronat) liyaz (EC 4.2.2.11)

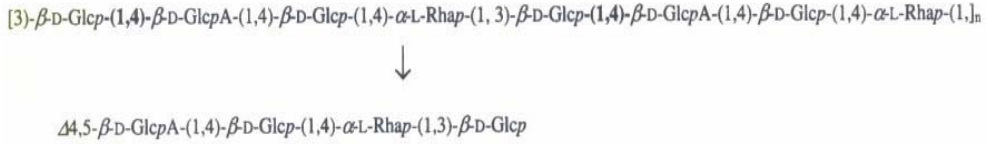
Bazı liyazların (PG/PM liyazlar) PG ve PM'ye eşit spesifiteler gösterdiği de belirtilmiştir (Çizelge 1.12). Denizsel molluskalar, funguslar, bakterilerden elde edilmiş olan bu liyazlar bakteriyofaj veya virüs ilişkili de olabilmektedir (Sutherland, 1995; Michaud ve ark., 2003).

Çizelge 1.12. Aljinat liyazların kesim bölgeleri (Michaud ve ark., 2003).

Enzim aktivitesi	Kesimin olduğu bağ	Kaynak
PM Liyaz	[4]- β -D-ManpA(1,4)- β -D-ManpA-(1,]	<i>Dolabella</i>
	[4]- β -D-ManpA(1,4)- β -D-ManpA-(1,]	<i>Haliotis tuberculata</i>
	[4]- β -D-GulpA(1,4)- β -D-ManpA-(1,]	
	[4]- β -D-ManpA(1,4)- β -D-ManpA-(1,]	<i>Azotobacter</i>
	[4]- β -D-ManpA(1,4)- β -D-GulpA-(1,]	<i>Pseudomonas</i>
PG Liyaz	[4]- β -D-GulpA(1,4)- β -D-GulpA-(1,]	<i>Enterobacter chloaceae</i>
PM/PG Liyaz	[4]- β -D-ManpA(1,4)- β -D-ManpA-(1,]	<i>Alteromonas sp.</i>
	[4]- β -D-GulpA(1,4)- β -D-GulpA-(1,]	
	[4]- β -D-ManpA(1,4)- β -D-GulpA-(1,]	

1.10.1.2. Jelân liyazlar

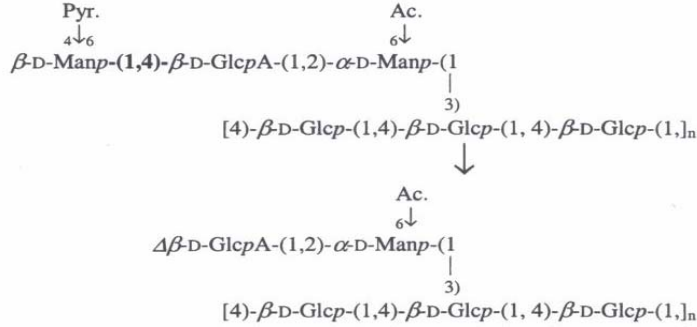
Jelân liyazlar **jelanazlar** olarak da adlandırılırlar. Jelânın β -eliminasyon mekanizması ile degradasyonu özellikle *Sphingomonas* gibi jelân üretici strainlerde detaylı olarak incelenmiştir. Bugün gıda ve diğer endüstrilerde kullanımı için daha düşük viskoziteli jelân hazırlamak amacıyla, diğer taraftan fırsatçı bir patojen olan *S.paucimobilis*'in virulensliği ve adhezyonunda rol oynayan jelânın biyosentezinin kontrolü amacıyla jelanazların kullanımıyla ilgili yeni metodlar araştırılmaktadır (Sutherland, 1995; Hashimoto ve ark., 1998; Michaud ve ark., 2003).



Şekil 1.30. Jelân liyazlar tarafından deasetillenmiş jelân depolimerizasyonu (Michaud ve ark., 2003).

1.10.1.3. Ksantan liyazlar

Ksantan parçalayıcı enzimler başlıca 2 grupta toplanmışlardır: İlk grup; ana selülozik zincir üzerinde etkili olan hidrolazlar olup **selülaz ailesi üyeleri** olarak sınıflandırılmıştır. Diğer grup ise; ksantanın yan zincirine etkili ksantan liyazlar olup, polimer bir yan zincirdeki bağları kesen ve monosakkarit oluşumuna neden olan tek polisakkarit liyaz örnekleridir (Sutherland, 1995; Hashimoto ve ark., 2001; Michaud ve ark., 2003). Ksantan liyazlar tarafından ksantanın depolimerizasyonu Şekil 1.31'de gösterilmiştir.



Şekil 1.31. Ksantan liyazlar tarafından ksantan depolimerizasyonu. Glikozidik bağ koyu olarak gösterilen kısımdan kesilmiştir (Michaud ve ark., 2003).

1.10.1.4. Glukuronan ve glukuronan liyazlar

Glukuronan, bir bakteri tarafından salgılanan ilk homoglukuronik asit polimeri örneğidir. Yonca kökleri üzerinde nodül oluşumunu artırıcı etkiye sahip *Sinorhizobium meliloti* M5N1CS mutant straininin (NCIMB 40472) C-2 ve/veya C-3 pozisyonunda kısmen asetillenmiş yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) ve düşük moleküler ağırlıklı (1,4)-β-D-poliglukuronik asite uygun bir glukuronan ürettiği saptanmıştır. Üç glukuronan çeşidi:

1. Standart (başlıca 3-0-asetillenmiş)
2. Fazla asetillenmiş (başlıca 2,3-di-0-asetillenmiş) ve
3. Deasetillenmiş glukuronandır (asetillenmişlerin alkali ile muamelesi sonucunda elde edilen).

S.meliloti M5N1CS straini ile ilişkili 20 kDa'luk bir glukuronan liyaz (GlyA) tanımlanmış, saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu enzim GlyA üretici strain tarafından salgılanan glukuronanı kesebilmektedir. Doğal glukuronan C-2 ve/veya C-3 pozisyonunda kısmen asetillenmiş olup deasetillenmiş olana göre daha az degrade edilmektedir (Michaud ve ark., 2003).

1.10.1 Bitki ve algal polisakkaritler üzerinde aktiviteye sahip polisakkarit liyazlar

1.10.2.1. Pektin ve pektin liyazlar

Pektik maddeler yüksek bitkilerin hücre duvarlarından ekstrakte edilen başlıca kompleks heteropolisakkaritlerdir. Pektin üzerinde tanımlanan 4 özel bölge vardır.

1. **bölge;** Homogalakturnan (HGA),
2. **bölge;** Rhamnogalakturnan I (RG-I),
3. **bölge;** Rhamnogalakturnan II (RG-II) ve
4. **bölge;** Ksilogalakturnan'dır.

Birinci bölge “düz”, son üç bölge ise “dalımsı bölge” olarak tanımlanır. HG düz, C-2 ve/veya C-3 pozisyonlarında olası bir asetilasyona sahip α -D-GalA 1,4 bağlı ve kısmen 6-O-metilatlanmış bir polimerdir. RG-I’ da; C-2 ve C-3 pozisyonu kısmen asetillenmiş bir α -(1,4)-galakturonik asit omurgası bulunur. Bu omurgada α -(1,2) bağlı L-rhamnopyranosil bağlı kısımlar bulunur: [4)- α -D-Galp-(1,4)- α -D-GalpA-(1,2)- α -L-Rhap-(1,]n veya [4)- α -D-GalpA-(1,2)- α -L-Rhap-(1,4)- α -D-GalpA-(1,]n dir. Rhamnopyranosil parçaları üzerinde C-4 ve/veya C-3 pozisyonunda arabinan, galaktan ve arabino galaktanlar yan zincirler olarak bağlı bulunurlar. RG-II; kompleks birçok şekeri içeren yan zincirlere sahip bir galakturonan omurgalı çok kompleks bir heteropolisakkarit olarak tanımlanır. Ksilogalakturnan bölgesi; D-ksiloz tarafından C-3 pozisyonunun yerini almış yüksek bir homogalakturnan zincir olarak tanımlanır. Pektin ve pektat liyazlar düz bölgeler (homogalakturnan) üzerinde,

ramnogalakturonan liyazlar da dallı bölgeler üzerinde aktivite gösterirler. Pektin liyazlar başlıca fungal türler tarafından pektindeki α -1,4 bağlarını keserler. Fungal pektin liyazlar özellikle *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Sclerotium* türleri tarafından üretilir. Sadece birkaç bakteri pektin liyaz sentezleyebilmektedir. Bakteriyal bir pektin liyaz örneği *Pseudomonas marginalis* N6301'in enzimidir. Diğer bir bakteriyal pektinolitik aktivite örneği bitkilerde yumuşak kök oluşturan fitopatojenler olan *Erwinia chrysanthemi* ve *E. carotovora*'nın bitki hücresi duvarlarının oluşumunu engellemesidir. Bu mikroorganizmalar dışında *Aspergillus aculeatus*, *Pseudomonas cellulosa*, alkalifilik *Bacillus* sp. straini, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Nectria haematococca*'da çeşitli pektin liyazlar tanımlanmıştır (Michaud ve ark., 2003).

1.10.2.2. Ulvan ve ulvan liyazlar

Ulvan, deniz marulu olarak bilinen yenebilir deniz yosunu (alg) *Ulva* sp.'den ekstrakte edilen, suda çözülebilen bir polisakkarittir. Bugün alglerden 4 ayrı polisakkarit elde edilebilmektedir. Bunlar; ulvan, çözülmeyen amorf ksiloz içeren selüloz, alkali çözülebilir bir glukuronan ve ksiloglukandır. Ulvan sülfatlanmış bir ksilorhamnoglukuronan olup 2 temel aldobiouronik asit polimerli yapıdadır. Bu polimerler:

-Ulvanobiouronik asit A: [4)- β -D-GlcpA-(1,4)- α -L-RHap-3-sülfat-(1,]

-Ulvanobiouronik asit B: [4)- α -L-IdopA-(1,4)- α -L-Rhap-3-sülfat-(1,]

dır.

Ulvan ne insan sindirim enzimlerince ne de bağırsak florası tarafından degrade edilememektedir. Lahaye ve ark. (1997) tarafından izole edilen deniz kökenli bir bakteri tarafından ulvanın endolitik tarzda kesildiği bildirilmiştir. Bu mikroorganizmanın ham ekstraktı ulvanobiouronik asidi: A3S [4)- α -L-Rhap-3-

sülfat-(1,4)- β -D-GlcpA-(1,] keserek indirgenmiş uç olarak 4-deoksi-L-treo-heks-4-enopyranosiluronik aside sahip çeşitli oligosakkaritlerin oluşumuna neden olmuştur (Michaud ve ark., 2003).

1.10.2.3. α -(1,4)-glukan ve α -(1,4)-glukan liyazlar

α -(1,4)-glukan, depo polisakkaritleri ve oligosakkaritlerin en iyi bilinen ailesidir. Bunlar α -(1,4)-D-glukopiranosil polimerleridir. Yapılarındaki yan zincirler α -(1,6) bağları ile α -(1,4)-D-glukopiranosil ana zincirine bağlıdır. α -(1,4)-glukan liyazlar (EC 4.2.2.13), nötral polisakkaritler üzerinde aktivite gösteren tek liyaz örnekleridir. Onlar amiloz, amilopektin ve maltodekstrinleri ekzolitik tarzda parçalarlar. Ve indirgenmemiş uçlarından 1,5-anhidrofruktoz üretirler. Maltozdan 1,5-anhidrofruktoz ve glukoz içeren bir karışım olarak üretilirler. α -(1,4)-glukan liyazlar kırmızı deniz algleri *Gracilaria sp.* ve *Gracilariopsis sp.*'den ve fungus türleri olan *Morchella costata* ile *M.vulgaris*'den izole edilmiştir. Bu iki fungal liyaz, %91'lik aminoasit sekans homolojisi bakımından yüksek bir benzerlik göstermişlerdir. Diğer glukan liyazların *E.coli* gibi bakterilerde, rat karaciğerinde ve insan hücre hatlarında saptandığına dair veriler mevcuttur (Michaud ve ark., 2003).

1.10.3. Glikosaminoglukanlar (GAGs) üzerinde aktiviteye sahip polisakkarit liyazlar

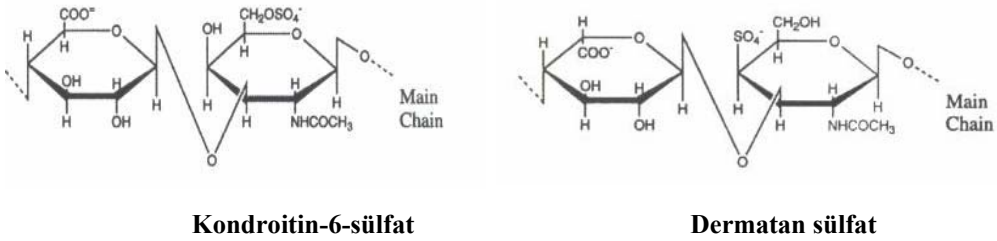
Hayvanlarda glikosaminoglukanlar, bir kılıf proteinine bağlı düz, anyonik heteropolisakkarit grubunu oluşturmaktadır. Proteoglukanlar 2 temel sınıfa ayrılırlar:

1. sınıf: Kondroitin sülfatları içeren galaktosaminoglukanlar.

2. sınıf: Heparin (ve heparan sülfat), hiyaluronik asit ve keratan sülfatı içeren glukosaminoglukanlar.

1.10.3.1. Kondroitin sülfatlar ve kondroitin sülfat liyazlar

Kondroitin sülfatlar (CS), omurgalılarda hücre dışı matrikslerde bol miktarda bulunan içeriklerdir (Şekil 1.30). Kondroitin ve heparin bakteriler tarafından sentezlenmemektedirler. Fakat çeşitli *E.coli* strainlerinden izole edilen bazı EPS'lerin bu ökaryotik polimerlerle benzer özellikler taşıdığı gözlenmiştir. Omurgalılarda 3 farklı formu tanımlanmıştır. Bunlar: CS A, CS B (veya dermatan sülfat) ve CS C' dir. CS A ve CS C'deki tekrarlayan birim bir disakkarit [4)-β-D-GlcAp-2-sülfate-(1,3)-β-D-GalpNAc-4 veya 6-sülfat-(1,] içerir (Şekil 1.32). Dermanan sülfat (CS B) da benzer yapı gösterir fakat diğerlerindeki glukuronik asit yerine iduronik asit (IdoA) bulunur ve düşük oranda 6-sülfatasyonu görülür (Sutherland, 1995).



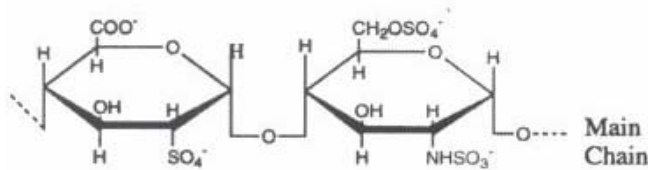
Şekil 1.32. Kondroitin-6-sülfat ve Dermanan sülfatın yapısı.

Polisakkarit liyazlar ile kondroitinin degradasyonu 3 spesifik aktivite ile katalizlenir:

1. Kondroitin ABC liyazların (veya kondroitinaz ABC) kondroitin sülfat ve dermatan sülfat üzerindeki,
2. Kondroitin AC liyazların (kondroitinaz AC) kondroitin sülfat üzerindeki,
3. Kondroitin B liyazların (kondroitinaz B) dermatan sülfat üzerindeki, 3)- β -D-GalpNAc-(1,4)- β -D-GlcA veya - α -L-IdopA-(1, bağı üzerindeki aktiviteleridir. GAG (Glikosaminoglikan) liyazların; *Proteus vulgaris*, *Flavobacterium heparinum*, *Pseudomonas sp.*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, β -*Streptokoklar*, *Streptococcus intermedius*, *Porphyromonas gingivalis* gibi çeşitli bakterilerce üretildiği literatürlerde vurgulanmıştır (Michaud ve ark., 2003).

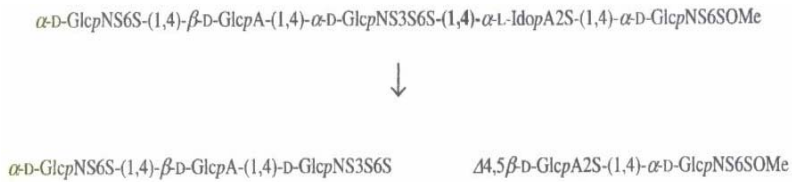
1.10.3.2. Heparin, heparan sülfat ve heparan sülfat liyazlar

Heparin hücre içi iken heparan sülfat ise hemen hemen tüm memeli hücrelerde yapışkan yüzeylerde bulunmaktadır. Heparin ve özellikle son zamanlarda LMW (Low Molecular Weight) heparinler klinik antikoagülanlar olarak geniş bir kullanıma sahiptir. GAG'lar benzer yapılara sahip olup α - ve β -1,4) bağlı üronik asit (D-GlcA ve /veya L-IdopA) ve glukozamin (D-GlcN-Acetyl veya N-Sulfoyl) tekrarlayan disakkarit birimlerini içerirler (Şekil 1.33).



Şekil 1.33. Heparinin yapısı.

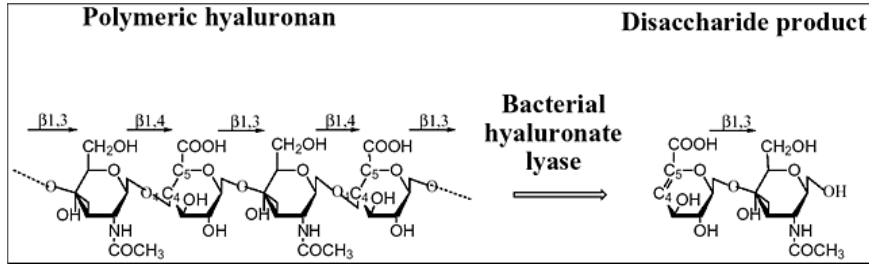
Flavobacterium heparinum'un sahip olduğu 3 farklı heparinaz (heparin liyaz); 42.8 kDa'luk Hep liyaz I (EC 4.2.2.7), 84.1 kDa'luk Hep liyaz II (EC numarası yok) ve 70.8 kDa'luk Hep liyaz III (EC 4.2.2.8) tür. Bu heparin liyazlar heparin-benzeri GAGları (HLGAGs) endolitik tarzda parçalarlar. Diğer bir bakteriyal heparin liyaz *Bacteroides stercoris*'de saptanmıştır. Bakteriyal ve fungal heparin liyazlara ilaveten, heparin üzerindeki enzim aktivitesinin bakteriyofajlar ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Michaud ve ark., 2003).



Şekil 1.34. Sentetik heparin pentasakkarit üzerindeki antitrombin III-bağlı bölgedeki heparinaz I aktivitesi (Michaud ve ark., 2003).

1.10.3.3. Hiyaluronan ve hiyaluronan liyazlar

Hiyaluronik asit olarak da adlandırılan hiyaluronan omurgalılarda birçok dokuda (deri, kıkırdak, beyin) ve doku sıvısında, ekstraselüler matrikslerde hatta *Streptococcus zooepidemicus* gibi bazı bakterilerde (kapsüler polisakkarit olarak) bulunan komponentlerden birisidir. Onun sülfatlanmamış halinin glikosaminoglikanların (GAG'ların) en basiti ve stabili olduğu düşünülmektedir. Hiyaluronanın orijini ne olursa olsun yapısı aynıdır (Şekil 1.35) (Michaud ve ark., 2003).



Şekil 1.35. Hiyaluronanın yapısı ve parçalanması (Jedrzejewski ve ark., 2002).

Hiyaluronidazların başlıca 3 sınıfı (ilk 2 sınıfı hidrolaz olan) vardır:

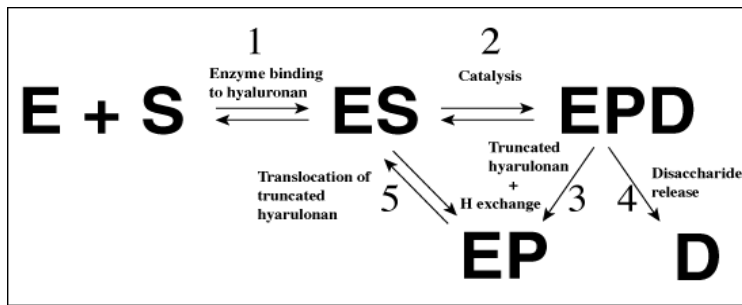
1. Hiyaluronat 4-glikanohidrolaz (hiyaluronoglukosaminidaz): Bu enzimler hiyaluronan, kondroitin ve belirli kondroitin sülfatlardaki β -N-asetilheksozamin-(1,4) glikozidik bağlarını keser. Substratın indirgenmesiyle değişik sayılarda oligosakkarit birimleri ve N-asetil glukozamin meydana gelmektedir. Örnek: Testicular hiyaluronidaz.

2. Hiyaluronat 3-glikanohidrolaz (hiyaluronoglukuronidaz): Bunlar hiyaluronandaki glukuronik bağ için spesifik olup diğer polisakkaritler için etkisizdirler. Örnek: Parazit hiyaluronidazı. Belirtilen ilk 2 grup hayvansal orijinli olup genel olarak “glikanohidrolazlar” adını da alırlar.

3. Hiyaluronat liyaz (EC 4.2.2.1 veya 4.2.99.1): Bakteriyal hiyaluronidazlar olup bu enzimler β -eliminasyon prosesi ile hiyaluronanı sadece β -(1,4) glikozidik bağlarından keserek genelde 4,5-doymamış disakkarit: [Δ 4,5- β -D-GlcA-(1,3)- β -D-GlcNAc] üretirler (Şekil 1.36). Bunlar diğer iki sınıftan hidrolizis aktivitesi göstermemesiyle ayrılır.

Genellikle hayvansal orijinli olanları **glikanohidrolazlar**, bakteriyal kökenlileri ise **hiyaluronat liyazlar** olarak adlandırılırlar. En iyi bilinen

hiyaluronat liyazlar, *Streptococcus pneumoniae* ve *S.agalactiae* hiyaluronat liyazları olup bunlar hiyaluronanı disakkarit son ürünlere (2-asetamido-2-deoksi-3-0-(β-D-gluko-4-enepyranosyluronikasit)-D-glukoz(ΔDi-HA)) parçalarlar. Benzer şekilde *Streptomyces hyalurolyticus* hiyaluronidazı da bir eliminazdır (Sutherland, 1995; Li ve Jedrzej, 2001; Jedrzej ve ark., 2002; Michaud ve ark., 2003).



Şekil 1.36. Hiyaluronanın hiyaluronat liyaz aktivitesi ile parçalanmasının şematik gösterimi. E: Enzim, S: Hiyaluronan substrat, EPD: Enzime hiyaluronan substrat bağlı bir disakkarit ürünlü kompleks, EP: Enzime hiyaluronan substrat bağlı fakat enzimin aktif merkezinden disakkarit ürünün salınmasıyla oluşan kompleks (Jedrzej ve ark., 2002)

1.10.4. Polisakkarit parçalayıcı diğer bazı enzimler

Birçok EPS üretici bakteri polisakkarit-indükleyici bakteriyofaj için konukçu olabilirler. *Azotobacter vinelandii* aljinat liyaz, *Streptococcus sp.* hiyaluronidazı, *Klebsiella serotip K5* polisakkarit liyazı [β-D-Manp(1,4)-β-D-GlcpA], *Klebsiella serotip K14* polisakkarit liyazı [β-D-Manp(1,4)-β-D-GlcpA]; *E.coli K5* polisakkarit liyazı [α-D-GlcpNAc(1,4)-β-D-GlcpA], *Rhizobium sp.* polisakkarit liyazı bu tarzdadır. Bakteriyofaj ilişkili enzimlerin büyük çoğunluğu bakterilerin dış yüzeyler üzerindeki karbohidrat-içeren polimerlerin

parçalanmasını sağlarlar (Sutherland, 1999b). Pullulan çoğu amilazlar ile parçalanamaz fakat *Enterobacter aerogenes*'den izole edilen spesifik pullulanaz enzimi ile parçalanabilmektedir. Bu enzim pullulanın maltotrioz (ve maltotetraoz) birimlerinin hidrolizinde rol oynar (Wiley ve ark., 1993).

1.10.5. Polisakkarit parçalayıcı enzimler ve ürünlerinin uygulama alanları

Birçok mikrobiyal tür, polisakkarit-parçalayıcı enzimler ile substratları parçalayıp kolaylıkla C ve enerji kaynağı olarak kendileri için yararlanırlar (Michaud ve ark., 2003; Sutherland, 1995 ve 1999b).

Örneğin, *Alteromonas macleodii*'nin spesifik liyazı ile parçalanmış doymamış PG, PM ve aljinat karışımının bitkilerde kök büyümesini arttırdığı saptanmıştır (Natsume ve ark., 1994). Diğer bir çalışmada, bir *Alteromonas* türünden liyaz ile temin edilen oligomerlerin, oligogalakturonik asitlere benzer bitki sinyal molekülleriymiş gibi davrandığı belirtilmiştir (Ryan ve Farmer, 1991). Yine aljinatın kabuksuz pirinç *Brassica rapa var pervidis* tohumları ve tütün kallusu üzerinde bitki büyümesine (çimlenme yeterliliği ve sürgün uzaması) olumlu bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu gibi nedenlerden dolayı doymamış oligoaljinatların ve oligouronatların tarımsal endüstride biyokimyasal gübreler ve fitosanitary ürünler olarak kullanımları önerilmiştir (Murata ve ark., 1993). Fitopatogenik fungusların hücre duvarı komponentlerinin parçalanması sağlanarak tarımsal ve gıda atıklarının muamelesinde, hayvan yemlerinin ve diğer materyallerin hazırlanması gerçekleştirilebilir (Sutherland, 1999b).

Ayrıca aljinazlar, aljinatın tayininde spesifik yollar da sağlar. *Klebsiella* aljinat liyazı bu tip uygulamalar için kullanılmıştır. Ayrıca, *Klebsiella* glukuronat liyazın ve bir *Halictis tuberculata*'dan sağlanan polimannuronat liyazın aljinatların spektrofotometrik analizi için kombine kullanımı da önerilmiştir (Østgaard, 1992). Başka bir çalışmada, liyaz-üretici bir *K.aerogenes* straininin

büyümesi ve enzim üretimi ve glukuronat-spesifik aljinat liyazın kullanımında *Laminaria digitata*'dan canlılığını sürdürebilen protoplastların üretimi amacıyla da çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Østgaard, 1993).

Aljinazlar ve onlarla ilgili enzimler algal hücre duvarlarının polimerlerinin yerlerinin tayininde de kullanılabilirler. *H.tuberculata*'dan ham enzim preparasyonları selüloz, fukanaz ve proteaz aktivitelerini uzaklaştırmak için kısmi saflaştırılmış ve aljinat liyaz kahverengi alglerden protoplastların hazırlanmasında kullanılmıştır (Boyen ve ark., 1990).

Rhizobium trifolii'nin faj liyazının aktivitesiyle oluşan ürünler, yonca kök saçaklarında iplikçikler oluşturarak enfeksiyon oluşumunu teşviklendiği bildirilmiştir (Sutherland, 1995).

Polisakkarit parçalayıcı enzimlerin bir kısmı -veya onların aktivitesiyle elde edilen ürünler- ticari biyoteknolojik ürünler olarak geliştirilmeleri açısından da elverişlidir. Bugün bazı enzimler geniş uygulama alanına sahiptir. Bunlar arasında ticari olarak kullanılan pektat liyazlar çeşitli meyve sularının teknolojik olarak hazırlanmasında başlıca öneme sahiptir (Sutherland, 1995).

Aspergillus genusu bitki hücre duvarındaki selüloz, hemiselüloz (ksiloglukanlar, ksilan, galaktomannan=glukomannan) ve pektin gibi polisakkaritleri parçalayıcı enzimlerin üretimi için yaygın olarak kullanılırlar (Vries ve Visser, 2001). Bitki hücre duvarında bulunan bu polisakkaritleri parçalayan enzimler birçok endüstriyel uygulamaya sahiptir. Örneğin; ksilanolitik enzimler kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde hammaddelerin biyoleachinginde, pastacılık-hamurışı endüstrisinde hamurun kalitesi ve ekmek kabarmasının ayarlanmasında, hayvansal yemlerin besleyici özelliklerinin arttırılmasında, pektinolitik enzimlerin konsantre haldeki meyve sularının berraklaştırılmasında, havuç posasının üretiminde kullanılması vb.

Protoplastların hazırlanmasında, bitki ve alg hücre duvarı polisakkaritlerini parçalamak amacıyla liyazlar (selülozlarla kombine halde) kullanılırlar (Wong ve ark., 2000).

Günümüzde polisakkarazlar, çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için polisakkaritlerin modifikasyonu amacıyla da incelenmektedirler. Düşük molekül ağırlığına sahip jellan ve vellanların elde edilmesinde, polisakkaritlerin viskozitelerinin azaltılmasında ve yeni özellikte polisakkaritlerin elde edilmesinde de polisakkarit hidrolazlar ve polisakkarit liyazlar kullanılırlar (Michaud ve ark., 2003).

Polisakkarazlar çeşitli polimerlerin ince yapılarının aydınlatılmasında, hücre duvarlarının polimerlerinin yerlerinin tayininde de kullanılmaktadır. Kondroitin sülfat, hiyaluronan, heparin ve heparan sülfatın biyolojik özelliklerinin aydınlatılmasında GAG liyazlar etkili araçlardır (Michaud ve ark., 2003).

Özellikle meyve suyu endüstrisinde, pektin ve rhamnogalakturnat liyazlar, taze ekstraktların süzülmesinde kullanılmaktadırlar (Will ve Dietrich, 1994). Gıda endüstrisinde, polisakkarit liyazlar, spesifik polisakkaritlerin tayini amacıyla da uygulama alanı bulabilmektedir. Öyle ki, ksantan tayini ve *Azotobacter vinelandii*'den aljinat üretiminin tespiti için enzim karışımları kullanılmıştır (Østgaard, 1993).

Polisakkarazlar birçok kimyasal reaksiyonda biyokatalizörler olarak oldukça iyi bilinirler. Bu amaçla gıdalarda, farmasötiklerde, tedavi edici ajanlarda, hayvan yemlerinde, tekstil ve temizlik sanayiinde, kağıt ve kağıt hamuru sanayiinde, birçok kimyasal endüstride ticari olarak kullanılırlar (Michaud ve ark., 2003; Sutherland, 1999b).

Enzimler, özellikle kondroitin ve heparin üzerinde aktivite göstererek başlıca terapötik aktif ajanların hazırlanmasında ve analizinde de etkili

olabilirler. *Flavobacterium heparinum*'un çözünebilir heparinaz I enzimine, heparinin antikoagülant etkisini değiştirebilme özelliği açısından klinik bir ajan olarak başvurulmaktadır (Yu ve ark., 2000). Bakteriyofaj JA1 ile ilişkili bir polisakkarit liyazın, *Vibrio cholerae* O139 strainin kapsüler polisakkaritleri üzerindeki aktivitesiyle üretilen oligosakkaritler bağışıklık kazanma amacıyla kapsüler polisakkaritler-kökenli antijenler olarak kullanılabilirler (Linnerborg ve ark., 2001). Denholm ve ark. (2001) kondroitinazları tümör gelişimine, tümör teşekkülünde kan damarlarının oluşumunu ve metastazı inhibe edici terapötik ajanlar olarak işaret etmişlerdir. *Proteus vulgaris*'den ticari olarak elde edilen kondroitin ABC liyaz intervertebral disk çıkıntıları üzerinde tedavi edici bir uygulamaya sahip olduğu bildirilmiştir (Hamai ve ark., 1997).

Polisakkarit liyazların terapötik ajanlar olarak potansiyel uygulamalarına ek olarak polisakkaritlerin bu liyazlarla parçalanmaları sonucu oluşan oligosakkaritler de biyolojik uygulamalar ve medikal araştırmalarda kullanılabilir (Michaud ve ark., 2003; Sutherland, 1999b). Örneğin, pullulanaz pullulandan maltotriozun kantitatif hazırlanmasında kullanılabilir. β -D-glukanazlar, kurdan (veya laminaran)dan laminaridekstrinlerin üretiminde iş görebilirler. Ayrıca aljinat liyazların oligosakkarit ürünlerinin arpa gibi bitkilerde fazla büyümeyi teşviklediği bildirilmiştir (Sutherland, 1999b).

Karbohidratların enzimatik parçalanması hububat ve çeşitli ürünlerin işlenme endüstrilerinde de başlıca öneme sahiptir. Biranın üretiminde, hububat ve ürünlerinin üretiminde vb. (Sutherland, 1999b).

Bitki ve hayvan hastalıklarında biyofilm içerisinde koruma altında olan patojen bakterilerin tedavisinde polisakkarit liyazların önemi büyüktür. Çünkü biyofilmler polisakkarit liyazlar için substratlar olabilen birçok polisakkariti içerir. Nitekim, jelan liyazlar kullanılarak biyofilmin parçalanması,

Sphingomonas strainlerinin genetik manipulasyonunu kolaylaştırmada ve bitkilerde potansiyel-sphingomonad tedavisinde şiddetle önerilmiştir (Mikolajczak ve ark. 1994).

Hatch ve Schiller (1998), KF'li hastaların ciğerlerindeki mukoid *P.aeruginosa* strainlerince üretilen aljinat biyofilmin aynı strainden temin edilen bir aljinat liyaz tarafından parçalanabildiğini belirlemiştir. *Sphingomonas sp.*'den elde edilen A1-III polisakkarit liyazı yine *P.aeruginosa*'nın asetillenmiş aljinatına karşı aktif olup terapötik amaçlı ve antibiyotik gibi ilaçların üretiminde kullanılabileceği vurgulanmıştır (Wong ve ark., 2000).

Dental plak, bakteriyal filmin suda-çözünmeyen glukanlar (IG=water-insoluble glycans) ile diş yüzeylerine tutunmasıyla oluşur. Biyokimyasal ve klinik çalışmalar *Streptococcus mutans*, *S.sanguis* ve *S.salivarius* gibi oral streptokoklar tarafından üretilen bu çözünmeyen α -D-glukanların diş yüzeylerine birikiminin diş çürümelerinin başlıca nedenlerinden biri olduğunu saptamıştır. Plak sayılan kariyojenik streptokoklar diş yüzeyine hızlıca kolonize olarak koruyucu bir matriks oluşuyla diş çürümelerine neden olur. Önceleri diş plağını önlemek ve/veya uzaklaştırmak amacıyla glikanlardaki α -1,3, α -1,4 ve α -1,6 bağlarını hidrolize eden *Lipomyces starkeyi*'den üretilen enzimler üzerinde durulmuştur. Bu enzimlerin parçalayıcı etkilerine rağmen, insanlar üzerinde uygulanmaları *L.starkeyi*'nin potansiyel bir patojen oluşundan dolayı mümkün olamamıştır. Bu nedenle, ticari gıda kaynaklı enzim preparasyonlarının dental plak oluşumunda etkili glukan oluşumunu indirgeyici veya önleyici aktiviteleri araştırılmış ve sonuçta Dextranaz 50L ve Dextrozim gibi enzim preparasyonlarının dental plak kontrol ajanı olarak kullanılabilecekleri belirlenmiştir. Bu bulgular, fırçalama ve temizlik yanında dişlerdeki plak oluşumunun önlenmesinde ve dişeti iltihabının kontrolünde çeşitli polisakkarit-

parçalayıcı enzimlerin seçilebileceklerini göstermiştir (Lawman ve Bleiweis, 1991).

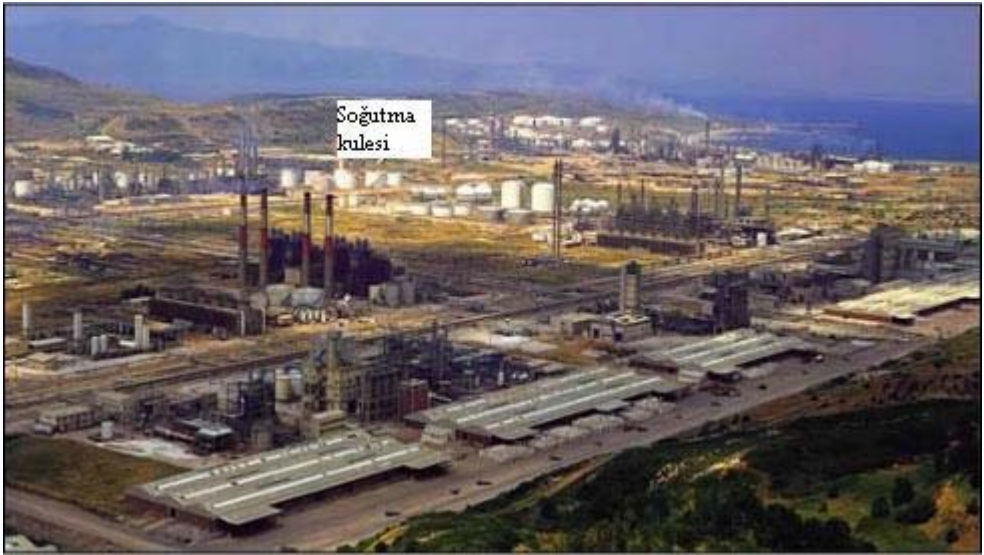
EPS yapılarının aydınlatılmasına dayalı araştırmaların arttırılmasıyla uygulamada polisakkrazların kullanımının yaygınlaşacağı şüphesizdir (Sutherland, 1999b).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Örnekler

Örnekler 2003-2004 yıllarında İzmir-Aliğa-Petkim Petrokimya Holding A.Ş. (Şekil 2.1) soğutma kulelerinin havuz kısmından (Şekil 2.2) ve kulelerin su ile temas eden filtre yüzeylerindeki (Şekil 2.3) cıvık biyofilm tabakalardan kazıma yolu ile alınmış olup steril kaplar içerisine konularak iki saat içinde laboratuvara getirilmiş ve analize alınmıştır. Analiz için farklı alanlardan alınan kazıntılardan iki tekrarlı ekimler yapılmıştır.



Şekil 2.1. PETKİM Petrokimya Holding A.Ş. Aliğa kompleksi.



Şekil 2.2. Tesise ait soğutma kulesi havuz kısmı.



Şekil 2.3. Soğutma kulesinin filtre kısmı.

2.1.2. Besiyerleri

Besiyeri 1. Glukoz Yeast Kazein Hidrolizatı Agar (GYC Agar) (Tago ve Aida, 1977)

Glukoz	1,2gr
Yeast Extract	0,1gr
Kazein hidrolizatı	0,1gr
Agar	15gr
Distile su	1000ml
pH	6,8

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121°C’de 20dk süre ile steril edilmiş ve 50°C’ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolasyonda kullanılmıştır.

Besiyeri 2. ESP Ortamı (Slime üretimini teşvik edici ortam) (Tago ve Aida, 1977)

Glukoz	1,7gr
NH ₄ Cl	0,08gr
Na ₂ HPO ₄	0,02gr
K ₂ SO ₄	0,02gr
NaCl	0,02gr
MgSO ₄	0,012gr

CaCl ₂	0,008gr
FeSO ₄	0,004gr
Pepton	2gr
Agar	3gr
Distile su	200ml
pH	6,8

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121°C’de 20dk süre ile steril edilmiş ve 50°C’ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolasyonda kullanılmıştır (Horan ve ark., 1988).

Besiyeri 3. %0,85 şeker ilaveli Nutrient Broth

Nutrient Broth (Merck)’dan 8gr/l alınıp 8,5gr/l şeker (glukoz, sakkaroz veya galaktoz) ilave edilerek distile suda çözüldükten sonra erlenlere dağıtılarak otoklavda 0,8 atmosfer basınç altında 115 °C’de 10dk süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların aktivasyonu ve fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 4. Nutrient Agar (=NA) (Difco)

NA’dan 23gr/l alınıp distile suda çözüldükten sonra agarı çözmek için kaynatılmış ve test tüplerine dağıtılarak otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121°C’de 20dk süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra yatık halde dondurulmuştur (Tamer ve ark., 1989). Bu besiyeri biyokimyasal testlerde kullanılan 24 saatlik kültürlerin hazırlanmasında, stoklanmasında ve kültürel karakteristiklerin saptanmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 5. Yarı Katı NA

Nutrient Broth (Merck)'dan 8gr/l alınıp %0,3 agar ilave edilerek distile suda çözüldükten sonra agarı çözmek için kaynatılmış ve test tüplerine dağıtılarak otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121°C'de 20dk süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra dik halde dondurulmuştur (Tamer ve ark., 1989). Bu besiyeri izolatların hareketliliklerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır.

Besiyeri 6. O/F Medium

Tripton	2gr
Sodyum klorür	5gr
Dipotasyum fosfat	0,3gr
Brom Timol Mavisi	0,03gr
Agar	3gr
Distile su	1000ml
pH	6,8

İçerik suda eritilip tüplere 5'er ml konularak 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Besiyeri izolatların biyokimyasal tanılamalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 7. MacConkey Agar (Difco)

MacConkey Agar'dan 50gr/l alınıp distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121°C'de 15dk süre ile steril edilmiş ve

50°C'ye soğutulularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolatların biyokimyasal tanılamalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 8. King B (Pseudomonas Agar F) (Pronadisa)

Trypton	10gr
Proteaz pepton	10gr
Dipotasyum fosfat	1,5gr
Mağnezyum fosfat	1,5gr
Agar	15gr
Distile su	1000ml
pH	7,2

Bu besiyeri içeriklerine 10 ml Bacto gliserol ilave edilerek otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121°C'de 20dk süre ile steril edilmiş 50°C'ye soğutulularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri *Pseudomonas fluorescens* şüpheli izolatların doğrulanmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 9. Yeast Nitrogen Base (YNB-Difco)

10x solüsyonunun hazırlanışı: Temel ortam Yeast Nitrogen Base'den 6,7gr ve 5gr karbohidrat örneği 100ml distile suda çözdürülmüş, iyice karıştırılmış ve filtrasyon ile steril edilmiştir.

Ortam: Steril pipet ile 0,5ml 10x solüsyonundan aseptik koşullarda alınmış, 4,5ml steril suya eklenilmiş, iyice karıştırılmıştır.

2.1.3. Kullanılan çözeltiler ve kimyasal maddeler

Çalışmamızın çeşitli aşamalarında kullanılan çözelti ve diğer kimyasallar aşağıda verilmiştir.

Çözelti 1: Gram'ın Kristal Viyoleto boyası. 20ml etanolde 2gr kristal viyoleto ve 80ml distile suda 0,8gr amonyum oksalat çözülmüş ve bu çözelti alkolde çözülmüş olan kristal viyoleto ilave edilmiştir. Boya, izolatların gram boyamalarında kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Çözelti 2: Gram İyodür çözeltisi. 1gr iyot ve 2gr potasyum iyodür havanda iyice ezilip karıştırılarak toz haline getirilmiş ve üzerine yavaş yavaş 300ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Çözelti, izolatların gram boyamalarında kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Çözelti 3: Gram'ın Safranin boyası. 0,25 gr safranin %95'lik etanolde (10ml) çözülp, 1000ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılmış ve sonra filtre kağıdından süzölmüştür. Boya, izolatların gram boyamalarında kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Çözelti 4: %3'lük KOH çözeltisi, izolatların gram reaksiyonlarının tespitinde kullanılmıştır.

Çözelti 5: Tetrametil-p-fenilendiamin-diklorür'ün %1'lik solüsyonu, izolatların oksidaz aktivitelerinin tespitinde kullanılmıştır.

Çözelti 6: %3'lük H_2O_2 çözeltisi, izolatların katalaz aktivitesinin tayininde kullanılmıştır.

Çözelti 7: 1 Molar HCl çözeltisi. %37'lik HCl'den 8,4ml alınarak distile suyla 100ml hacme tamamlanarak hazırlanılır. pH'nın ayarlanmasında kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Çözelti 8: 1 Normal NaOH çözeltisi. 4gr NaOH 100ml distile suda çözülerek hazırlanır. pH'nın ayarlamasında kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Çözelti 9: %95-97'lik Sülfürik Asit. Ticari olarak satılan %95-97'lik saf sülfürik asit hazır olarak kullanılmıştır.

Çözelti 10: Tris-borik asit-EDTA Tamponu (TBE) (pH:8,0) Stok solüsyonu (5x/l): 54,0gr Tris-base, 27,5gr Borik asit, 2,92gr EDTA; Çalışma solüsyonu (1x/l): 100ml stok solüsyonuna 400ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır. Çalışma solüsyonu, DNA'ların saflık kontrolü ve PCR ürünlerinin elektroforezinde kullanılan agaroz jelin hazırlanmasında ve yürütme tankının doldurulmasında kullanılmıştır.

Çözelti 11: 10x yükleme boya solüsyonu: 7,5gr Ficol 400, 0,125gr Bromfenol mavisi, distile su ile 50ml'ye tamamlanmıştır. Solüsyon, elektroforezde jel yükleme tamponu olarak kullanılmıştır.

Çözelti 12: Etidyum bromür stok solüsyonu: 10mg Etidyum bromür 1ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Solüsyon, elektroforez için agaroz jelin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çözelti 13: Marker DNA'lar (Fermentas, O'GeneRuler 1 ve 1 kb Plus). Ticari olarak sağlanan marker DNA'lar, genomik DNA'lar ve PCR ürünleri agaroz jel elektroforezde yürütüldükten sonra uygun boyutta olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Çözelti 14: %40'lık Potasyum Sodyum Tartarat Solüsyonu (Rochelle Salt Solüsyonu). Bu solüsyon, EPS'lerin hidroliz testlerinde indirgenmiş şekerlerin ölçümünde (DNS yönteminde) kullanılmıştır.

Çözelti 15: Propan-2-ol (Smyras). EPS'lerin presipitasyonunda kullanılmıştır.

Çözelti 16: 10-400µg/ml arasındaki Referans Şeker Solüsyonları, EPS'lerin şeker içeriğinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Çözelti 17: Bradford Reaktifi (Coomassie Brilliant Blue G-250 Reaktifi), standart olarak sığır serum albümini (BSA-Sigma), Bradford yöntemine göre polisakkaritlerin protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılmışlardır.

Çözelti 18: %3'lük H_2O_2 çözeltisi, katalaz denemesinde kullanılmıştır.

Çözelti 19: Ringer Solüsyonu, örneklerin seyreltilmesinde kullanılmıştır.

Çözelti 20: %5'lik (w/v) Fenol çözeltisi, 0-200µg/ml'lik Glukoz Standart çözeltileri ve derişik H_2SO_4 (Carlo Erba), total şeker tayini denemesinde kullanılmıştır.

Çözelti 21: PBS (Phosphate-buffered saline, pH:7,4). 8gr NaCl, 0,2gr KCl, 144gr Na_2HPO_4 , 0,24 gr KH_2PO_4 1 litre suda çözülmüştür. pH:7,4'e ayarlandıktan sonra otoklavda steril edilmiş, oda sıcaklığında saklanmıştır. PBS, EPS'lerin emülsifiye edici aktivitelerinin tayininde kullanılmıştır.

Çözelti 22: 50mM pH:7,0 Fosfat Tamponu. 6,7gr $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 50ml suda, 6,8gr KH_2PO_4 başka bir 100ml'lik suda çözdürülmüştür. Bu hazırlanan ilk çözeltiden 34ml, ikinci çözeltiden 66ml alınıp karıştırılarak hazırlanmıştır. 50mM pH:7,0 fosfat tamponu EPS'lerin hidroliz testlerinde kullanılmıştır.

Çözelti 23: %1’lik DNS (Dinitro Salisilik Asit) Solüsyonu. 1gr DNS, 0,2gr fenol, 0,05gr sodyum sülfid ve 1gr sodyum hidroksit 100ml suda çözölürölerek hazırlanır. Bu solüsyon, EPS’lerin hidroliz testlerinde indirgenmiş şekerlerin ölçölümünde kullanılmıştır.

2.1.4. Kullanılan test kitleri

İzolatlardan ileri biyokimyasal tanılamalarında, enterik gram (-) basiller için spesifik API 20E ve Enterobacteriaceae dışındaki gram (-) basiller için spesifik API 20NE biyokimyasal ticari test kitleri (Biomérieux, France) kullanılmıştır.

İzolatlardan moleköler tanılamaları amacıyla, DNA izolasyonu için ZR fungal/bakteriyal DNA kiti (Zymo Research), PCR ile DNA amplifikasyonu için FastStart taq DNA polymerase, dNTPack kit (Roche) kullanılmıştır.

2.1.4.1. API 20E test kiti

Kit içeriğı;

- API 20E stripi
- İnkübasyon kutusu
- Sonuç tablosu
- Ampul içerisinde NaCl %0,85 süspansiyon ortamı (5ml)
- Mineral yağ’dan oluşmaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. API 20E test kiti ayıraçlar, ortamlar ve içerikleri.

Ayıraçlar, Ortamlar	İçerikleri	
%0.85'lik NaCl (5ml)	Sodyum klorür Distile su	8,5gr 1000ml
TDA ayırıcı (5ml)	Demir klorür Distile su	3,4gr 100ml
JAMES Ayırıcı (5ml)	Bileşik J2183 (patentli) HCl	0,5gr 100ml
VP1 ayırıcı (5ml)	Potasyum hidroksit Distile su	
VP 2 ayırıcı (5ml)	α -naftol Etanol	6gr 100ml
NIT 1 ayırıcı (5ml)	Sülfanilik asit Asetik asit Distile su	0,4gr 30gr 70ml
NIT 2 ayırıcı (5ml)	N,N-dimetil-1-naftilamin Asetik asit Distile su	0,6gr 30gr 70ml
Zn ayırıcı	Çinko tozu	10gr

Tüm API içerikleri 2-8°C'de buzdolabında ışık görmeyecek biçimde muhafaza edilmiştir. API 20E striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. API 20E striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları.

TEST	SUBSTRAT	REAKSİYON/ ENZİMLER	SONUÇ	
			NEGATİF	POZİTİF
ONPG	Orto-nitro-fenil- β -D-gal-actopiranosit	β -galaktosidaz	Renksiz	Sarı
<u>ADH</u>	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu
<u>LDC</u>	Lisin	Lisin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu
<u>ODC</u>	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu
<u>ICIT</u>	Sodyum sitrat	Sitrat kullanımı	Soluk yeşil/Sarı	Mavi-yeşil/Mavi
<u>H₂S</u>	Sodyum tiyosülfat	H ₂ S üretimi	Renksiz/ Grimsi	Siyah tortu şeklinde ince hat
<u>URE</u>	Üre	Üreaz	Sarı	Kırmızı/ Turuncu
TDA	Triptofan	Triptofan deaminaz	Sarı	Kırmızımsı kahverengi
IND	Triptofan	İndol üretimi	JAMES	
			Renksiz Soluk yeşil/Sarı	Pembe
<u>VP</u>	Kreatin	Asetoin üretimi	VP1+VP2/10 dk.	
	Sodyum piruvat		Renksiz	Pembe/Kırmızı
<u>GEL</u>	Kohn'un jelatini	Jelatinaz	Tamamen siyah rengin oluşmaması (Kısmi siyahlaşma)	Yaygın siyah pigment oluşumu

Çizelge 2.2. (devam)

GLU	Glukoz	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı/Grimsi sarı
MAN	Mannitol	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
INO	Inositol	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
SOR	Sorbitol	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
RHA	Ramnoz	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
SAC	Sakkaroz	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
MEL	Mellibiyoz	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
AMY	Amigdalın	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
ARA	Arabinoz	Fermentasyon/Oksidasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
OX	Filtre kağıdı üzerinde	Sitokrom-oksidaz	OX/1-2 dk.	
			Renksiz	Menekşe moru
NO ₃ - NO ₂	GLU kuyucuğu	NO ₂ üretimi	NIT1+NIT2/2-3 dk.	
			Sarı	Kırmızı
		N ₂ 'ye indirgeme	Zn/5 dk.	
			Kırmızı	Sarı

3.1.4.2. API 20 NE test kiti

Kit içeriği;

- API 20NE stripi
- İnkübasyon kutusu
- Ampul içerisinde AUX Medium (2ml)
- Sonuç tablosu
- Mineral yağ'dan oluşmaktadır (Çizelge 2.3).

AUX medium

Amonyum sülfat	2gr
Mineral base	82,8gr
Amino asitler	250mg
Vitaminler ve besinsel substratlar	35,9mg
Agar	1,5gr
Fosfat tamponu (pH:7,1)	1000ml

Tüm API içerikleri 2-8°C'de buzdolabında ışıık görmeyecek biçimde muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2.3. API 20NE striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları.

TEST	SUBSTRAT	REAKSIYON/ ENZİMLER	SONUÇ	
			NEGATİF	POZİTİF
NO ₃ -	Potasyum nitrat	Nitratların nitritlere indirgenmesi	NIT1+NIT2/2-3 dk.	
			Renksiz	Pembe-Kırmızı
		Nitratların N ₂ 'ye indirgenmesi	Zn/5 dk.	
			Pembe	Renksiz
TRP	Tryptofan	İndol üretimi	JAMES	
			SarıRenksiz Soluk yeşil/Sarı	Pembe
<u>GLU</u>	Glukoz	Asidifikasyon	Maviden yeşile	Sarı
<u>ADH</u>	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Turuncu/Pembe /Kırmızı
<u>URE</u>	Üre	Üreaz	Sarı	Turuncu/Pembe /Kırmızı
ESC	Eskulin	Hidroliz (β-glukosidaz)	Sarı	Gri/Kahverengi/ Siyah
GEL	Jelatin	Hidroliz (proteaz)	Yaygın olmayan siyah pigment	Yaygın siyah pigment
PNPG	p-nitro-fenil-β-D-galactopirano sit	β-galaktosidaz	Renksiz	Sarı
<u>I</u> GLU	Glukoz	Asimilasyon	JAMES	
			Renksiz Soluk yeşil/Sarı	Pembe
<u>I</u> ARA	Arabinoz	Asimilasyon	VP1+VP2/10 dk.	
			Renksiz	Pembe/Kırmızı
<u>I</u> MNE	Mannoz	Asimilasyon	Tamamen siyah rengin oluşmaması (Kısmi siyahlaşma)	Yaygın siyah pigment oluşumu
<u>I</u> MAN	Mannitol	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı/Grimsi sarı
<u>I</u> GNA	N-asetil-glukozamin	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>I</u> MAL	Maltoz	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>I</u> GNT	Glukonat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı

Çizelge 2.3. (devam)

<u>[CAP]</u>	Kaprat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>[ADI]</u>	Adipat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>[MLT]</u>	Malat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>[CIT]</u>	Sitrat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
<u>[PAC]</u>	Penil-asetat	Asimilasyon	Mavi/Mavi-yeşil	Sarı
OX	Tetrametil-p-fenilen daimin üzerinde	Sitokrom-oksidad	OX/1-2 dk.	
			Renksiz	Menekşe moru

2.1.4.3. ZR fungal/bakteriyal DNA kiti

Kitin içeriği;

- Fungal/Bakteriyal DNA Binding Buffer
- DNA Pre-Wash Buffer
- Fungal/Bakteriyal DNA Wash Buffer
- DNA Elution Buffer
- ZR BashingBead Liziz Tüpleri
- Zymo-Spin IV Spin Filtreleri
- Zymo-Spin IIC Kolonları
- Toplama tüpleri'nden oluşmaktadır.

Tüm kit içerikleri 20-25°C'de oda sıcaklığında ışıık görmeyecek biçimde muhafaza edilmiştir.

3.1.4.4. FastStart taq DNA polymerase, dNTPack kit

Kitin içeriği;

- FastStart Taq DNA polimeraz (5U/ μ l)
- PCR reaksiyon tamponu, 10x, (20 mM $MgCl_2$ ’lü)
- GC-RICH solüsyonu, 5x
- PCR Grade nükleotid karışımı(dNTP karışımı)’ndan oluşmaktadır.

Tüm kit içerikleri -20°C’de ışık görmeyecek biçimde muhafaza edilmiştir.

2.1.5. Kullanılan başlıca cihazlar

- Santrifüj (Sigma 2-15)
- Mikro santrifüj (Sigma Sartorius 15.000g)
- Spektofotometre (Varian 300)
- Orbital çalkalayıcı inkübatör (G24 New Brunswick)
- Güç kaynağı (1500 V) (Consort EV265)
- PCR cihazı (GeneAmp PCR system 9700)
- U.V. Translüminatör (254 nm)
- Liyofilizasyon cihazı (Edwards)
- Oswald viskozimetresi (Schott)

- Mikroskop (Olympus)
- Otoklav (Hirayama)

2.2. Metot

2.2.1. EPS üretici bakterilerin izolasyonu

EPS üretici bakterileri izole etmek için örneklerden 1 ml alınarak steril Ringer solüsyonu ile 10^{-4} ve 10^{-5} son konsantrasyonları verecek şekilde on katlı seyreltmeleri hazırlanmıştır. Daha sonra “Yayma Plaka Yöntemi”ne (Brock ve Madigan, 1994) göre her bir seyreltmeden 0,1ml, ESP Agar ve GYC Agar üzerine dökülerek steril bir L-baget yardımıyla homojen olarak dağıtılmış, “Dökme Plaka Yöntemi”ne göre her seyreltmeden 1ml alınarak yine aynı ortamlara ekimleri sağlanmış ve tüm ekim yapılan petrilere 30°C 'de 72 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı kolonilerin saf kültürlerini elde etmek amacıyla NA'lı petrilere çizgi ekimler yapılarak 30°C 'de 72 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, elde edilen saf kolonilerin hepsi yatık olarak NA'lı tüplere çekilip 30°C 'de 72 saat inkübe edilerek stok kültür olarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

2.2.2. EPS üretici bakterilerin seçimi

Yatık NA'daki izolatlar ESP ortamlı tüplerde 30°C 'de 48 saat aktive edildikten sonra içinde 50 ml ESP ortamı bulunan 250 ml'lik erlenlere 0,5ml aktararak 200 devir/dakikalık orbital çalkalayıcıda 30°C 'de 5 gün inkübasyona bırakılacaktır. Bu süre sonunda her bir erlenin içeriğine 3 hacim propan-2-ol (Smyras) eklenerek hızlıca çalkalanıp $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 4 saat tutulmuştur. Bu süre sonunda presipitatlaşmış olan hücre dışı polisakkarit üretici mikroorganizmalar,

polisakkaritin iplik benzeri yığınlarının gözlenmesi ile tanımlanmışlardır (Tago ve Aida, 1977).

2.2.3. EPS üretici izolatların ön tanılamaları

2.2.3.1. Kültürel özellikler

İzolatlar NA'a ekilerek 30°C'de 24 saatlik inkübasyonlarından sonra oluşan koloniler morfoloji, renk, koku ve pigmentasyon bakımından incelenmişlerdir.

2.2.3.2. Mikroskopik özellikler

30°C'de 24 saat inkübasyondan sonra NA'daki kültürlerin hem gram boyama ve hem de KOH testi ile gram reaksiyonlarına bakılmış, bakteri morfolojileri ve boyutları 100x16'lık büyütmede mikrometrik lam ve mikrometrik oküler kullanarak mikroskopta incelenmişlerdir.

2.2.3.3. Biyokimyasal özellikler

İzolatların ön biyokimyasal tanılamalarında Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Krieg ve Holt, 1984) esas alınmıştır. Buna göre katalaz, oksidaz, hareketlilik, O/F testleri, oksijen istekleri, Mac Conkey Agar'da üremeleri incelenmiştir.

2.2.3.3.1. KOH testi

Gram boyama testini desteklemek amacıyla yapılan bu denemede, temiz bir lamın üzerine 1 damla %3'lük KOH çözeltisi damlatılarak üzerine 30°C'de 24 saat NA'da büyütülmüş izolatlardan bir öze dolusu konulmuş ve bir cam çubukla karıştırılmıştır. Süspansiyondan cam çubuğu çekince bir uzama söz konusu ise, izolatın gram (-) olduğu kabul edilmiştir (DSM, 1991).

2.2.3.3.2. Oksidaz testi

Bir parça filtre kağıdı, Tetrametil-p-fenilendiamin-diklorür'ün (Sigma Chemical co.) %1'lik solüsyonunun birkaç damlası ile ıslatılmış ve bu solüsyon kullanılacağı gün taze olarak hazırlanmıştır. 24 saatlik NA kültüründen bir öze dolusu organizma, platin bir öze ile alınmış (sıradan telden yapılmış özeler yanlış sonuçlara neden olabilir) ve filtre kağıdının üzerine yayılmıştır. 10 saniye içerisinde mavi-menekşe bir renk oluşumu test için pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (Gerhardt ve ark., 1981; Tamer ve ark., 1989).

2.2.3.3.3. Katalaz testi

Yatık NA'da 30°C'de 72 saat büyütülmüş kültürlerin üzerine %3'lük 1ml H₂O₂ çözeltisi damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığına bakılmıştır. Gaz kabarcıklarının çıkışı pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Gerhardt et al., 1981; Tamer ve ark. 1989; Temiz, 1994).

2.2.3.3.4. Hareketliliğin saptanması

1. Çukur lam yöntemi

Temiz bir lamel üzerine küçük bir damla bakteri süspansiyonu koyup çukurluluğunun etrafı vazelinlenmiş olan bir çukur lamın üzerine gelecek şekilde ters çevrilmiş ve lamel ile çukur lamın birleşmesi sağlanmıştır. Çukur lam tekrar ters çevrilip lamele asılı olan damlacık yüksek güçlü bir kuru objektif altında incelenmiştir. Damlacığın kenar kısmında mikroorganizmaların hareketli olup olmadıkları saptanmıştır (Gerhardt ve ark., 1981; Tamer ve ark., 1989).

2. Yarı katı agarda büyüme

%0,3 agar içeren ve dik olarak hazırlanmış Yarı Katı Nutrient Agar'lara izolatlar dik şekilde ekim yapılmış ve 30°C'de her gün incelenerek 72 saat inkübe edilmiştir. Büyüme esnasında, hareketli bakteriler inokülasyon hattından kenarlara doğru göç etmiştir (Gerhardt ve ark., 1981; Temiz, 1994).

2.2.3.3.5. O/F testi

%1 glukoz ve Brom Cresol Purple içeren O/F ortamları çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için birkaç dakika kaynatılmış ve tüpler çabucak soğutulmuştur. İğneyle dik ekim yapıldıktan sonra üzerlerine 10mm kalınlığında steril parafin dökülmüştür. Başka bir tübe ise steril parafin konulmamış ve aerobik kalması sağlanmıştır. Aynı şekilde glukoz içermeyen benzer ortam inoküle edilmiş ve başka bir tüpte inokülesiz glukoz içeren kontrol ortamı olarak 30°C'de inkübasyona kaldırılmışlardır. Aşağıdaki reaksiyonların oluşup oluşmadığına bakılmıştır.

Sadece aerobik tüpte asitleşme var ise organizma oksidasyon yolu ile glukozu katabolize etmiş oksidasyon yapma kabiliyetinde ve "O" reaksiyon oluşturmuştur. Hem aerobik hem de anaerobik türlerde asitleşme var ise organizma fermentasyon yapma kabiliyetinde ve "F" reaksiyon oluşturmuştur. Eğer iki tüpte de asitleşme yok ise organizma glukozu fermente edememiştir (Gerhardt ve ark., 1981).

2.2.3.3.6. Oksijen isteğinin belirlenmesi

Bu amaçla içerisinde yüksek Nutrient Agar bulunan tüpler eritilmiş içindeki çözünmüş oksijenin çıkması için tüpler 100°C'de 10dk bekletilmiştir. Sonra tüpler yaklaşık 40-45°C'ye kadar soğutulmuş her birine daha önceden

Nutrient Agar'da büyütülmüş (30°C'de 24 saatte) izolatlardan ekim yapılmıştır. Ekim yapılan mikroorganizmanın agara homojen dağılması için hafifçe çalkalanmıştır. Çalkalama sırasında hava girmemesi için hızlı sallamadan kaçınılmıştır. Ekim yapılan tüplerin oda sıcaklığında katılaşmaları için bekletildikten sonra 30°C'de 48 saat inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda izolatların üremeleri agarı fazlaştırılmış katı besiyerinde genellikle üst kısımda ise aerop, her tarafta ise fakültatif anaerop, sadece dip kısımda ise anaerop, üst kısmın biraz alt bölümünde ise mikroaerofilik olarak adlandırılmışlardır (Çotuk ve Anđ-Küçüker, 1995).

2.2.3.3.7. MacConkey agarda üreme

30°C'de 24 saat Nutrient Agarda büyütülmüş kültürlerden MacConkey Agar içeren petrilere çizgi ekim yapılmış ve petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilere her bir izolat için üreme varlığına bakılmıştır. Bunun yanında laktozu fermente eden gram (-) basillerin fermente edemeyenlerden ayırımını anlamak için pembeleşmenin olup olmadığına bakılmıştır. Besiyerinin kırmızı olan orijinal renginden pembeye doğru renk değişimi var ise laktoz fermentasyonu pozitif olarak kabul edilmiştir (Demirbağ ve Demir, 2005).

2.2.3.3.8. Floresans pigment oluşumunun incelenmesi

30°C'de 24 saat Nutrient Agar'da büyütülmüş *Pseudomonas fluorescens* şüpheli kültürlerden King B (Pseudomonas Agar F) besiyeri içeren petrilere çizgi ekim yapılmış, sonra 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilere sarımsı yeşil floresans pigment oluşumu 254 µm dalga boylu floresan altında incelenmiştir (Oxoid,1991).

2.2.4. EPS üretici izolatların ileri biyokimyasal tanılamaları

İzolatların ileri biyokimyasal tanılamaları amacıyla, API test kitlerinden API 20E ve API 20NE kullanılmıştır.

2.2.4.1. API 20E tanılama testi

API 20E kiti, enterik gram (-) basillerin biyokimyasal tanılması amacıyla kullanılmaktadır. İzolatların API 20E ile tanınması için, Nutrient Agar'a ekilerek aktifleşmeleri sağlanmıştır. NaCl %0,85 süspansiyon ortamı ampulleri dikkatli bir şekilde açılıp içine 1 koloni inokule edilerek homojen bakteri solüsyonu hazırlanmıştır. API test kuyucuklarının sadece tüp kısımlarına içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde steril uçlu mikropipet kullanılarak inokulasyon yapılmıştır. 1CIT1, 1VP1 ve 1GEL1 kuyucukları bakteriyal süspansiyon ile tamamen doldurulmuş, fakat ADH, LDC, ODC, H₂S ve URE testleri için anaerobik ortam sağlamak amacıyla kuyucukların üst kısımları konveks şeklinde mineral yağ ile örtülmüştür.

Bir tabla ve bir kapaktan oluşan inkübasyon kutusunda nemli bir ortam sağlamak amacıyla 5ml distile su petekli yapıdaki tablaya dağıtılmıştır. Mikrotüplerden oluşan stripler bu tablalara yerleştirilerek kapakları kapatılmıştır. İzolat numaraları inkübasyon kutularına yazılarak karışmaları önlenmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda striplere TDA testi için TDA, IND testi için JAMES, VP testi için VP1 ve VP2, NIT testi için NIT1 ve NIT2 ayıraçlarından her bir izolat için birer damla damlatılarak gerekli süre beklenmiş ve gelişen bütün reaksiyonlar Çizelge 2.2'ye göre okunmuştur. Sonuçlar kitlerle beraber verilen sonuç çizelgelerine (Şekil 2.4.) kaydedilmiştir.

API® 20 E

CE 07223 C

REF. : _____

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origem / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	LVP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₃	N ₂	MOB	McC	OF-O	OF-F						

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Şekil 2.4. API 20E'ye ait boş sonuç çizelgesi.

2.2.4.2. API 20NE tanılama testi

API 20NE kiti, Eterobacteriaceae dışında kalan gram (-) basillerin biyokimyasal tanınması amacıyla kullanılmaktadır. İzolatların API 20E ile tanınmasında, 0,5 McFarland bulanıklılığında hazırlanmış bakteri solüsyonundan NO₃'den PNPG testine kadar kuyucuklar steril uçlu mikropipet yardımıyla doldurulmuştur. Daha sonra, solüsyondan 200 µl alınarak AUX Medium ampullerinin içlerine aktarılmış, iyice homojenize edilmiştir. [GLU]'dan [PAC] testine kadar kuyucuklar bu karışım ile doldurulmuştur. Fakat GLU, ADH ve URE testleri için anaerobik ortam sağlamak amacıyla kuyucukların üst kısımları konveks şeklinde mineral yağ ile örtülmüştür. Stripler inkübasyon tablalarına yerleştirildikten sonra 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda striplere TRP testi için JAMES, NO₃ testi için NIT1 ve NIT2 ayıraçlarından her bir izolat için birer damla damlatılarak gerekli süre beklenmiş ve gelişen bütün reaksiyonlar Çizelge 2.3'e göre okunmuştur. Sonuçlar sonuç çizelgelerine (Şekil 2.5) kaydedilmiştir.

The image shows a blank API 20 NE test kit result chart. The chart is divided into two main sections: a top section for identifying the organism and a bottom section for recording test results. The top section includes a CE mark, a reference number (REF.), and a field for the origin of the sample. The bottom section is a grid of 24 wells, each containing a specific substrate. The wells are arranged in two rows of 12 wells each. The first row contains wells for 24 h and 48 h incubation times. The second row contains wells for 24 h and 48 h incubation times. The substrates are: NO₂, N₂, NO₃, TRP, GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNG, IGLU, IARA, IMNE, IMAN, INAG, IMAL, IGNT, ICAP, IADI, IMLT, ICIT, IPAC, and OX. Each well has a number (1, 2, or 4) indicating the expected result. The chart also includes a section for 'Autres tests / Other tests / Andere Tests / OTRAS pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy' and a section for 'Ident. / Ταυτοποίηση'.

Şekil 2.5. API 20NE'ye ait boş sonuç çizelgesi.

Hem API 20E hem de API 20NE test kiti için tanılamada tür tayini, elde edilen sonuçların analitik profil indeksiyle karşılaştırılmasıyla yapılmaktadır. Analitik profilde bütün reaksiyon şekilleri sayısal olarak kodlanmış olmalıdır. Sonuç çizelgelerinde testler 3 testlik gruplar halinde ayrılmışlar ve gruptaki testler 1, 2 ve 4 sayıları ile gösterilmişlerdir. Gruptaki reaksiyonların hepsinin pozitif çıkması 7-dijit profil numarasını göstermektedir.

2.2.5. İzolatların moleküler tanılamaları

2.2.5.1. DNA izolasyonu

Mikroskopik ve biyokimyasal tanılamaları yapılan izolatlardan PCR tiplendirmesinde kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İşlemler ZR Fungal/Bakteriyal DNA Kiti kullanılarak aşağıdaki sıraya göre gerçekleştirilmiştir:

1. Uygun şeker ilaveli Nutrient Agar'da üretilen 24-48 saatlik kültürlerden alınan yaklaşık 10^9 adet bakteriyal hücre 1,5ml'lik ependorf tüpündeki 200µl bidistile su içerisinde dikkatlice karıştırılmıştır. Elde edilen hücre solüsyonunun tümü BashingBead liziz tüpüne aktarılmıştır.

2. BashingBead liziz tüpü bir vorteks ile 5 dk boyunca dikkatlice karıştırılmıştır.

3. Daha sonra 10.000xg'de 1dk santrifüjlenmiştir.

4. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan 400µl, bir toplama tüpüne oturtulan Zymo-Spin IV spin filtre'ye aktarılmış, ardından hemen 7.000xg'de 1 dk santrifüjlenmiştir.

5. Toplama tüpünde biriken filtrat üzerine 1200µl Fungal/bakteriyal bağlama tamponu ilave edilmiştir.

6. Bu aşamadan (5. aşamadan) elde edilen karışımdan 800µl alınarak yeni bir toplama tüpüne oturtulmuş Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000xg'de 1dk santrifüjlenmiştir.

7. Sonra "6" nolu basamaktaki işlemler tekrarlanmıştır.

8. 200µl DNA yıkama-öncesi tamponu yeni bir toplama tüpüne oturtulmuş Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000xg'de 1dk santrifüjlenmiştir.

9. 500µl Fungal/bakteriyal DNA yıkama tamponu Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve yine 10.000g'de 1dk santrifüjlenmiştir.

10. Zymo-Spin IIC kolonu 1,5 ml'lik temiz bir ependorf tüpüne yerleştirilmiş ve 100µl DNA elüsyon tamponu direkt olarak kolon içerisinde orta

kısımındaki matrikse ilave edilmiştir. Daha sonra 10.000xg'de 30sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası ependorf içerisinde DNA elde edilmiştir.

2.2.5.2. DNA'ların saflık kontrolü

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezde kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometre ile yapılmıştır (Ausubel ve ark., 1997; Gonzalez ve ark., 2006).

Agaroz jel elektroforezi, 5µg/ml etidyum bromürlü %0,8 agaroz (Sigma) içeren mini jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde 1xTBE tamponu kullanılmış, 5µl DNA solüsyonu, 3µl yükleme boya solüsyonu ile karıştırılarak 80V'da 45 dk süreyle yürütülmüştür. Elektroforezde marker olarak Fermentas O'GeneRuler 1kb plus DNA ladder kullanılmıştır. Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Ausubel ve ark., 1997). Ayrıca spektrofotometrede de genomik DNA'nın kalitesi ve miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla 10µl DNA+990µl bidistile su temiz kuvars küvetlerde iyice karıştırılarak bidistile suya karşı okunmuştur. Çıkan değer µg/ml olarak DNA miktarını vermektedir. Aynı zamanda spektrofotometre ile 260 ve 280 nm'deki absorbans değerlerinin oranı da belirlenmiştir. PCR için uygun kalitede DNA'lara ait A_{260}/A_{280} değeri 1,8-2,1 civarında olmalıdır (Gonzalez ve ark., 2006).

2.2.5.3. PCR

DNA amplifikasyonu, FastStart Taq DNA Polimeraz dNTPack kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit içerisindeki bileşiklerin yanısıra 16S rDNA'ya spesifik universal primerler [Primer 27F ve Primer 1522R (Thermo Scientific) (Lee ve ark., 2003)] ve kalıp DNA ilave edilmiştir.

Primer	Nükleotid Sırası
27F (Forward)	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'
1522R (Reverse)	5'- AAG GAG GTT ATC CAN CCR CA-3'

Toplam reaksiyon hacmi 50µl olacak şekilde, 0,2ml'lik ince cidarlı bir PCR tüpüne Çizelge 2.4.'deki bileşikler sırasıyla konulmuştur.

Çizelge 2.4. PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları.

Bileşik	Miktar
Bidistile su	DNA miktarına bağlı olarak her bakteri için değişebilen miktarda
PCR reaksiyon tamponu	5µl
GC-RICH solüsyonu	10µl
PCR Grade Nükleotid karışımı	1µl
Primer 27F	5µl
Primer 1522R	5µl
FastStart Taq DNA polimeraz	0,4 µl
Kalıp DNA	Değişen miktarlarda (200-500ng DNA)

DNA'nın amplifikasyonu; programlanabilir bir PCR cihazında, FastStart Taq DNA Polimeraz dNTPack kiti ve kit içerisinde belirtilen koşulların Çizelge 2.5.'deki gibi modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. PCR koşullarının belirlenmesi için öncelikle bağlanma sıcaklığı saptanmıştır.

Çizelge 2.5. Amplifikasyonun sağlandığı PCR koşulları.

İşlem	Döngü	Süre	Sıcaklık
İlk denatürasyon / Aktivasyon	1	5dk	95 °C
Denatürasyon	35	55sn	95 °C
Annealing (primerlerin bağlanması)		40sn	50°C
Elongasyon (uzama)		1,5dk	72°C
Son uzama	1	7dk	72°C
Soğutma	-	Sınırsız	4°C

2.2.5.4. PCR ürünlerinin elektroforezi

PCR ürünlerinin elektroforezi, %1'lik agaroz jelde, 1xTBE tampon olarak kullanılarak 80V'da 1,5 saat boyunca sürdürülmüştür. 9µl PCR ürünü ve 6µl jel yükleme tamponu karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş, her elektroforez işlemide örneklerle beraber DNA markerı da (Fermentas DNA ladder 1 kb) jelde yürütülmüştür. Ayrıca jel hazırlanırken içerisine, 15µl (10mg/ml) etidyum bromür ilave edilmiştir (Rickwood ve Hames, 1982; Ausubel ve ark., 1997).

PCR ürünlerinin elektroforez ile ayrılımları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. Temiz bir erlen içerisinde 100ml 1xTBE konulmuş ve 1gr agaroz tartılarak 1xTBE içerisine eklenmiştir.

2. Agaroz süspansiyonu tamamen berraklaşınca kadar ısıtılarak, agarozun erimesi ve homojenizasyonu sağlanmıştır.

3. Agaroz jel 45-50 °C'ye kadar soğutulmuştur.

4. Jel soğurken temiz elektroforez küvetinin açık uçları otoklav bandı ile kapatılmıştır.

5. 50°C'ye kadar soğutulmuş olan agaroz jelin içerisine belirtilen miktarda etidyum bromür ilave edilmiştir.

6. Elektroforez küvetine taraklar uygun şekilde yerleştirilmiş ve jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde, yaklaşık 1mm kalınlıkta dökülmüştür.

7. Jel oda sıcaklığında yaklaşık 45dk bekletilerek donduktan sonra bantlar dikkatlice çıkarılmıştır.

8. Elektroforez tankının içerisine yerleştirilmiş jelin yüzeyini 1-2 mm kaplayacak biçimde 1xTBE ilave edilmiş ve ardından taraklar çıkarılmıştır.

9. PCR ürünleri ve Marker DNA yükleme tamponuyla birlikte kuyucuklara yüklenerek elektroforez başlatılmıştır.

10. 1,5 saat sonra elektroforez sonlandırılmış ve jel dikkatlice küvetten alınmıştır.

11. U.V. translüminatörde, jelde ayrılan bantlar incelenerek poloroid bir kamera ile jelin fotoğrafı çekilmiştir.

Elde edilen PCR ürünleri daha sonra 16S rDNA sekans analizi için kullanılmıştır.

2.2.5.5. PCR ürünlerinin 16S rDNA baz sırasının belirlenmesi

Baz sırası, RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Merkezi tarafından belirlenmiştir.

2.2.5.6. 16S rDNA baz sırası ile tür tayininin yapılması

RefGen, Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Merkezi tarafından herbir izolat için belirlenen sekans dizileri BioEdit (Blast) programı kullanılarak değerlendirilip, uygun forma getirildikten sonra Gen Bankası'nın <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> web sayfasına girilerek kayıtlı sekanslar ile karşılaştırılmış ve tür tayini yapılmıştır (Lee ve ark., 2003).

2.2.6. İzolatların en yüksek EPS üretimlerini gerçekleştirdikleri ortamların belirlenmesi ve büyüme eğrilerinin çıkarılması

NB'a %0,85 glukoz, sakkaroz ve galaktoz ilave edilerek hazırlanmış ortamlarda 24 saat 30°C'de büyütülmüş olan kültürlerden, her bir bakteri için en yüksek EPS üretiminin sağlandığı ortamlar tespit edilmiştir. Belirlenen bu ortamlardan 100'er ml içeren erlenlere 1'er ml aşılanmıştır. 30°C'de 150rpm (devir/dk)'de orbital çalkalayıcıda inkübasyon başlangıcından itibaren her 30dk'da bir örnek alınarak spektrofotometrede 660nm dalga boyunda kör örneğe (steril besiyeri) karşılık absorbans değerleri ölçülmüştür (Gerhardt ve ark., 1981; Tamer ve ark., 1989).

2.2.7. İzolatların hücre kuru ağırlıklarının tayini

EPS verimini saptamak amacıyla fermentasyon sonucu fermentasyon sıvısının viskozitesine göre kültür 4°C’de 10.000 veya 40.000xg’ de santrifüj edilmiş süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra dipteki kısım darası alınmış bir kaba konulmuş ve 1-2ml distile su ile santrifüj tüpünde kalan miktar alınmıştır. Daha sonra liyofilize edilmiş ve dara çıkarıldıktan sonra g/l olarak miktar hesaplanmıştır (Gerhardt ve ark., 1981).

2.2.8. EPS ekstraksiyonu

Fermentasyon sonucunda, fermentasyon sıvısı kültür viskozitesine göre 10.000xg’de 4°C’de 15dk süre ile santrifüj edilmiştir. Süpernatant, 3 hacim propan-2-ol ile presipite edilerek 4°C’de 4 saat bekletildikten sonra presipitat 5.000xg’de toplanmış, liyofilize edilerek kurutulmuştur (Anton ve ark., 1988, Novak ve ark., 1992).

2.2.9. EPS kuru ağırlığının belirlenmesi

Fermentasyon sonucu kültür 4°C’de 10.000 veya 40.000xg’de santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınmış ve propan-2-ol ile presipite edildikten sonra 4°C’de 4 saat tutulmuştur. Presipitat 5.000xg’de 10 dk santrifüjle toplanarak (santrifüj tübü içinde) 20ml distile su ile çözülmüştür. 24 saat 4°C’de 3-4 kez distile suya karşı diyalizlenmiştir. Diyalizat, direkt olarak darası alınmış kap içinde liyofilize edilmiş ve sonuç g/l olarak hesaplanmıştır (Anton ve ark., 1988; Kwon ve ark., 1994).

2.2.10. EPS verimi katsayısının saptanması

EPS verimi, Gerhardt ve Drew (1994)'ün belirttiği spesifik ürün verimi katsayısı formülüne göre hesaplanmıştır. Bu formüle göre:

$$\text{EPS Verimi (Yp/x)} = \frac{\text{Üretilen ürün (EPS) (mg)}}{\text{Hücre (mg)}}$$

2.2.11. EPS'lerin toplam şeker analizleri

Toz haldeki EPS materyallerinin toplam şeker miktarlarının belirlenmesi amacıyla reaktif olarak %5 (w/v) suda fenol solüsyonu ve derişik sülfürik asit kullanılmıştır. Dubois ve ark.'a (1956) göre 0-100 µg aralıklarda glukoz içeren 1 ml'lik örnekler, 5 adet test tüpüne pipetlenmiştir. Ayrıca başka bir test tüpüne distile su konulmuştur. Tüm tüplere, 1 ml %5'lik fenol solüsyonu ilave edilip daha sonra 5 ml derişik sülfürik asit eklendikten sonra karıştırılmıştır. 10 dk beklemenin ardından tekrar karıştırılmıştır. Sonuçlar alınmadan önce tüpler, 25-30°C'lik bir su banyosunda 10-20 dk süre ile bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. 0-100 µg aralıklarda glukoz içeren örneklerin 490 nm dalga boyundaki absorbans değerleri standart grafik olarak belirtilmiştir. Sonuçlar, çizelge halinde belirtilmiştir.

2.2.12. EPS'lerin toplam protein analizleri

Protein miktarları, standart olarak BSA kullanılarak Bradford yöntemine göre saptanmıştır (Bradford, 1976). Yöntem, organik boyaların asidik ve bazik gruplarıyla renk oluşturmalarını esas alır. Boya bağlamaya dayalı yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemidir. Coomassie Brilliant Blue G-250 (100mg), 50ml

%95'lik etanolde çözülmüştür. Bu çözeltiye, 100ml %85 (w/v) fosforik asit ilave edilmiştir. Son hacim, 1 lt'ye tamamlanmıştır (Bradford, 1976).

2.2.13. EPS'lerin HPLC ile şeker içeriklerinin belirlenmesi

Elde edilen toz EPS materyallerin şeker içerikleri HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ile yapılmıştır. Analizden önce toz EPS materyalinin hidrolizi, 70°C'de 0,01M H₂SO₄ ile gerçekleştirilmiştir. HPLC için, modifiye edilmiş AOAC Official Metod 979.23 kullanılmıştır. Mobil faz olarak Asetonitril:su (v/v 75:25), HPLC kolonu olarak HP Carbohydrate 4.6mmx250mmx5µm ve refraktif indeks (RI) dedektör kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C, dedektör sıcaklığı 30°C, akış hızı 1.5ml/dk'dır. Şeker standartları (glukoz, sakkaroz, mannoz, galaktoz, riboz, rafinoz, arabinoz, maltoz, mellibiyoz, ramnoz, fruktoz) 10-400 µg/ml arasında hazırlanmıştır (r>0.99). Numuneler bidistile suda hazırlanmış 70°C'yi aşmayan sıcaklıkta iyice çözülmüştür. Numune derişimi 10.000µg/ml olup enjeksiyon hacmi 10µl'dir.

2.2.14. EPS'lerin emülsifiye edici aktivitelerinin tayini

EPS'lerin emülsifiye edici aktiviteleri Rosenberg ve ark., (1979) ve Royan ve ark. (1999)'e göre tespit edilmiştir. Bu amaçla, 0,5mg polisakkaritin 0,5ml distile su ile 70°C'de iyice çözdürülmesi sağlanmıştır. Hazırlanan bu EPS solüsyonuna (1mg/ml) 2ml PBS (pH:7,4) ilave edilmiştir. Bunun üzerine 0,5ml n-hekzadekan (BDH Chemicals Ltd. England) konulmuş, 1dk vorteks ile iyice karıştırılıp homojenize edilmiştir. Sonrasında spektrofotometrede (Jenway 6105 UV/VIS) 540nm dalga boyunda kör örneğe (2ml PBS+0,5ml n-hekzadekan) karşılık absorbans değerleri ölçülmüştür. Spektrofotometre ile ölçülen bir absorbans değeri; bir birim emülsifiye edici aktivite (birim/mg) olarak tanımlanmıştır (Kim ve ark., 1994). İlk absorbans A₀ olarak, oda sıcaklığında

içeriğın bekletilerek 30., 60. ve 120. dakikalarda alınan absorbans değeri ise A_t (sırasıyla A_{30} , A_{60} , A_{120}) olarak kaydedilmiştir. EPS materyallerinin emülsifiye edici aktivitelerinin yüzdesi (%) = $A_t / A_0 \times 100$ formülü ile hesaplanmıştır (Rosenberg ve ark., 1979; Royan ve ark., 1999).

2.2.16. EPS'leri parçalayıcı bakterilerin taranması

İzolalar için polisakkarit-parçalayıcı enzimlerin taranması C kaynağı olarak 5g/l EPS materyali ilave edilmiş 6,7g/l YNB ortamında (pH:7, 50mM potasyum-fosfat tamponunda hazırlanmış) gerçekleştirilmiştir. 200µl ortam ve bakterilerin fizyolojik tuzlu su solüsyonları (10µl) mikropate kuyucuklarına aşılardır. Mikropate'ler 30°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Kùltürlerin bu süreç içerisindeki günlük ölçümleri 620nm'de spektrofotometrede yapılmıştır. 0. ve 5. günlerde alınan sonuçlar arasındaki fark ΔA_{620} olarak ifade edilmiştir (Rättö ve ark., 2001).

2.2.17. EPS'lerin hidroliz testleri

İzolalar 25ml'lik ortamda (6,7g/l YNB+5g/l EPS ile pH:7, 50mM potasyum-fosfat tamponunda hazırlanmış) 30°C' de 3 gün süre ile inkübe edilmişlerdir. Kùltür sıvısı 0,45µm membrandan filtre edilmiş süzüntünün 1ml'si pH:7,0, 50mM potasyum-fosfat tamponunda hazırlanmış %3'lük 5ml EPS solüsyonuna ilave edilmiştir. Polisakkarit hidrolizi; DNS metodu ile indirgenmiş şekerlerin ölçümü yoluyla saptanmıştır (Sumner ve Somers, 1949). Buna ilaveten indirgenme viskozitesi Oswald viskozimetresi (Schott, Germany) kullanılarak tespit edilmiştir (Pekin, 1977).

2.2.18. İndirgenmiş şekerlerin ölçümü

3g EPS materyali kapaklı tüplerdeki 3ml DNS solüsyonu içerisine eklenmiş ardından 90°C’ de 5-15dk kırmızı-kahverengi oluşuncaya kadar tutulduktan sonra üzerine 1ml %40’lık potasyum-sodyum tartarat solüsyonu (Rochelle Tuz Solüsyonu) eklenip oda sıcaklığında soğuması beklenmiştir. Soğuduktan sonra 575nm’de spektrofotometrik ölçümleri alınmıştır (Sumner ve Somers, 1949).

3. BULGULAR

Yapılan çalışmada İzmir-Aliğa-Petkim Petrokimya Holding A.Ş. soğutma kulelerinin su ile temas eden yüzeylerindeki cıvık tabakalardan alınmış örneklerden ESP ve GYC Agar üzerinde 85 adet farklı izolat elde edilmiştir ve bunlardan çalkalamalı inkübatörde uygun besiyerlerindeki inkübasyonları sonrası en fazla EPS üretenlerden 12 tanesi çalışmamız için seçilmiştir. 85 izolattan elde edilen EPS verimleri çalışmada sunulmamıştır.

3.1. İzolatların Tanımlamaları

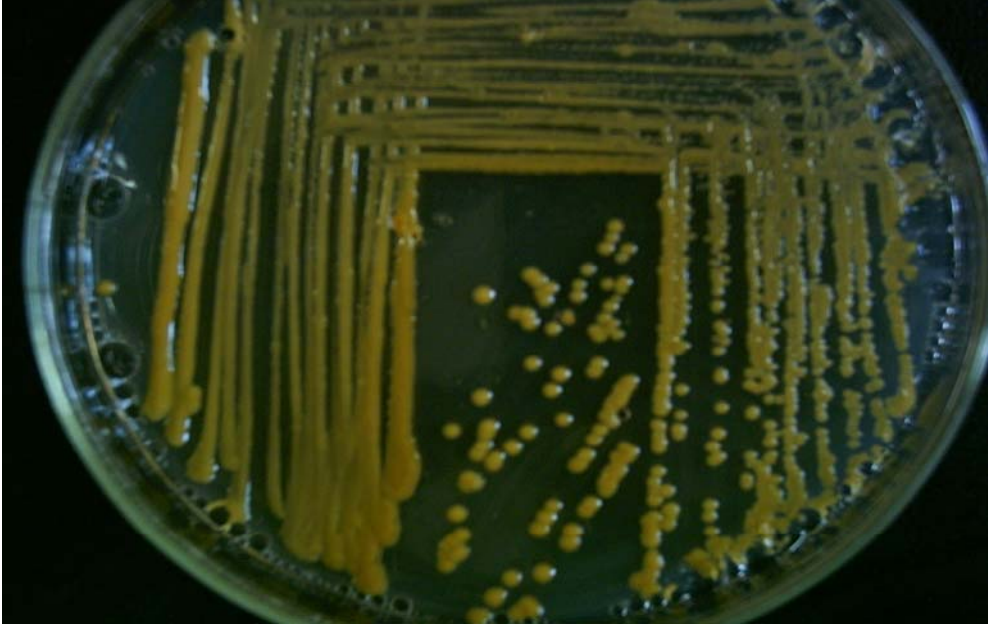
3.1.1. İzolatların mikroskopik, kültürel ve biyokimyasal tanımlamaları

İzolatların Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Krieg ve Holt, 1984) esas alınarak kültürel ve biyokimyasal tanımlamaları yapılan 12 izolatın koloni morfolojileri, renk, koku ve pigmentasyonu, hücresel morfolojileri, hücre büyüklükleri, gram reaksiyonları, hareketlilikleri, katalaz, oksidaz, hareketlilik, O/F testleri, oksijen istekleri, Mac Conkey Agar'da büyüme durumları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Ayrıca izolat 2SS'in NA'daki koloni morfolojisi Şekil 3.1'de, ESP ortamındaki Şekil 3.2'de; izolat 9Ba'nın NA'daki koloni morfolojisi Şekil 3.3'de, ESP ortamındaki Şekil 3.4'de; izolat 14SS'in NA'daki koloni morfolojisi Şekil 3.5'de, ESP ortamındaki Şekil 3.6'da görülmektedir.

Çizelge 3.1. (devam)

Oksidaz	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidatif	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentatif	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Oksijen isteği	Aerobik	Aerobik	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Aerobik	Fakültatif anaerob	Fakültatif anaerob	Aerobik	Aerobik	Fakültatif anaerob	Aerobik	Aerobik
MacConkey Agar'da üreme/Laktoz fermentasyonu	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

+: pozitif, -: negatif



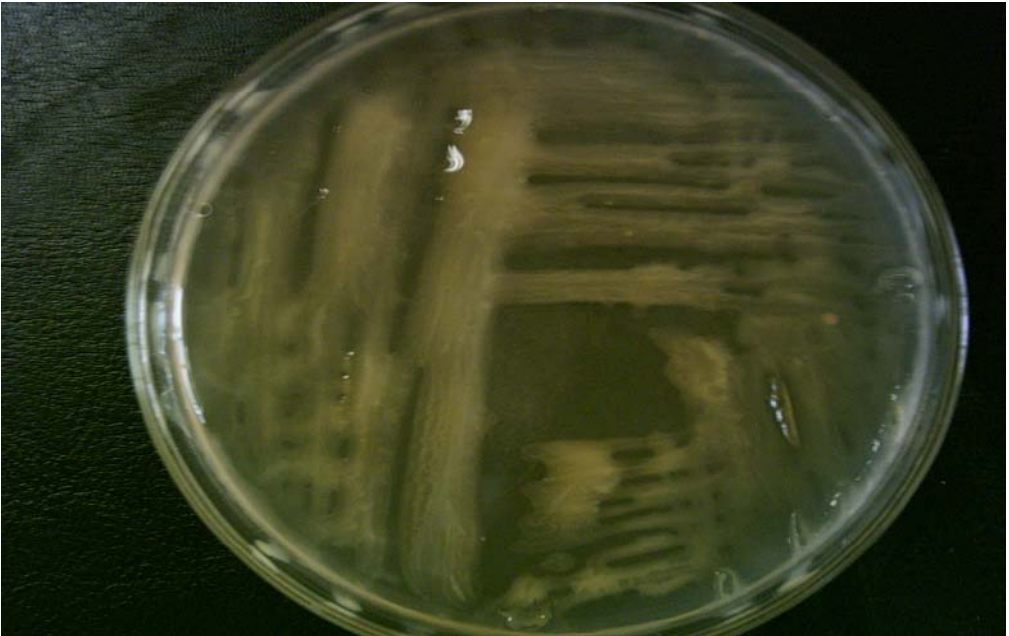
Şekil 3.1. İzolat 2SS'in Nutrient Agardaki görüntüsü.



Şekil 3.2. İzolat 2SS'in ESP ortamındaki görüntüsü.



Şekil 3.3. İzolat 9Ba'nın Nutrient Agardaki görüntüsü.



Şekil 3.4. İzolat 9Ba'nın ESP ortamındaki görüntüsü.



Şekil 3.5. İzolat 14SS'in Nutrient Agardaki görüntüsü.

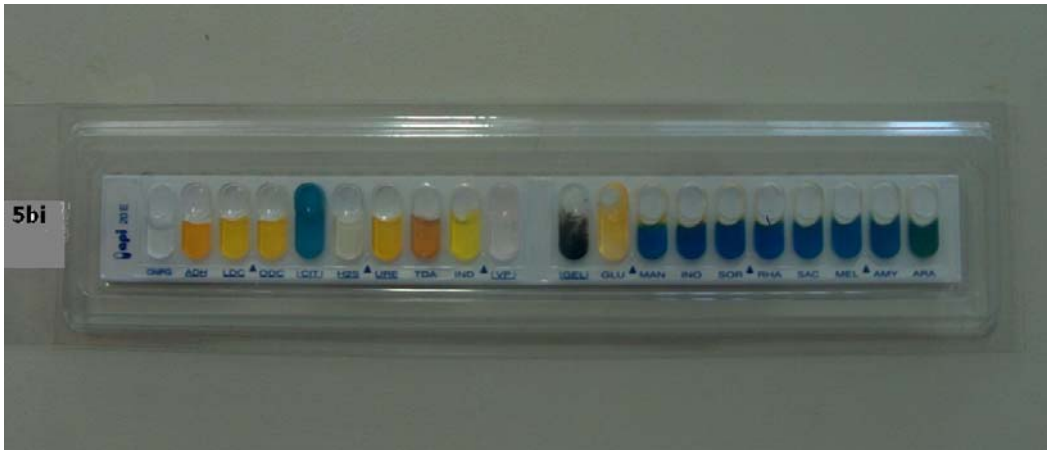


Şekil 3.6. İzolat 14SS'in ESP ortamındaki görüntüsü.

API test kitleri ile ileri biyokimyasal tanılamaları yapılan izolatların bazılarına ait sonuç panel görüntüleri Şekil 3.7-3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.7. İzolat 9Ba'nın API 20E test kiti sonuç panelinin görüntüsü.



Şekil 3.8. İzolat 5Bi'nin API 20E test kiti sonuç panelinin görüntüsü.



Şekil 3.9. İzolat 4'ün API 20NE test kiti sonuç panelinin görüntüsü.



Şekil 3.10. İzolat 12'nin API 20NE test kiti sonuç panelinin görüntüsü.

Kültürel özellikleri açısından incelenen izolatların biyokimyasal analizler için kullanılan API test kiti sonuçları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Ancak, API test kitleri endüstriyel örneklerden elde edilen türlerin tanılanmasında kısmi sonuç verebilmiştir.

Çizelge 3.2. İzolatların API Test Kiti Sonuçları

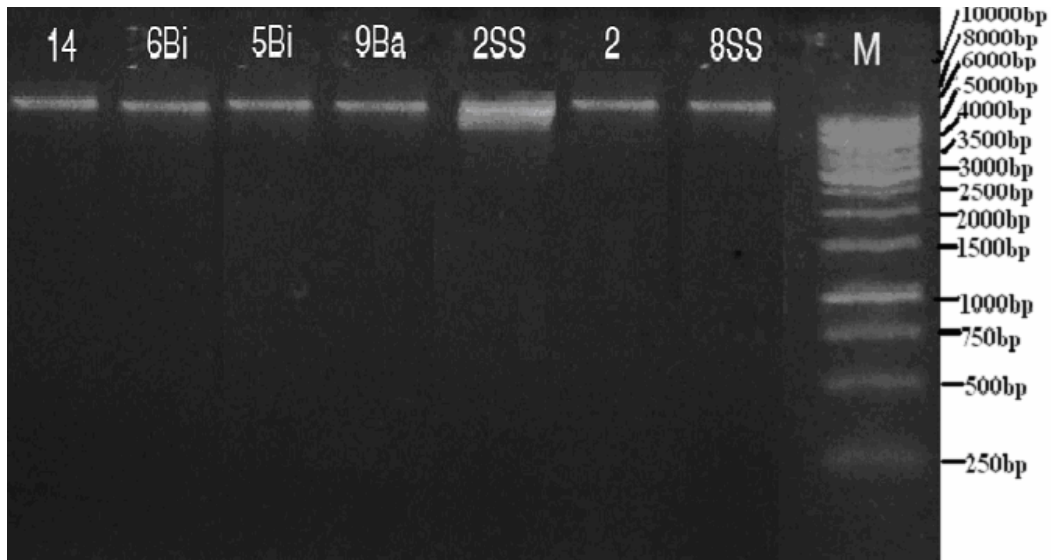
İzolat No	API Test Kiti Türü	İdentifikasyon Sonucu	İdentifikasyon (%)
14SS	20NE	<i>Burkholderia cepacia</i>	99,5
22	20NE	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,0
21	20NE	<i>Pasteurella haemolytica</i>	99,2
14	20E	<i>Alcaligenes sp./Non-fermenter sp.</i>	43,0
6Bi	20NE	<i>Pseudomonas sp.</i>	93,5
5Bi	20E	<i>Aeromonas hydrophila</i>	95,0
9Ba	20E	<i>Pantoea agglomerans</i>	95,8
2SS	20NE	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	97,5
4	20NE	<i>Burkholderia gladioli</i>	99,2
2	20NE	<i>Pseudomonas sp.</i>	51,5
8SS	20NE	<i>Pasteurella sp</i>	60,0
12	20NE	<i>Pseudomonas sp.</i>	99,3

3.1.2. İzolatların moleküler tanılamaları

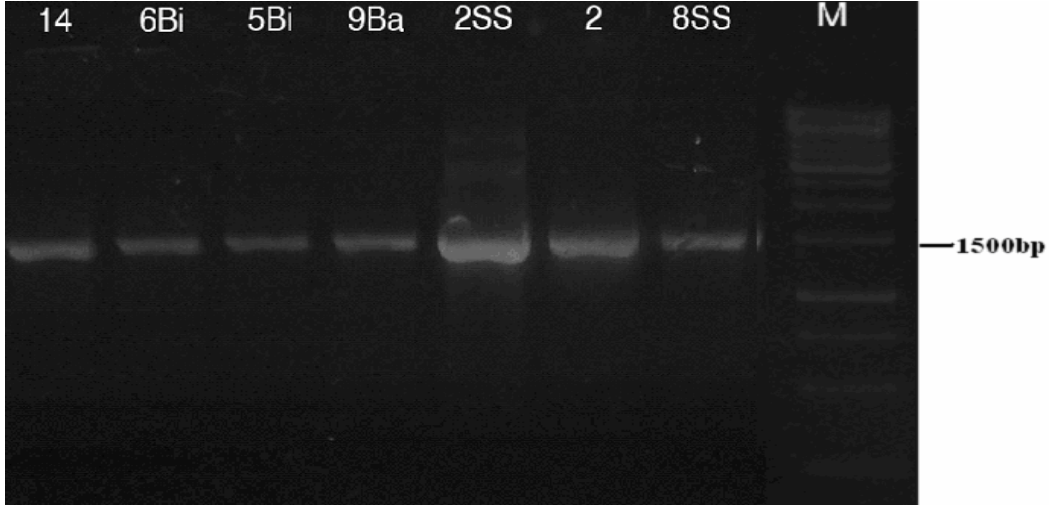
API kitleriyle düşük identifikasyon oranları (<99,0) saptanan izolatların moleküler yöntemlerle belirlenmesi amacıyla öncelikle DNA izolasyonları yapılmıştır. Bu nedenle, 7 adet izolattan elde edilen genomik DNA'ların bütünlükleri, spektrofotometrede 260nm ve 280nm'de absorbans ölçümüyle ve agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir. Herbir izolat için A_{260}/A_{280} oranlarının 1,80-2,1'e yakın bulunması (Çizelge 3.3) ve elektroforez ile yüksek molekül ağırlığına sahip tek bantların elde edilmesi (Şekil 3.11) sonucunda, tüm DNA'ların amplifikasyonuna geçilmiştir. Uygun universal primerler (27F ve 1522R) kullanılarak 16S rRNA'yı kodlayan DNA bölgesi amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonunda elde edilen ürünlere ait bantların jeldeki görüntüsü Şekil 3.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Moleküler tanılamaları yapılan izolatlardan elde edilen DNA'lara ait 260 nm ve 280 nm'deki absorbands değerleri.

İzolat No.	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₈₀
14	0,0086	0,00657	1,51
6Bi	0,0099	0,0060	1,65
5Bi	0,0160	0,0084	1,90
9Ba	0,0101	0,0056	1,80
2SS	0,0031	0,0015	2,06
2	0,0235	0,0145	1,62
8SS	0,0292	0,0163	1,79



Şekil 3.11. Moleküler tanılamaları yapılan izolatlara ait genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezde görünümü (M:Marker).



Şekil 3.12. Moleküler tanılamaları yapılan izolatlara ait çoğaltılmış 16S rRNA'yı kodlayan DNA parçasının agaroz jel elektroforezde görünümü (M: Marker).

3.1.3. İzolatlara ait, çoğaltılmış olan 16S rDNA'nın baz sırasının belirlenmesi

Çalışmamızda çoğaltılmış olan 16S rDNA'nın baz sırası tayini RefGen, Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Merkezi'nde yaptırılmıştır. Elde edilen veriler Bioedit (Blast) programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Tür tayini araştırmacıların kullanımına açık olan Gen Bankası'nın <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> web sayfasında, nükleotid dizilerinin kıyaslanarak benzerliklerin icelenmesi ile yapılmıştır. Her bir izolata ait sekans dizisi ve Gen Bankası'ndan elde edilen sonuçlar sırasıyla verilmiştir.

RefGen'e gönderilen ürünler yaklaşık 1500bp uzunluktadır. Bu uzunlukta ürünün 1 primer seti (forward ve reverse) kullanılarak okunması durumunda yöntem kaynaklı olarak arada okunmamış bölgeler oluşmaktadır, herbir primerin yaklaşık 600 bazlık kısmı doğru olarak okuduğu düşünülmelidir. Reverse

primerle elde edilen sekansın bir kısmının forward primer ile okunan sekansla eşleştirilmesi çalışmanın güvenilirliği açısından çok önemlidir (Dale ve Schantz, 2002). Bu nedenle 1500bp'lik PCR ürününün mümkün olan en uzun sekans dizisinin elde edilmesi amacı ile, dizi analizleri iki farklı primer (27F ve 1522R) kullanılarak yaptırılmıştır.

RefGen tarafından deneme sonuçları internet aracılığı ile e-posta olarak gönderilmiştir. Gönderilen sekans sonuçları sekans cihazından (ABI PRISM 3100-Applied Biosystems) çıkan ve herhangi bir işleme uğramamış verileri içermektedir. Her izolat için 2 primer tarafından belirlenen iki sonuç gönderilmiştir. Bioedit (Blast) programında bu 2 farklı sonuç birleştirilerek her strain için tek bir sekans dizisi oluşturulmuştur. Bu işlem yapılırken aynı zamanda primerlerin ortak belirlediği sekanslar da eşleştirilerek kontrolü sağlanmıştır. Aşağıda verilen tüm sekans sonuçları 5'→3' doğrultusundadır. Sekans sonuçlarının başında verilen kod numaraları çalışmamızda elde ettiğimiz sekans dizilerinin birleştirilmesi işlemi sırasında çıkan bizim sekansımızla en yüksek benzerliğe sahip Gen Bankasına kayıtlı olan sekansın accession (kayıt) numarasıdır.

Sekans dizilerindeki “N” harfi o noktadaki bazın okunmadığını göstermektedir ve bu kullanılan cihazdan kaynaklanan bir durumdur.

İzolatlara ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonuçları Şekil 3.13-3.19'da verilmiştir.

 [gb|EU009183.1](#) Shigella dysenteriae strain FBD012 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1542

Score = 2625 bits (1421), Expect = 0.0
Identities = 1466/1485 (98%), Gaps = 15/1485 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query	7	GCGGCAGGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGA	66
Sbjct	39	GCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGA	98
Query	67	CGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTG	126
Sbjct	99	CGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTG	158
Query	127	GAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT	186
Sbjct	159	GAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT	218
Query	187	TGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTANGCG	246
Sbjct	219	TGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCG	278
Query	247	ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTACCAG	306
Sbjct	279	ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGT-CCAG	337
Query	307	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA	366
Sbjct	338	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA	397
Query	367	TGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAG	426
Sbjct	398	TGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAG	457
Query	427	TAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG	486
Sbjct	458	TAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG	517
Query	487	CCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG	546
Sbjct	518	CCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG	577
Query	547	CACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAT	606
Sbjct	578	CACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC-AT	636
Query	607	CTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAA	666
Sbjct	637	CTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAA	696
Query	667	TGCGTGGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAAGCGGCCCTTGGACGAAGACTGACGC	726
Sbjct	697	TGCGTGGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAAGCGGCCCTTGGACGAAGACTGACGC	756
Query	727	TCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATA-CCTGGTAGTCCACGCCGTAAA	785
Sbjct	757	TCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA	816
Query	786	CGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTAGA-GCAGTGGCTTCCGGAGGCTAACGCGGTTT	844
Sbjct	817	CGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTT-GAGGC-GTGGCTTCCGGA-GCTAACGC-G-TT	871
Query	845	AAGTCGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGG	904
Sbjct	872	AAGTCGACCGCCT-GGGGAGTACGG-CCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGG	929

Query	905	CCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGT	964
Sbjct	930	CCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGT	989
Query	965	CTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGT	1024
Sbjct	990	CTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGT	1049
Query	1025	GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC	1084
Sbjct	1050	GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC	1109
Query	1085	AACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATA	1144
Sbjct	1110	AACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATA	1169
Query	1145	AACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACA	1204
Sbjct	1170	AACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACA	1229
Query	1205	CGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAA	1264
Sbjct	1230	CGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAA	1289
Query	1265	GTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA	1324
Sbjct	1290	GTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA	1349
Query	1325	ATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGC - TTGTACACACGCCCGTCAC	1383
Sbjct	1350	ATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACGCCCGTCAC	1409
Query	1384	ACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCAC	1443
Sbjct	1410	ACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCAC	1469
Query	1444	TTTGTGAT - CATGACTGG - - TGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAG	1485
Sbjct	1470	TTTGTGATTCATGACTGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAG	1514

Şekil 3.13. İzolat 14'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.

GenBank veri tabanı ile blast yapılarak kıyaslanmasıyla, izolat 14, %96 oranında *Shigella dysenteria* FBD012 straini ile benzerlik gösterdiği için *Shigella dysenteria* olarak isimlendirilmiştir.

Score = 1323 bits (716), Expect = 0.0
Identities = 815/857 (95%), Gaps = 30/857 (3%)
Strand=Plus/Plus

Query	518	GTA-AGGGTGGTGGAAATTTCTTTG-AGC-GT-TAATG-GGAGTTA-AGGAA-GAACCCC	568
Sbjct	649	GTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACC	708
Query	569	AGT-GCGAAGGCGACC-CCT-GACTGAT-CTGACA-TG-GG-G-GGAAGCGTGGGGAGCA	620
Sbjct	709	AGTGCGAAGGCGACCACCTGGAGTGAATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCA	768
Query	621	AACAGGATTAGAT--CCTGGTAGTCC-CGCCGT-AACGATGTCGACTAGCCG-TGGGATC	675
Sbjct	769	AACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATC	828
Query	676	C-TGAGATCTTAGTGGCGAGCTAACGCGAT-AGTCGA-CGCCTGGGGAGTACGGCCGCA	732
Sbjct	829	CTTGAGATCTTAGTGGCGAGCTAACGCGATAAGTCGACCCTGGGGAGTACGGCCGCA	888
Query	733	AGGTT-AAACTCAAATGAATTGAC-GGGG-CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAAT	789
Sbjct	889	AGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAAT	948
Query	790	TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCAGAGATGGA	849
Sbjct	949	TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCAGAGATGGA	1008
Query	850	TTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCACTCGTGTCTGTA	909
Sbjct	1009	TTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCACTCGTGTCTGTA	1068
Query	910	GATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGG	969
Sbjct	1069	GATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGG	1128
Query	970	TGGGCACCTCAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAGTC	1029
Sbjct	1129	TGGGCACCTCAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAGTC	1188
Query	1030	ATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCC	1089
Sbjct	1189	ATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCC	1248
Query	1090	AAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAAC	1149
Sbjct	1249	AAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAAC	1308
Query	1150	TCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGT	1209
Sbjct	1309	TCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGT	1368

```

Query 1210 TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCTGAAGTAGCT 1269
          |||
Sbjct 1369 TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAAGTAGCT 1428

Query 1270 AGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTCACTCATGAC-GAGAGTGAAGTCGTA 1328
          |||
Sbjct 1429 AGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGG-GTGAAGTCGTA 1487

Query 1329 ACAAGGTAGCCGTAGGG 1345
          |||
Sbjct 1488 ACAAGGTAGCCGTAGGG 1504

```

Şekil 3.14. İzolat 6Bi’ye ait 16S rDNA’nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.

Nükleotid blast işleminden sonra, Şekil 3.16’da görüldüğü gibi izolat 6Bi, *P.aeruginosa* MML2212 strainine %95 oranında benzerlik gösterdiği için bu bakteri *P.aeruginosa* olarak tanılanmıştır.

 [gb|AY987754.1](#) *Aeromonas hydrophila* strain ATCC 49140 16S ribosomal RNA gene,
complete sequence
Length=1510

Score = 2634 bits (1426), Expect = 0.0
Identities = 1426/1426 (100%), Gaps = 0/1426 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	GTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGT	60
Sbjct	38	GTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGT	97
Query	61	AATGCCTGGGAAATTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGC	120
Sbjct	98	AATGCCTGGGAAATTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGC	157
Query	121	ATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATATGCCCAGG	180
Sbjct	158	ATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATATGCCCAGG	217
Query	181	TGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA	240
Sbjct	218	TGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA	277
Query	241	GAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	300
Sbjct	278	GAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	337
Query	301	GGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGC	360
Sbjct	338	GGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGC	397
Query	361	CTTCGGGTTGTAAGCACTTTACGCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACGTATCAACT	420
Sbjct	398	CTTCGGGTTGTAAGCACTTTACGCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACGTATCAACT	457
Query	421	GTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGG	480
Sbjct	458	GTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGG	517
Query	481	AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGCGGTTGGATAAGT	540
Sbjct	518	AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGCGGTTGGATAAGT	577
Query	541	TAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAACTGTCCAGCTAGAGTC	600
Sbjct	578	TAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAACTGTCCAGCTAGAGTC	637
Query	601	TTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATA	660
Sbjct	638	TTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATA	697
Query	661	CCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTG GGGGAG	720
Sbjct	698	CCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTG GGGGAG	757
Query	721	CAACACGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTG	780
Sbjct	758	CAACACGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTG	817
Query	781	TCCTTGAGACGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCG	840
Sbjct	818	TCCTTGAGACGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCG	877
Query	841	CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTA	900
Sbjct	878	CAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTA	937

Query	901	ATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGTAGAGATA	960
Sbjct	938	ATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGTAGAGATA	997
Query	961	CGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAAGCTCGTGTCTGT	1020
Sbjct	998	CGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAAGCTCGTGTCTGT	1057
Query	1021	GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAA	1080
Sbjct	1058	GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAA	1117
Query	1081	TGGTGGGAACCTCAAGGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA	1140
Sbjct	1118	TGGTGGGAACCTCAAGGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA	1177
Query	1141	GTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCT	1200
Sbjct	1178	GTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCT	1237
Query	1201	GCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGC	1260
Sbjct	1238	GCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGC	1297
Query	1261	AACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATA	1320
Sbjct	1298	AACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATA	1357
Query	1321	CGTTCGCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTA	1380
Sbjct	1358	CGTTCGCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTA	1417
Query	1381	GATAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGTTTACCACGGTGTGATTCATGA	1426
Sbjct	1418	GATAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGTTTACCACGGTGTGATTCATGA	1463

Şekil 3.15. İzolat 5Bi'ye ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.

İzolat 5Bi, %100 oranında AY987754.1 accession numaralı *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140 straini ile benzerlik gösterdiği için, *A. hydrophila* olarak tanımlanmıştır.

 [gb|EU304255.1](#) Pantoea agglomerans 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1504

Score = 2543 bits (1377), Expect = 0.0
Identities = 1417/1436 (98%), Gaps = 3/1436 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	12	ACACATGC-AGTCGAGCGGTA-CACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGG	69
Sbjct	44	ACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGG	103
Query	70	GTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAA	129
Sbjct	104	GTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAA	163
Query	130	TACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCCTCATGCCATCAGATGTG	189
Sbjct	164	TACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCCTCATGCCATCAGATGTG	223
Query	190	CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTG	249
Sbjct	224	CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTG	283
Query	250	GTCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC	309
Sbjct	284	GTCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC	343
Query	310	AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA	369
Sbjct	344	AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA	403
Query	370	GAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTAGCGAGGAGGAAGGCGTTAAGGTTAATAACCT	429
Sbjct	404	GAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTAGCGAGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCT	463
Query	430	TGGCGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA	489
Sbjct	464	TGTCGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA	523
Query	490	ATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAAGCGGCTCG	549
Sbjct	524	ATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAAGCGGCTCG	583
Query	550	TCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCT	609
Sbjct	584	TCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCT	643
Query	610	AGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA	669
Sbjct	644	AGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA	703
Query	670	GGAATACCGGTGGCGAAAGCGGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGT	729
Sbjct	704	GGAATACCGGTGGCGAAAGCGGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGT	763
Query	730	GGGGAGCAACAGGATTTGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAG	789
Sbjct	764	GGGGAGCAACAGGATTTGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGACTTGGAG	823
Query	790	GTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTA	849
Sbjct	824	GTTGTGCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTA	883
Query	850	CGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT	909
Sbjct	884	CGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT	943

Query	910	GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACCTTAGCA	969
Sbjct	944	GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACCTTAGCA	1003
Query	970	GAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACCTTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG	1029
Sbjct	1004	GAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACCTTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG	1063
Query	1030	TGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGC	1089
Sbjct	1064	TGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGC	1123
Query	1090	GTGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGA	1149
Sbjct	1124	G-GTTCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGA	1182
Query	1150	CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAA	1209
Sbjct	1183	CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAA	1242
Query	1210	AGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGA	1269
Sbjct	1243	AGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATCGGA	1302
Query	1270	GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGG	1329
Sbjct	1303	GTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGG	1362
Query	1330	TGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAA	1389
Sbjct	1363	TGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAA	1422
Query	1390	GAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTGATGACTGG	1445
Sbjct	1423	GAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTGATGACTGG	1478

Şekil 3.16. İzolat 9Ba'ya ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.

İzolat 9Ba, %98 oranında EU304255.1 accession numaralı *Pantoea agglomerans* straini ile benzerlik gösterdiği için, *P.agglomerans* olarak tanımlanmıştır.

 [dbj|D16144.1|SPP16SRD1](#) Sphingomonas paucimobilis DNA for 16S ribosomal RNA
Length=1446

Score = 2449 bits (1326), Expect = 0.0
Identities = 1392/1419 (98%), Gaps = 23/1419 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query	5	GCGGCATTG-CTAACACATGC-AGTCGAACGAA-GCTTCGGCCTTA-TGGCGCACGGGTG	60
Sbjct	13	GCGGCA-TGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTG	71
Query	61	CGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTAGGTTTCGGAATAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATAC	120
Sbjct	72	CGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTAGGTTTCGGAATAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATAC	131
Query	121	CGGATGATATCGCGAGATCAAAGATTTATCGCCTGAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGGT	180
Sbjct	132	CGGATGATATCGCGAGATCAAAGATTTATCGCCTGAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGGT	191
Query	181	AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA	240
Sbjct	192	AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA	251
Query	241	GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG	300
Sbjct	252	GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG	311
Query	301	GACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTA-GGTTGT	359
Sbjct	312	GACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGT	371
Query	360	AAAGCTCTTTTACCCGGGAAGATAATGACTGTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCC	419
Sbjct	372	AAAGCTCTTTTACCCGGGAAGATAATGACTGTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCC	431
Query	420	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAA	479
Sbjct	432	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAA	491
Query	480	GCGCACGTA-GCGGCTTTGTAAGTCAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAAGTGC	538
Sbjct	492	GCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTCAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAAGTGC	551
Query	539	CTTTGAGACTGCATCGCTTGAATCCCAGGAGGTCACGTGGAATTCGAGTGTA-AGGTG	597
Sbjct	552	CTTTGAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTCA-GTGAATTCCGAGTGTAAGGTG	610
Query	598	AAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAAGTGGCGAAAGCGG-TGACTGGACTGGTATTGA	656
Sbjct	611	AAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAAGTGGCGAAAGCGGCTGACTGGACTGGTATTGA	670
Query	657	CGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT	716
Sbjct	671	CGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT	730
Query	717	AAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGCACTTGGTGCTTGTGGTGCGCAGC-TAACGCATT	775
Sbjct	731	AAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGCACTTGGTGCTTG-GTGCGCA-CGTAACGCATT	788
Query	776	AAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCCA-GTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	834
Sbjct	789	AAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	848
Query	835	TGCACAACGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGT	894
Sbjct	849	TGCACAA-GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGT	907

```

Query 895 TTGACATGGTAGGACGACTTCCAGAGATGGATTTCTTCCCTTCGGGGACCTACACACAGG 954
          |||
Sbjct 908 TTGACATGGTAGGACGACTTCCAGAGATGGATTTCTTC - - TTCGGGGACCTACACACAGG 965

Query 955 TGCTGCATGGCTGTCGTCAAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCG 1014
          |||
Sbjct 966 TGCTGCATGGCTGTCGTCAAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCG 1025

Query 1015 CAACCTCGCCTTTAGTTACCATCATTTGGTTGGGTACT - TAAAGGA - ACCGCCGGTGAT 1072
          |||
Sbjct 1026 CAACCTCGCCTTTAGTTACCATCATTTGGTTGGGTACTCTAAAGGANACCGCCGGTGAT 1085

Query 1073 AAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACAC 1132
          |||
Sbjct 1086 AAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGCCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACAC 1145

Query 1133 ACGTGCTACAATGGCAACTACAGTGGGCAGCGACCCTGCGAGGGCGAGCTAATCCCCAAA 1192
          |||
Sbjct 1146 ACGTGCTACAATGGCAACTACAGTGGGCAGCGACCCTGCGAGGGCGAGCTAATCCCCAAA 1205

Query 1193 AGTTGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTA 1252
          |||
Sbjct 1206 AGTTGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTA 1265

Query 1253 ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCCTGTACACACGCCCGTCAC 1312
          |||
Sbjct 1266 ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCCTGTACACACGCCCGTCAC 1325

Query 1313 ACCATGGGAGTTGGATTACCCGAAGGCGTTGCGCCAACCTAGCAATAGGAAGCAGGCGA 1372
          |||
Sbjct 1326 ACCATGGGAGTTGGATTACCCGAAGGCGTTGCGCCAACCTAGCAATAGGAAGCAGGCGA 1385

Query 1373 CCACGGTGG - TTCAGCGACTGG - - TGAA - TCGTAACAAG 1407
          |||
Sbjct 1386 CCACGGTGGGTTTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG 1424

```

Şekil 3.17. İzolat 2SS'e ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.

İzolat 2SS, %98 oranında *Sphingomonas paucimobilis* D16144.1 accession numaralı straini ile benzerlik gösterdiği için *S.paucimobilis* olarak isimlendirilmiştir.

 [gb|EU275247.1](#) Ochrobactrum anthropi strain YZ-1 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1446

Score = 2335 bits (1264), Expect = 0.0
Identities = 1378/1426 (96%), Gaps = 35/1426 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query	5	GCGGCAGGCTT-ACACATGC-AGTCGAGCG--CCGCAATGGGAGCGGCAGACGGGTGAGT	60
Sbjct	32	GCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGT	91
Query	61	AACGCGTGGGAACGTACCTTTTGCTACGGAATAACTCAGTGGAACTTGTGCTAATACCG	120
Sbjct	92	AACGCGTGGGAACGTACCTTTTGCTACGGAATAACTCAG-GGAACTTGTGCTAATACCG	150
Query	121	TATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGCCAAGGATCGCCCGCGTTGGATTAGCTA-	179
Sbjct	151	TATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGCCAAGGATCGCCCGCGTTGGATTAGCTAG	210
Query	180	TTGGTGAGGTAAAGGCTACCAA-GCGAC-ATCCATAGCTGGTCTGAGAAGATGATCAG-	236
Sbjct	211	TTGGTGAGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC	270
Query	237	CACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACATCCTACGGGAAGCAGCAGTGGGGAATATTGG	296
Sbjct	271	CACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGAC-TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG	329
Query	297	ACCATGGGCGCAAGCCTGATCCAG-CATGCCGCGTGAGATGATGAAGG-CCTAAGGTTGT	354
Sbjct	330	ACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAG-TGATGAAGGCCCTAGGTTGT	388
Query	355	AAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATTATTGACGGTTACCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACT	414
Sbjct	389	AAAGCTCTTTCACCGGTGAAGA-TAATGACGG-TAACGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACT	446
Query	415	TCGTGCCAGCAG-CGCGGTAAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGATTACTGGGCGTA	473
Sbjct	447	TCGTGCCAGCAGCGCGGTAAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGATTACTGGGCGTA	506
Query	474	AAGCGCACGTA-GCGGACTTTTAAGTCAGGGCGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAAC	532
Sbjct	507	AAGCGCACGTAGCGGACTTTTAAGTCAGGG-GTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAAC	565
Query	533	TGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGAGTATGGTAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTA-AGG	591
Sbjct	566	TGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGAGTATGGTAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAAGG	625
Query	592	TGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAAGTGGCGAAAGCGG-TCCTGGACCATTA	650
Sbjct	626	TGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCTCACTGGACCATTA	685
Query	651	GACGCT-AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCC	709
Sbjct	686	GACGCTAGAGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCC	745
Query	710	GTAACGATGAATGTTAGCCGTTGGGGAGTTACTCTTCGGTGCGCAGCTAACGCATTA	769
Sbjct	746	GTAACGATGAATGTTAGCCGTTGGGGAGTTACTCTTCGGTGCGCAGCTAACGCATTA	805
Query	770	AACATTCG-CTGGGGAGTACGGTCGCCAGATTAACCTCCAAAGGAA-TGACGGGGGCC	827
Sbjct	806	AACATTCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCT-CAAAGGAATTGACGGGGGCC	864
Query	828	CGCACAA-CGGTGGACGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGCAGACACCTTACCAGCC	886
Sbjct	865	CGCACAAAGCGGTGGA-GCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGCAGA-ACCTTACCAGCC	922

İzolat 8SS, %96 oranında *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 straini ile benzerlik gösterdiği için *Ochrobactrum anthropi* olarak isimlendirilmiştir.

[gb|DQ885257.1](#) Proteus vulgaris strain ATCC 29905 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1478

Score = 2405 bits (1302), Expect = 0.0
Identities = 1419/1469 (96%), Gaps = 34/1469 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query	3	GGCGGCA-G-CT-ACACATGCAGTCGAGCGGT-ACAGAAGAAAGCTTGCTTTCTTGCTGA	58
Sbjct	15	GGCGGCAAGGCTAACACATGCAATCGAGCGGTAAACAGAAGAAAGCTTGCTTTCTTGCTGA	74
Query	59	CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGGCCGAAT-TA-GGTGAT-ACTACT	115
Sbjct	75	CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCCG-ATAGAGGGGGATACTACT	133
Query	116	GGAACGGTGGCTAATACCGCATGACGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTT	175
Sbjct	134	GGAACGGTGGCTAATACCGCATGACGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTT	193
Query	176	GCCTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGC	235
Sbjct	194	GCCTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGC	253
Query	236	GACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG	295
Sbjct	254	AACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG	313
Query	296	ACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA	355
Sbjct	314	ACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA	373
Query	356	TGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGA	415
Sbjct	374	TGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGA	433
Query	416	TAAAGTTAATACCTTTGTCAATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTG	475
Sbjct	434	TAAAGTTAATACCTTTGTCAATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTG	493
Query	476	CCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG	535
Sbjct	494	CCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG	553
Query	536	CACGCAGGCGGTCAATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGC-TC	594
Sbjct	554	CACGCAGGCGGTCAATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATC	613
Query	595	TTGAAAACCTGGT-G-CTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCACGTGTA-CGGTGAA	651
Sbjct	614	T-GAAA-CTGGTTGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCACGTGTAGCGGTGAA	671
Query	652	ATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACG	711
Sbjct	672	ATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACG	731
Query	712	CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAA	771
Sbjct	732	CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAA	791
Query	772	ACGATGTCGATTTAGAGGTTGTGGTCTTGAAGTGTGGCTTCTGGAGCTATACGCGTTAAA	831
Sbjct	792	ACGATGTCGATTTAGAGGTTGTGGTCTTGAAGTGTGGCTTCTGGAGCTA-ACGCGTTAAA	850
Query	832	TCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGGTTAAA-CTCAAAGGAATTGAACCGGGGGG	890
Sbjct	851	TCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG-TTAAACTCAAATG-AATTGA-C-GGGGG-	905
Query	891	CCCCGCAACCAACCCGGTTGGAACCAATTTGGGTAAATTCGAATCCAACCCGAAGACCTT	950
Sbjct	906	CCC-GCA-C-AAGC-GGT-GGAGC-A-TGTGGTTAATTCGA-TGCAACGCGAAGAACCT	957

```

Query 951 TACCTACTTCTGTGACATCCAGCGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCCTTCGGGAACGC 1010
      ||||| || |||||
Sbjct 958 TACCTACT-CT-TGACATCCAGCGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCCTTCGGGAACGC 1015

Query 1011 TGAGACAGGTGCTGCTGCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCG 1070
      |||||
Sbjct 1016 TGAGACAGGTGCTGCTGCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCG 1075

Query 1071 CAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGCGTAATGCCGGGAACCAAAGGAGAC 1130
      |||||
Sbjct 1076 CAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGCGTAATGCCGGGAACCAAAGGAGAC 1135

Query 1131 TGCCGGTGATAAACCGGAGGAAG-TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGT 1189
      |||||
Sbjct 1136 TGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGT 1195

Query 1190 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCG 1249
      |||||
Sbjct 1196 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCG 1255

Query 1250 GAACTCATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG 1309
      |||||
Sbjct 1256 GAACTCATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG 1315

Query 1310 AATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCATTGTACACA 1369
      |||||
Sbjct 1316 AATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCATTGTACACA 1375

Query 1370 CCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACATTCGGGAGG 1429
      |||||
Sbjct 1376 CCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACATTCGGGAGG 1435

Query 1430 -CGCT-ACCACTTTGTGATTCATGACTGG 1456
      ||||
Sbjct 1436 GCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGG 1464

```

Şekil 3.19. İzolat 2’ye ait 16S rDNA’nın kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotid blast sonucu.

Nükleotid blast işleminden sonra, Şekil 3.26’de görüldüğü gibi izolat 2, *Proteus vulgaris* ATCC 29905 straini ile %96 oranında benzer bulunmuştur. Bu nedenle bakteri *P.vulgaris* olarak tanılanmıştır.

Tüm kültürel, biyokimyasal ve moleküler tanılamalar sonucunda 12 adet izolat numaralarıyla birlikte Çizelge 3.4’de verilmiştir.

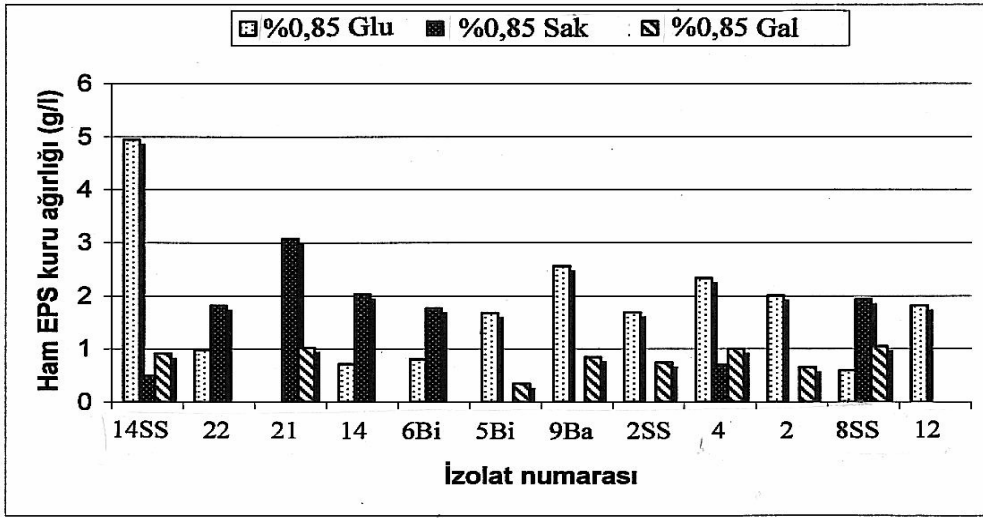
Çizelge 3.4. Oniki izolatın tanılama sonuçları.

İzolat No.	İzolat
14SS	<i>Burkholderia cepacia</i> (syn. <i>Pseudomonas cepacia</i>)
22	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
21	<i>Pasteurella haemolytica</i>
14	<i>Shigella dysenteriae</i>
6Bi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5Bi	<i>Aeromonas hydrophila</i>
9Ba	<i>Pantoea agglomerans</i> (syn. <i>Enterobacter agglomerans</i>)
2SS	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (syn. <i>Pseudomonas paucimobilis</i>)
4	<i>Burkholderia gladioli</i>
2	<i>Proteus vulgaris</i>
8SS	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
12	<i>Pseudomonas sp.</i>

Sonuçlardan da görüldüğü gibi, API test kitleri ile elde edilen bazı sonuçların moleküler tanılama ile örtüşmediği gözlenmiştir. API ile *Alcaligenes sp.* olarak tanılanan izolat 14’ün *S.dysenteriae*, *Pseudomonas sp.* olarak tanılanan izolat 2’nin *P.vulgaris*, *Pasteurella sp.* olarak tanılanan izolat 8SS’in ise *O.anthropi* olduğu saptanmıştır. Bununla beraber izolat 6Bi için, API ile genus seviyesinde kalan tanılamamanın moleküler sekans analizi ile tür seviyesine iletildiği ve bakterinin *P.aeruginosa* olduğu belirlenmiştir.

3.2. İzolatların En Yüksek EPS Üretimlerini Gerçekleştirdikleri Ortamlar

NB'a %0,85 glukoz, sakkaroz veya galaktoz ilave edilen sıvı besiyerlerindeki 5 günlük kültürlerin EPS üretim durumları Şekil 3.20'de verilmiştir.



Şekil 3.20 İzolatların 5 günde sıvı kültürlerde EPS üretim durumları.

3.3. İzolatların Büyüme Eğrileri

Tüm izolatların inokulasyonları yapılmış ortamlarda Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'de zamana karşı gösterdikleri absorbens değerleri ile Şekil 3.21-Şekil 3.32'de büyüme eğrileri gösterilmiştir.

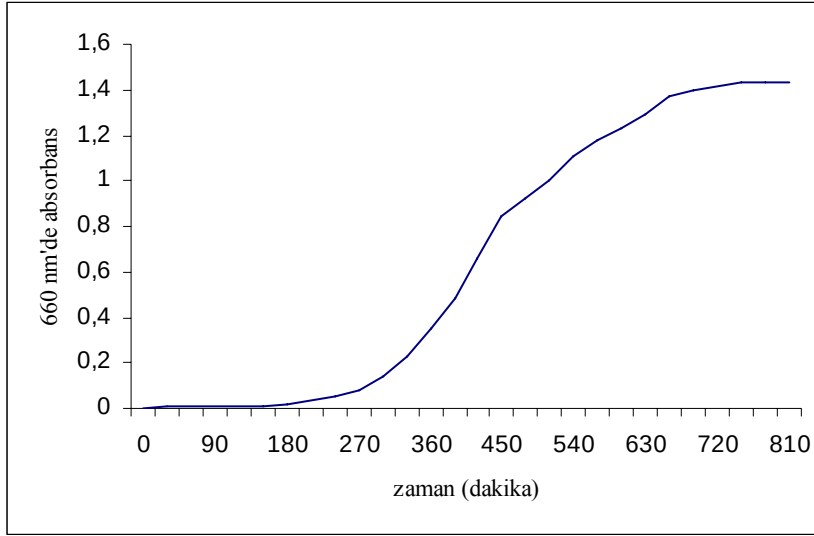
Çizelge 3.5. İzolat 14SS, 22, 21, 14, 6Bi ve 5Bi'nin besiyerlerinde 660 nm'de zamana karşı gösterdiği absorbans değerleri.

Zaman (dk)	Absorbans					
	14SS	22	21	14	6Bi	5Bi
0	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
30	0,005	0,003	0,005	0,008	0,003	0,007
60	0,005	0,002	0,004	0,016	0,005	0,004
90	0,006	0,001	0,008	0,019	0,018	0,002
120	0,012	0,002	0,008	0,050	0,031	0,003
150	0,013	0,005	0,012	0,060	0,059	0,002
180	0,020	0,005	0,022	0,075	0,068	0,003
210	0,031	0,004	0,026	0,109	0,097	0,009
240	0,054	0,005	0,052	0,172	0,192	0,015
270	0,079	0,008	0,079	0,276	0,416	0,025
300	0,140	0,007	0,112	0,363	0,527	0,049
330	0,231	0,007	0,151	0,457	0,592	0,083
360	0,351	0,018	0,235	0,623	0,639	0,146
390	0,486	0,021	0,342	0,798	0,675	0,295
420	0,655	0,028	0,462	0,930	0,698	0,441
450	0,842	0,040	0,578	1,050	0,719	0,584
480	0,920	0,041	0,726	1,205	0,732	0,686
510	1,004	0,066	0,854	1,294	0,742	0,820
540	1,106	0,097	1,046	1,377	0,749	0,943
570	1,176	0,136	1,128	1,479	0,757	1,074
600	1,231	0,191	1,206	1,549	0,761	1,180
630	1,293	0,250	1,393	1,585	0,765	1,259
660	1,373	0,337	1,427	1,607	0,767	1,315
690	1,399	0,454	1,489	1,668	0,771	1,365
720	1,418	0,553	1,514	1,712	0,773	1,366
750	1,436	0,776	1,514	1,734	0,773	1,366
780	1,435	0,864		1,742		
810	1,435	0,938		1,742		
840		0,979				
870		1,022				
900		1,054				
930		1,067				
960		1,065				

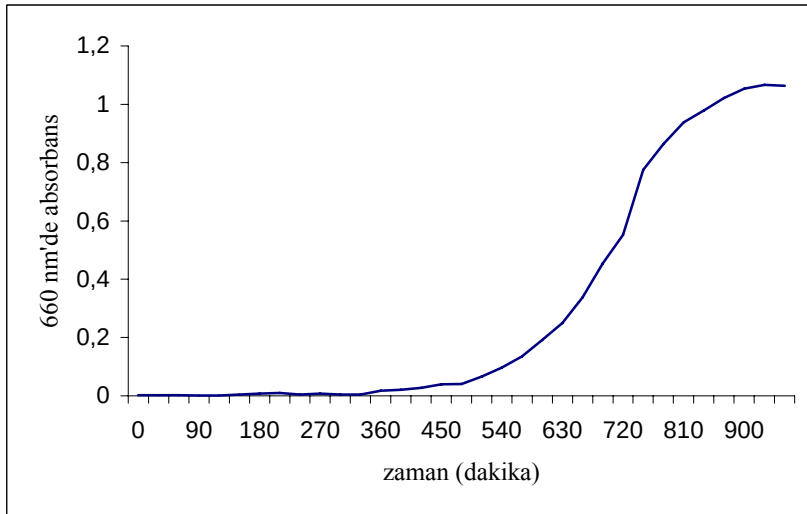
Çizelge 3.6. İzolat 9Ba, 2SS, 4, 2, 8SS ve 12'nin besiyerlerinde 660 nm'de zamana karşı gösterdiği absorbans değerleri.

Zaman (dk)	Absorbans					
	9Ba	2SS	4	2	8SS	12
0	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
30	0,004	0,009	0,006	0,006	0,003	0,003
60	0,007	0,008	0,009	0,004	0,006	0,004
90	0,016	0,012	0,019	0,006	0,011	0,007
120	0,039	0,017	0,042	0,010	0,012	0,009
150	0,060	0,034	0,086	0,014	0,017	0,019
180	0,106	0,043	0,175	0,027	0,02	0,030
210	0,229	0,071	0,327	0,051	0,03	0,036
240	0,307	0,099	0,455	0,111	0,037	0,056
270	0,479	0,153	0,628	0,223	0,052	0,097
300	0,753	0,220	0,777	0,450	0,082	0,145
330	1,074	0,300	0,891	0,610	0,099	0,220
360	1,211	0,430	1,000	0,941	0,163	0,320
390	1,268	0,612	1,145	1,231	0,237	0,464
420	1,343	0,783	1,251	1,378	0,303	0,615
450	1,385	0,982	1,326	1,469	0,435	0,725
480	1,390	1,213	1,391	1,522	0,509	0,921
510	1,426	1,412	1,407	1,580	0,648	0,998
540	1,457	1,610	1,403	1,607	0,835	1,129
570	1,479	1,744	1,422	1,652	0,96	1,294
600	1,504	1,845	1,426	1,688	1,095	1,414
630	1,520	1,864	1,429	1,710	1,234	1,444
660	1,527	1,875	1,426	1,744	1,351	1,550
690	1,532	1,937	1,410	1,767	1,447	1,669
720	1,529	1,956	1,371	1,784	1,609	1,694
750	1,528	1,983	1,352	1,796	1,734	1,701
780		1,990		1,805	1,791	1,727
810		1,990		1,807	1,795	1,730
840				1,809	1,799	1,730
870				1,808	1,802	
900					1,801	

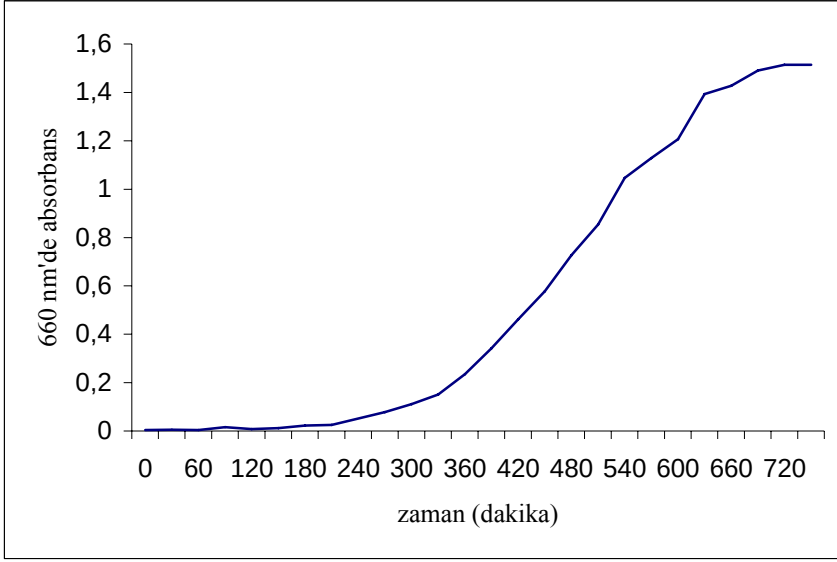
Değerlerden ikilenme sürelerinin izolat 14, 6Bi, 5Bi, 4, 2'nin yaklaşık 30 dk, izolat 14SS, 21, 9Ba, 2SS, 8SS, 12'nin yaklaşık 30-60 dk, izolat 22'nin yaklaşık 60-90dk olduğu bulunmuştur.



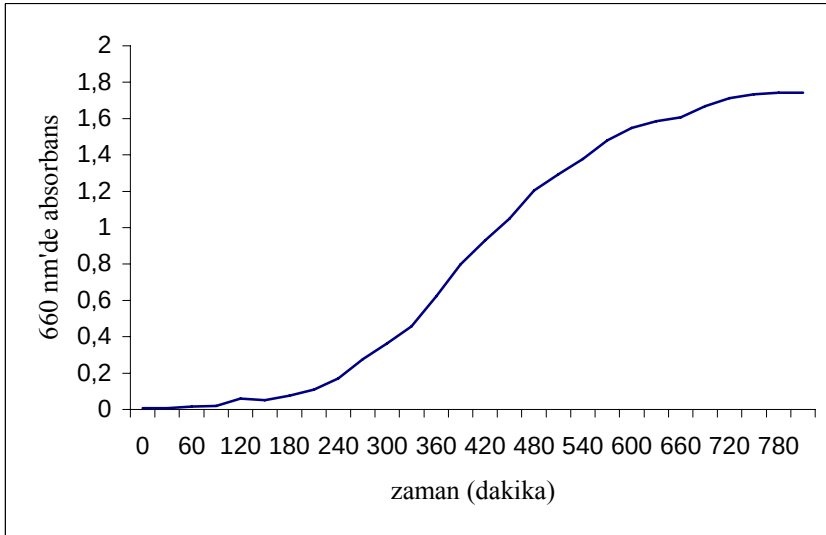
Şekil 3.21. 660nm'de izolat 14SS'in büyüme eğrisi.



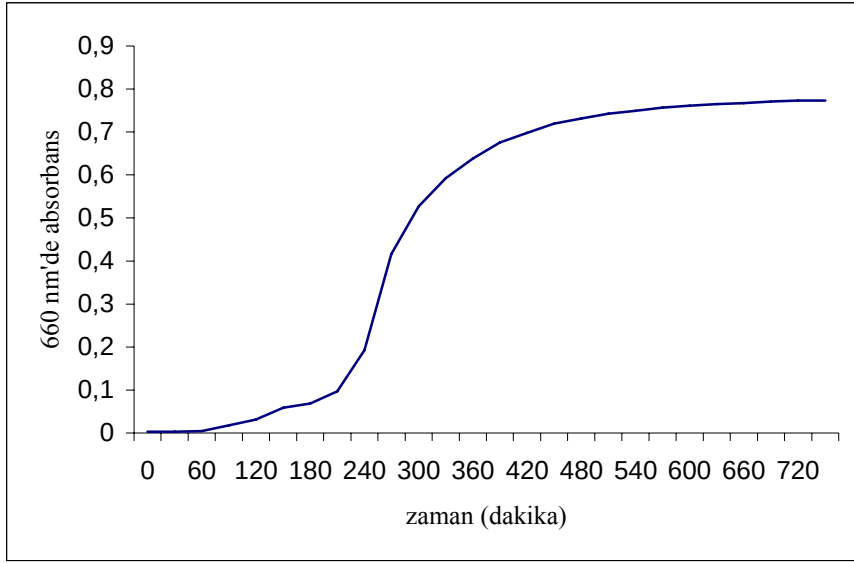
Şekil 3.22. 660nm'de izolat 22'nin büyüme eğrisi.



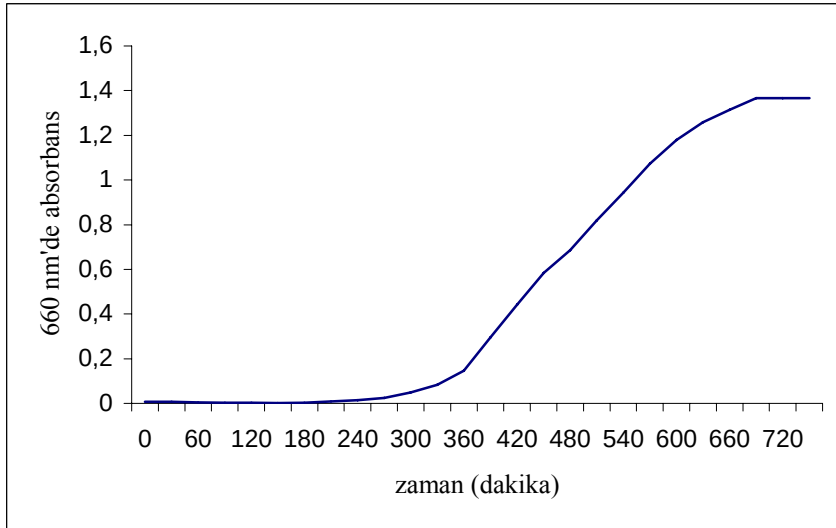
Şekil 3.23. 660nm'de izolat 21'in büyüme eğrisi.



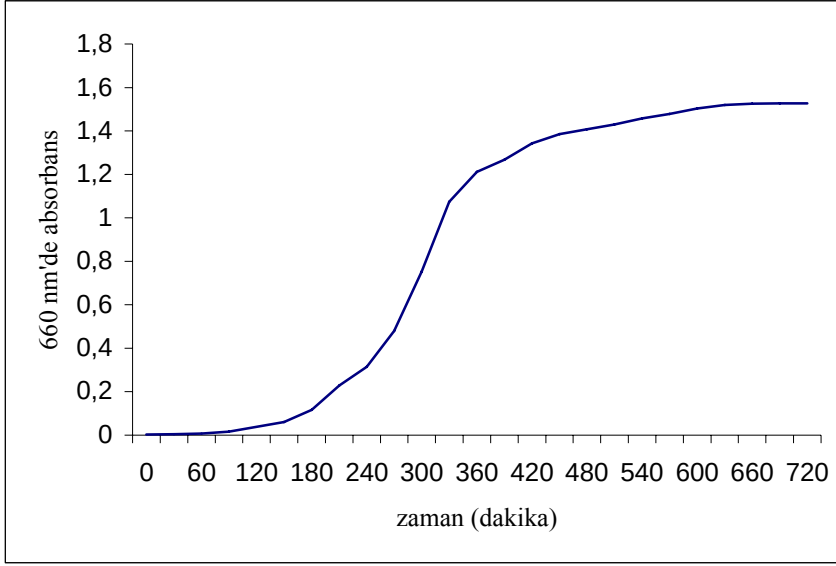
Şekil 3.24. 660nm'de izolat 14'ün büyüme eğrisi.



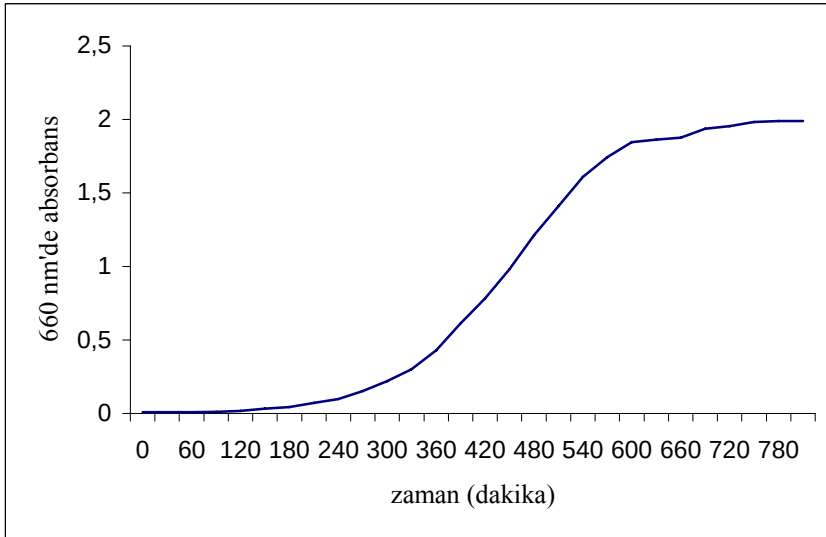
Şekil 3.25. 660nm’de izolat 6Bi’nin büyüme eğrisi.



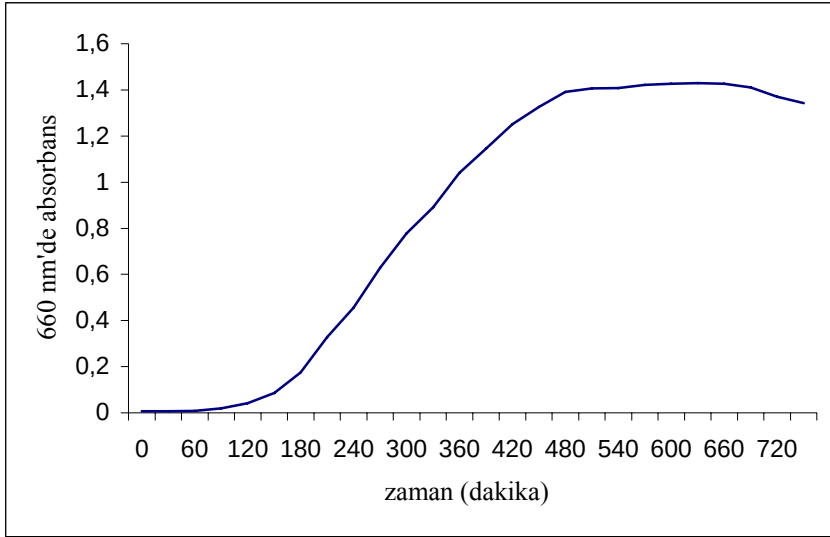
Şekil 3.26. 660nm’de izolat 5Bi’nin büyüme eğrisi.



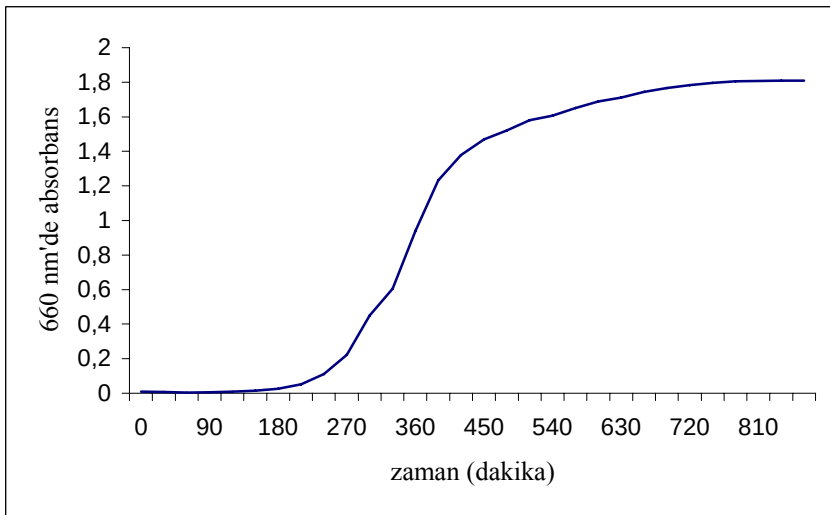
Şekil 3.27. 660nm'de izolat 9Ba'nın büyüme eğrisi.



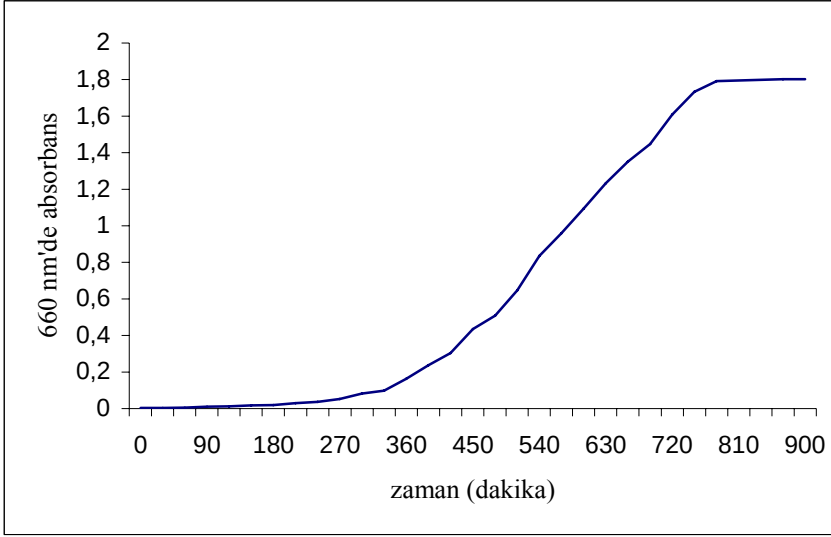
Şekil 3.28. 660nm'de izolat 2SS'in büyüme eğrisi.



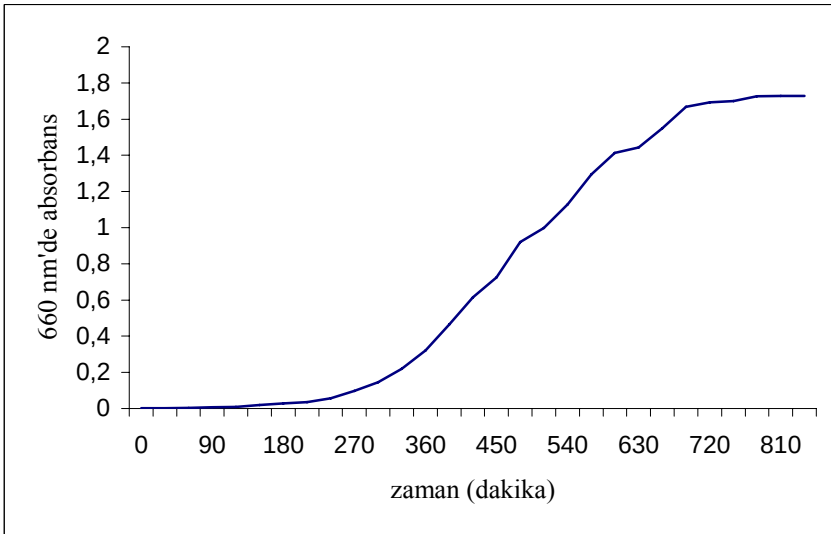
Şekil 3.29. 660nm'de izolat 4'ün büyüme eğrisi.



Şekil 3.30. 660nm'de izolat 2'nin büyüme eğrisi.



Şekil 3.31. 660nm'de izolat 8SS'in büyüme eğrisi.



Şekil 3.32. 660nm'de izolat 12'nin büyüme eğrisi.

3.4. İzolatların Hücre Kuru Ağırlıklarının ve EPS Verimlerinin Saptanması

Tüm izolatların fermentasyon sıvılarından elde edilen hücre kuru ağırlıkları ile EPS miktarının hücre kuru ağırlığına oranına ($Y=p/x$) göre hesaplanan en yüksek üretimler Çizelge 3.7’de sunulmuştur. Sonuçlara göre, en yüksek EPS verimi izolat 14SS ile, en az verim ise izolat 2SS ile elde edilmiştir.

Çizelge 3.7. İzolatların, Şekil 3.20’de belirtilen ortamlarda 30°C’de 5 gün inkübasyon sonrasındaki hücre kuru ağırlıkları ve EPS verimleri.

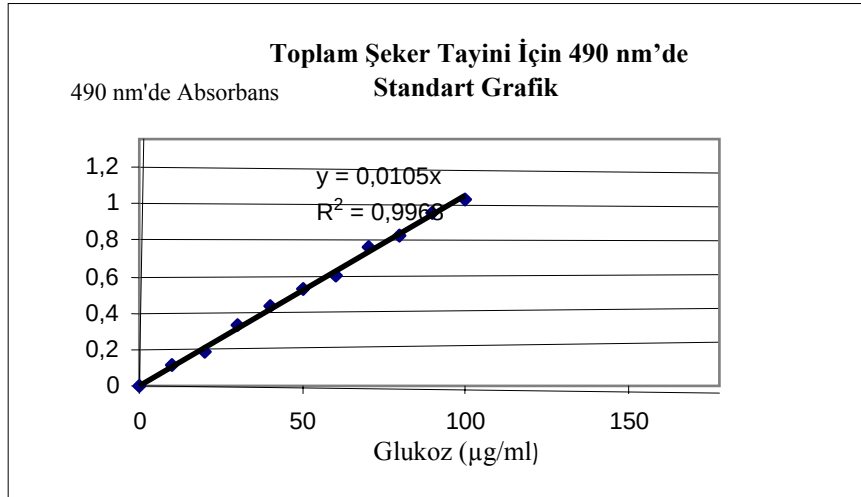
İzolat No.	Hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ham EPS kuru ağırlığı (g/l)	Y(p/x)	Verim (%)
14SS	10,53	4,95	0,4700	47,00
22	9,90	3,07	0,3101	31,01
21	8,30	1,68	0,2024	20,24
14	9,95	2,00	0,2010	20,10
6Bi	9,91	1,69	0,1705	17,05
5Bi	10,04	1,69	0,1683	16,83
9Ba	12,00	2,02	0,1682	16,82
2SS	11,67	1,70	0,1457	14,57
4	11,75	1,95	0,1660	16,60
2	11,84	1,93	0,1630	16,30
8SS	12,29	2,00	0,1627	16,27
12	10,03	1,68	0,1675	16,75

3.5. EPS'lerin Toplam Şeker Analizleri İçin 490 nm'de Çıkarılan Standart Grafik

0-100 µg/ml aralıkta glukoz solüsyonunun spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda absorbans değerleri Çizelge 3.8'de ve çıkarılan standart grafik Şekil 3.33'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. 0-100 µg/ml aralıkta glukoz solüsyonlarının 490 nm dalga boyunda absorbans değerleri.

Konsantrasyon µg/ml	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Ortalama
0	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,073	0,091	0,170	0,111
20	0,200	0,162	0,205	0,189
30	0,337	0,328	0,341	0,335
40	0,448	0,429	0,445	0,441
50	0,540	0,527	0,544	0,537
60	0,601	0,621	0,609	0,610
70	0,755	0,760	0,771	0,762
80	0,825	0,823	0,814	0,821
90	0,953	0,940	0,955	0,949
100	1,028	0,997	1,041	1,022



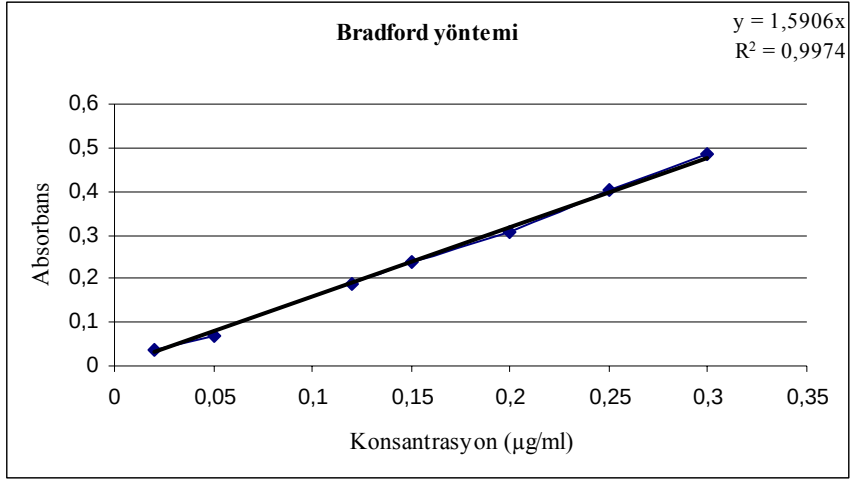
Şekil 3.33. Toplam şeker miktarı tayini için 490 nm'deki standart grafik.

3.6. EPS'lerin Toplam Protein Analizleri İçin 595 nm'de Çıkarılan Standart Grafik

Çizelge 3.9'da Bradford Yöntemi ile 595 nm'de elde edilen absorbans değerleri ve Şekil 3.34'de Bradford yöntemine göre protein standart grafiği verilmiştir.

Çizelge 3.9. Bradford yöntemi ile 595 nm'de elde edilen absorbans değerleri.

Konsantrasyon µg/ml	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Ortalama
0,02	0,043	0,051	0,015	0,036
0,05	0,084	0,046	0,072	0,067
0,12	0,188	0,203	0,191	0,194
0,15	0,236	0,250	0,249	0,245
0,20	0,298	0,303	0,306	0,302
0,25	0,405	0,418	0,416	0,413
0,30	0,495	0,470	0,483	0,483



Şekil 3.34. 595 nm’de çıkarılan protein standart grafiği.

3.7. EPS’lerin HPLC ile Şeker İçerikleri Sonuçları

Tüm EPS’lerin toplam şeker ve protein içerikleri Çizelge 3.10’da, şeker kompozisyonları (tanımlanmış şekerlerin %’si) Çizelge 3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3.10. EPS'lerin toplam şeker ve toplam protein içerikleri.

İzolat No.	Toplam şeker (EPS'deki %)	Toplam protein (EPS'deki %)
14SS	35,0	28,2
22	56,0	27,0
21	38,2	21,7
14	23,5	15,3
6Bi	30,1	21,0
5Bi	26,8	10,1
9Ba	28,4	18,8
2SS	33,2	26,0
4	41,6	28,2
2	34,9	25,0
8SS	34,2	29,7
12	31,0	22,1

Sonuçlar, incelenen EPS'lerin yüksek şeker ve protein içeriğine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, şeker içeriğinin genel olarak tüm EPS'lerde protein içeriğinden daha fazla olduğu, toplam şeker oranının %23,5-56,0 (g şeker/g EPS), toplam protein oranının ise %10,1-29,7 (g protein/g EPS) arasında değiştiği belirlenmiştir.

Çizelge 3.11. EPS'lerin şeker kompozisyonları (tanımlanmış şekerlerin %'si).

İzolat No.	Glukoz	Galaktoz	Mannoz	Arabinoz	Fruktoz	Rhamnoz	Riboz	Tanımlanmayan
14SS	45,2	20,6	10,6	3,5	0,0	19,0	0,0	1,1
22	34,0	11,7	21,0	11,8	0,2	20,7	0,5	0,1
21	34,5	19,0	45,3	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0
14	40,0	13,8	29,0	0,0	0,9	14,5	0,0	1,8
6Bi	29,0	8,4	20,7	9,0	1,9	25,0	5,3	0,7
5Bi	41,0	9,4	22,0	0,6	0,0	27,0	0,0	0,0
9Ba	31,0	30,0	28,6	0,0	0,0	4,2	6,0	0,2
2SS	40,0	8,2	26,0	20,0	0,0	4,6	1,1	0,1
4	40,1	24,0	20,0	0,5	0,0	15,0	0,3	0,1
2	30,0	9,0	20,2	11,0	1,7	23,2	4,9	0,0
8SS	39,4	16,8	42,2	0,0	0,0	0,4	0,9	0,3
12	37,0	15,2	14,8	4,52	0,0	25,5	2,9	0,08

Elde edilen değerlerden, genellikle EPS'lerin daha fazla olarak glukoz ve galaktoz, daha az olarak mannoz, ramnoz, fruktoz, arabinoz, riboz içerdiği tespit edilmiştir. Çalışmada, izolat 21, 5Bi ve 2'ye ait EPS'lerin tüm şekerleri tanımlanmışken, izolat 14SS'de tanımlanamayan şeker %'si en fazla bulunmuştur.

3.8. EPS'lerin Emülsifiye Edici Aktiviteleri

EPS materyallerinin emülsifiye edici aktiviteleri 540 nm'de ölçüldükten ve $A_t / A_0 \times 100$ formülü ile % emülsifiye edici aktivite hesaplandıktan sonra; 30., 60. ve 120. dakikalar için elde edilen sonuçlar Çizelge 3.12'de verilmiştir.

Çalışmamızda EPS'nin emülsifiye edici aktivitesi; hidrokarbonun sudaki emülsiyonunun zamana bağlı olarak kararlılığının korunması olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, genelde tüm EPS'lerin zamana bağlı olarak emülsifiye edici aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır. İzolat 2SS'e ait EPS'nin; 30., 60. ve 120. dk.larda emülsiyonun kararlılığını fazla miktarda koruduğu, izolat 5Bi'ye ait EPS'nin ise en düşük emülsifiye edici aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Çizelge 3.12. EPS'lerin emülsifiye edici aktiviteleri.

İzolât No.	Kontrol *				EPS'nin emülsifiye edici aktivitesi (unit/mg)				Emülsifiye edici aktivite (%)			
	Zaman (dk)				A ₀	A ₃₀	A ₆₀	A ₁₂₀	A ₀	A ₃₀	A ₆₀	A ₁₂₀
	0.	30.	60.	120.								
14SS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83	0,73	0,60	0,49	100,00	87,95	72,29	59,04
22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	0,73	0,69	0,65	100,00	86,90	82,14	77,38
21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,31	0,26	0,23	100,00	96,88	81,25	71,88
14	0,00	0,00	0,00	0,00	1,11	0,95	0,78	0,66	100,00	85,59	70,27	59,46
6Bi	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,17	0,16	0,12	100,00	100,00	94,12	70,59
5Bi	0,00	0,00	0,00	0,00	0,71	0,62	0,44	0,31	100,00	87,32	61,97	43,66
9Ba	0,00	0,00	0,00	0,00	1,07	1,01	0,92	0,70	100,00	94,39	85,98	65,42
2SS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,73	0,72	0,70	0,67	100,00	98,63	95,89	91,78
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,95	0,94	0,91	0,82	100,00	98,95	95,79	86,32
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	0,24	0,22	0,18	100,00	100,00	91,66	75,00
8SS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	0,35	0,29	0,26	100,00	100,00	82,86	74,29
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,16	0,15	0,13	100,00	84,21	78,95	68,42

* Kontrol olarak EPS'siz fosfat tamponu kullanılmıştır.

3.9. EPS'leri Parçalayıcı Bakteriler

Hücre dışı polisakkarit materyallerini parçalayıcı bakterilerin taranması amacıyla, tek C kaynağı olarak ilave edilen ortamlarda bakterinin kendisinin ve diğer bakterilerin 620 nm'deki 30C°'deki 5 günlük büyümeleri incelenmiştir. 0. ve 5. günde elde edilen absorbanslar arasındaki fark “ ΔA_{620} ” olarak tanımlanmıştır. $\Delta A_{620} \geq 0,15$ olan sonuçlar “iyi büyüme”, $0,05 \leq \Delta A_{620} < 0,15$ olan sonuçlar “az büyüme”, $\Delta A_{620} < 0,05$ olan sonuçlar “kötü büyüme” olarak kabul edilmiştir (Rättö ve ark., 2001). Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.13’de sunulmuştur.

Çizelgedeki sonuçlara göre, *Pseudomonas sp.* (izolat 12)’den elde edilen hücre dışı polisakkarit sekiz bakteri, *B.gladiali* (izolat 4) ve *P.aureus* (izolat 6Bi)’den elde edilen hücre dışı polisakkaritler 7 bakteri, *B.cepacia*’dan (izolat 14SS), *P.fluorescens* (izolat 22) ve *S.dysenteriae* (izolat 14)’den elde edilen hücre dışı polisakkaritler beş bakteri, *S.paucimobilis* (izolat 2SS) ve *Ochrobactrum anthropi* (izolat 8SS)’den elde edilen hücre dışı polisakkaritler dört bakteri, *Pasteurella haemolytica* (izolat 21) ve *A.hydrophila* (izolat 5Bi)’den elde edilen hücre dışı polisakkaritler üç bakteri, *P.vulgaris* (izolat 2) ve *P.agglomerans* (izolat 9Ba)’dan elde edilen hücre dışı polisakkaritler sadece bir bakteri tarafından kullanılmıştır ($\Delta A_{620} \geq 0,15$).

Çizelge 3.13. EPS materyallerinin tek C kaynağı olarak kullanıldığında bakterilerin 620 nm'deki büyümeleri.

İzolat No.	İzolat no. kodlu EPS materyalleri üzerindeki büyüme (Absorbans olarak)											
	14SS EPS	22 EPS	21 EPS	14 EPS	6Bi EPS	5Bi EPS	9Ba EPS	2SS EPS	4 EPS	2 EPS	8SS EPS	12 EPS
14SS	0.10	0.66	0.06	<0.05	0.09	0.17	<0.05	<0.05	0.71	0.06	<0.05	0.55
22	0.60	0.45	<0.05	0.09	0.54	0.06	<0.05	<0.05	0.18	0.30	0.10	0.25
21	0.13	0.07	<0.05	0.10	0.70	0.07	<0.05	0.13	0.13	<0.05	0.22	<0.05
14	0.47	0.09	0.13	<0.05	0.58	<0.05	0.17	0.09	0.11	<0.05	0.09	0.24
6Bi	0.10	<0.05	0.25	0.08	0.63	0.07	<0.05	0.11	0.24	<0.05	<0.05	0.20
5Bi	0.74	0.10	<0.05	0.16	0.59	<0.05	<0.05	<0.05	0.10	<0.05	0.06	0.06
9Ba	<0.05	<0.05	0.11	0.25	<0.05	<0.05	<0.05	0.08	0.17	<0.05	0.15	0.30
2SS	<0.05	0.06	0.16	0.19	0.70	0.09	<0.05	0.49	0.19	<0.05	0.10	0.23
4	0.60	0.70	0.13	0.20	0.55	0.21	<0.05	0.18	0.58	0.14	0.15	0.66
2	0.13	0.62	0.06	0.09	0.07	0.10	<0.05	0.71	0.12	<0.05	0.06	0.07
8SS	0.09	0.13	0.65	0.56	0.10	0.72	<0.05	0.10	0.11	<0.05	0.17	0.08
12	0.28	0.36	<0.05	<0.05	0.10	0.07	<0.05	0.69	0.60	<0.05	<0.05	0.72

3.10. EPS'lerin Hidroliz Test Sonuçları ve İndirgenmiş Şeker Ölçümleri

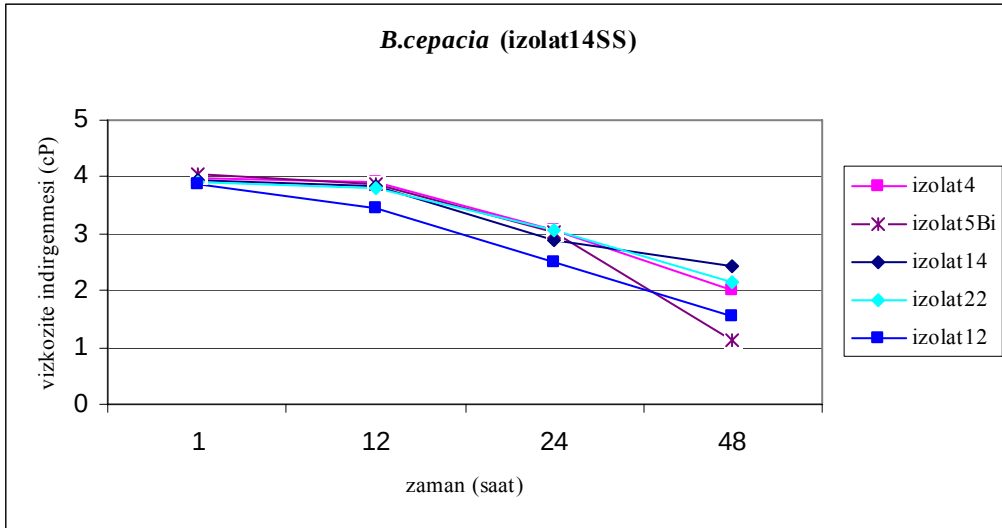
Her bir izolatın ürettiği EPS ilave edilen (%3'lük) besiyerinde iyi büyüme gösteren ($\Delta A_{620} > 0,15$) bakteriler büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkoziteleri, % vizkozite indirgenme sonuçları ve indirgenmiş şekerlerin %'si (substratın %'si) aşağıda belirtilen çizelgelerde verilmiştir. Şöyle ki; izolat 14SS'in Çizelge 3.14'de, izolat 22'in Çizelge 3.15'de, izolat 21'in Çizelge 3.16'da, izolat 14'nin Çizelge 3.17'de, izolat 6Bi'in Çizelge 3.18'de, izolat 5Bi'nin Çizelge 3.19'da, izolat 9Ba'nın Çizelge 3.20'de, izolat 2SS'in çizelge 3.21'de, izolat 4'ün Çizelge 3.22'de, izolat 2'nin Çizelge 3.23'de, izolat 8SS'in Çizelge 3.24'de, izolat 12'nin Çizelge 3.25'de sonuçları görülmektedir. Buna ilaveten herbir izolatın EPS'li ortamlardaki bu vizkozite değişimleri grafik olarak da gösterilmiştir. İzolatların belirtilen sırası ile grafikler Şekil 3.35-3.46'da sunulmuştur.

Genel olarak, çalışmadaki bakterilerin, içerisinde değişik EPS'lerin bulunduğu ortamların vizkozitesini zamana bağlı olarak değişen miktarlarda indirdiği görülmüştür.

Çizelge 3.14. *B.cepacia* (izolat 14SS) EPS'si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakteriler büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkozite, vizkozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Vizkozite (cP)				Vizkozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	
<i>B.gladioli</i> (izolat 4)	3,98	3,90	2,95	2,01	2,01	25,88	49,50	4,5
<i>P.fluorescens</i> (izolat 22)	3,90	3,80	3,05	2,14	2,56	21,79	45,13	4,1
<i>Pseudomonas</i> sp. (izolat 12)	3,88	3,45	2,49	1,55	11,08	35,82	60,05	5,6
<i>S.dysenteriae</i> (izolat 14)	3,95	3,85	2,89	2,43	2,53	26,84	38,48	4,8
<i>A.hydrophila</i> (izolat 5Bi)	4,05	3,88	3,03	1,12	4,20	25,19	72,34	5,2

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.

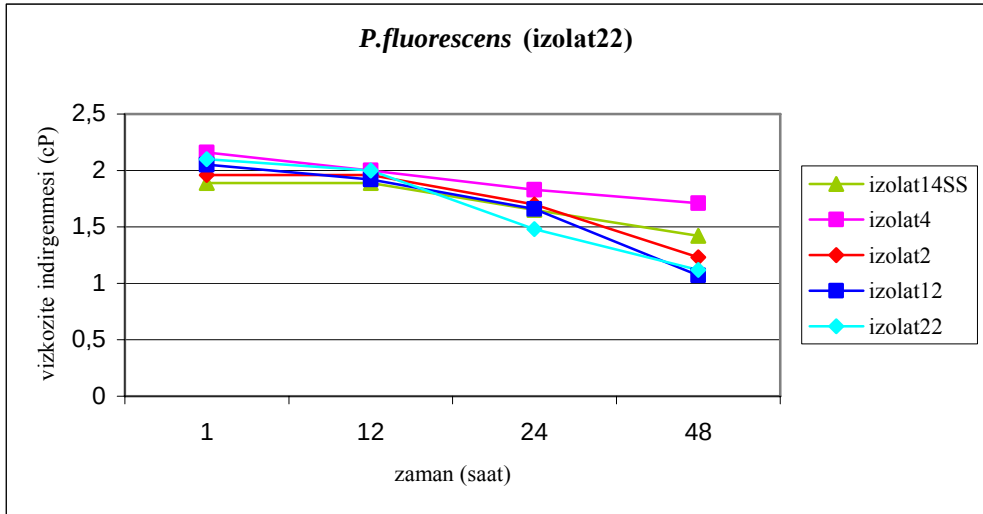


Şekil 3.35. *B.cepacia* (izolat 14SS) EPS'si bulunan (%3lük) besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.

Çizelge 3.15. *P.fluorescens* (izolat 22) EPS'si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkozite, vizkozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Vizkozite (cP)				Vizkozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	
<i>B.gladioli</i> (izolat 4)	2,16	2,00	1,83	1,71	7,41	15,28	20,83	3,0
<i>P.fluorescens</i> (izolat 22)	2,10	2,00	1,48	1,12	4,76	29,52	46,66	5,8
<i>B. cepacia</i> (izolat 14SS)	1,89	1,89	1,65	1,42	0,00	12,70	24,87	2,3
<i>P.vulgaris.</i> (izolat 2)	1,96	1,96	1,70	1,23	0,00	13,27	37,25	4,0
<i>Pseudomonas</i> sp. (izolat 12)	2,05	1,92	1,66	1,07	6,34	19,02	47,80	5,7

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.

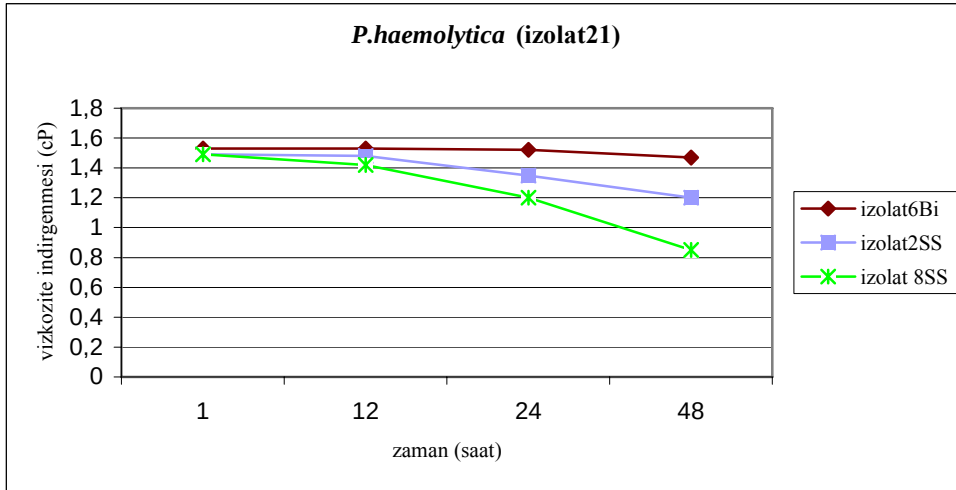


Şekil 3.36. *P.fluorescens* (izolat 22) EPS'si bulunan (%3lük) besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.

Çizelge 3.16. *P.haemolytica* (izolat 21) EPS'si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkozite, vizkozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Vizkozite (cP)				Vizkozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	48.saat
<i>O.anthropi</i> (izolat 8SS)	1,49	1,42	1,20	0,85	4,70	19,46	42,95	5,8
<i>P.aeruginosa</i> (izolat 6Bi)	1,53	1,53	1,52	1,47	0,00	0,65	3,92	4,9
<i>S.paucimobilis</i> (izolat 2SS)	1,49	1,48	1,35	1,20	0,67	9,40	19,46	2,2

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.

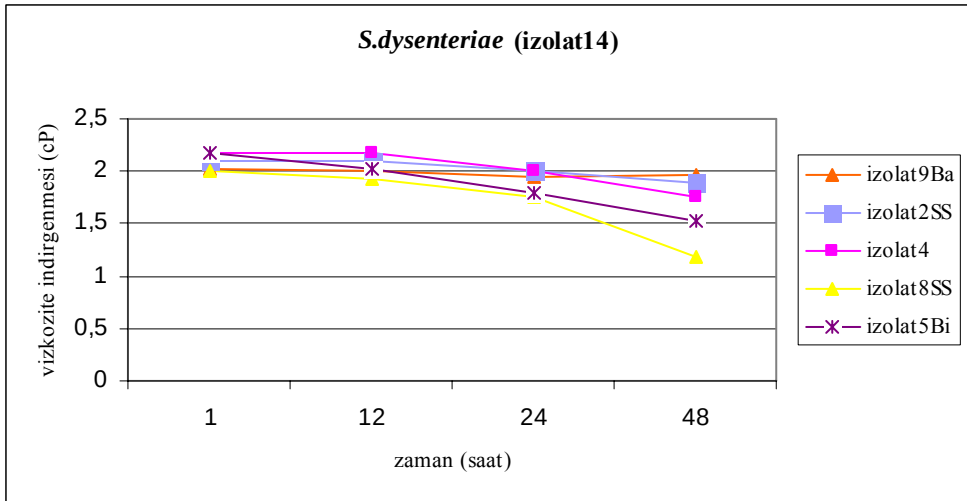


Şekil 3.37. *P. haemolytica* (izolat 21) EPS'si bulunan (%3lük) besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.

Çizelge 3.17. *S.dysenteriae* (izolat 14) EPS'si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkozite, vizkozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Vizkozite (cP)				Vizkozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	48.saat
<i>B.gladioli</i> (izolat 4)	2,18	2,18	2,01	1,75	0,00	7,80	19,72	3,4
<i>P. agglomerans</i> (izolat 9Ba)	2,02	2,01	1,95	1,96	0,50	3,47	2,97	3,2
<i>S. paucimobilis</i> (izolat 2SS)	2,09	2,09	2,00	1,89	0,00	4,31	9,57	2,1
<i>O.anthropi</i> (izolat 8SS)	2,00	1,92	1,75	1,18	4,00	12,50	41,00	5,4
<i>A.hydrophila</i> (izolat 5Bi)	2,17	2,02	1,80	1,53	6,91	17,05	29,49	4,6

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.

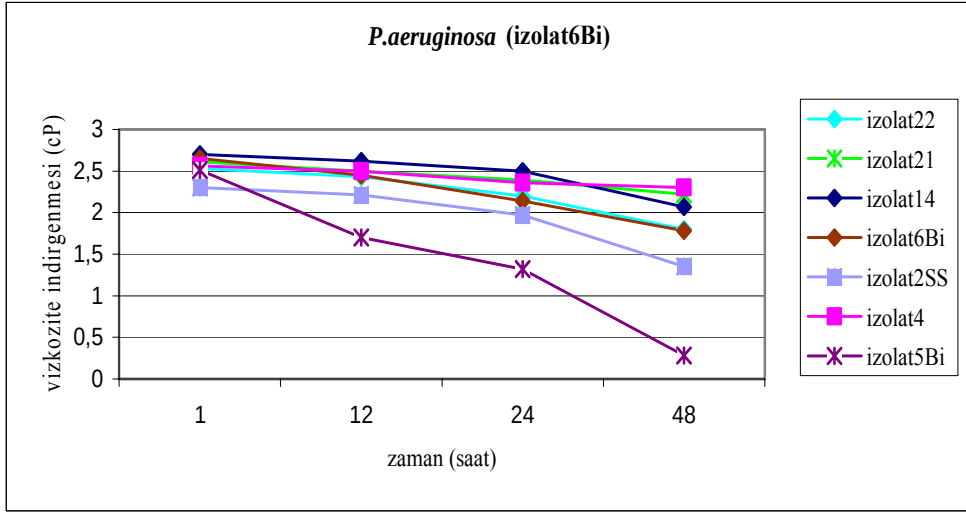


Şekil 3.38. *S.dysenteriae* (izolat 14) EPS'si bulunan (%3lük) besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.

Çizelge 3.18. *P.aeruginosa* (izolat 6Bi) EPS'si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkozite, vizkozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Vizkozite (cP)				Vizkozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	48.saat
<i>B.gladioli</i> (izolat 4)	2,56	2,50	2,36	2,30	2,34	7,81	10,16	2,2
<i>P. fluorescens</i> (izolat 22)	2,53	2,43	2,20	1,80	3,95	13,04	28,85	3,4
<i>P.aeruginosa</i> (izolat 6Bi)	2,65	2,45	2,14	1,78	7,55	19,25	32,83	4,4
<i>S.paucimobilis</i> (izolat 2SS)	2,30	2,21	1,97	1,35	3,91	14,35	41,30	4,8
<i>S.dysenteriae</i> (izolat 14)	2,70	2,62	2,50	2,07	2,96	7,41	23,30	2,9
<i>A. hydrophila</i> (izolat 5Bi)	2,51	1,70	1,32	0,28	19,71	28,95	54,26	6,7
<i>O.anthropi</i> (izolat 21)	2,61	2,50	2,39	2,22	4,21	8,43	14,94	3,5

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.

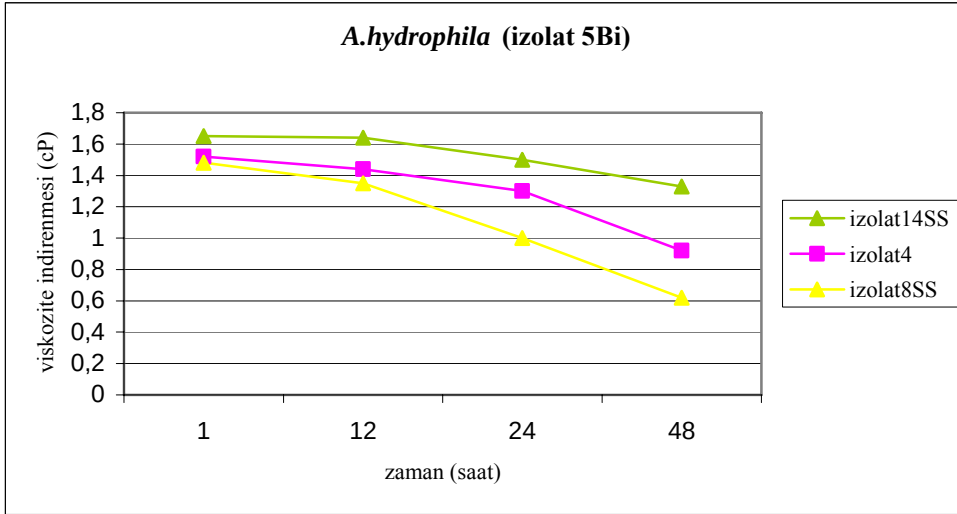


Şekil 3.39. *P.aeruginosa* (izolat 6Bi) EPS'si bulunan (%3lük) besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.

Çizelge 3.19. *A.hydrophila* (izolat 5Bi) EPS'si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkozite, vizkozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Vizkozite (cP)				Vizkozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	
<i>B.gladiali</i> (izolat 4)	1,52	1,44	1,30	0,92	5,26	14,47	39,47	4,6
<i>B. cepacia</i> (izolat 14SS)	1,65	1,64	1,50	1,33	0,61	9,09	19,40	6,5
<i>O.anthropi</i> (izolat 8SS)	1,48	1,35	1,00	0,62	8,78	32,43	58,11	3,0

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.

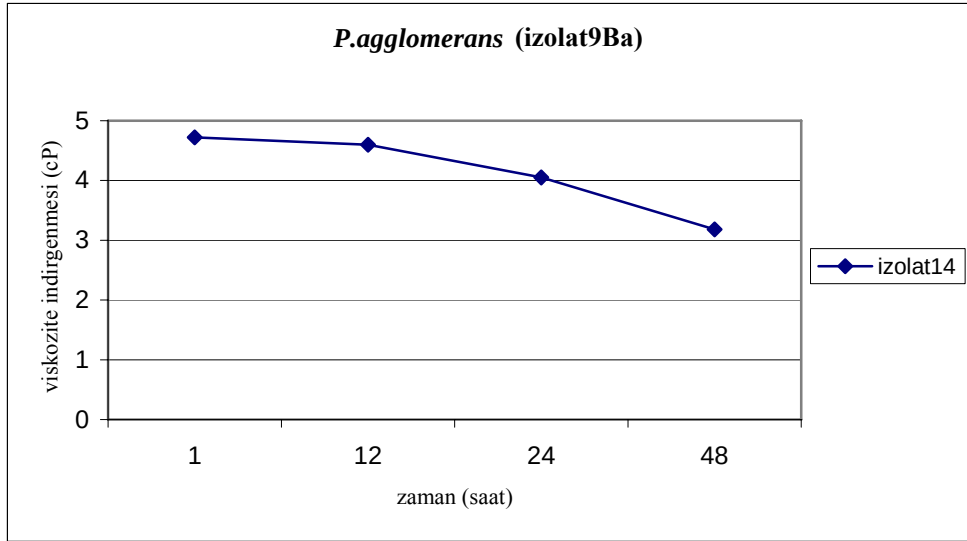


Şekil 3.40. *A. hydrophila* (izolat 5Bi) EPS'si bulunan (%3lük) besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.

Çizelge 3.20. *P.agglomerans* (izolat 9Ba) EPS'si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkozite, vizkozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Vizkozite (cP)				Vizkozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	48.saat
<i>S.dysenteriae</i> (izolat 14)	4,72	4,60	4,05	3,18	2,54	14,19	32,63	4,4

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.

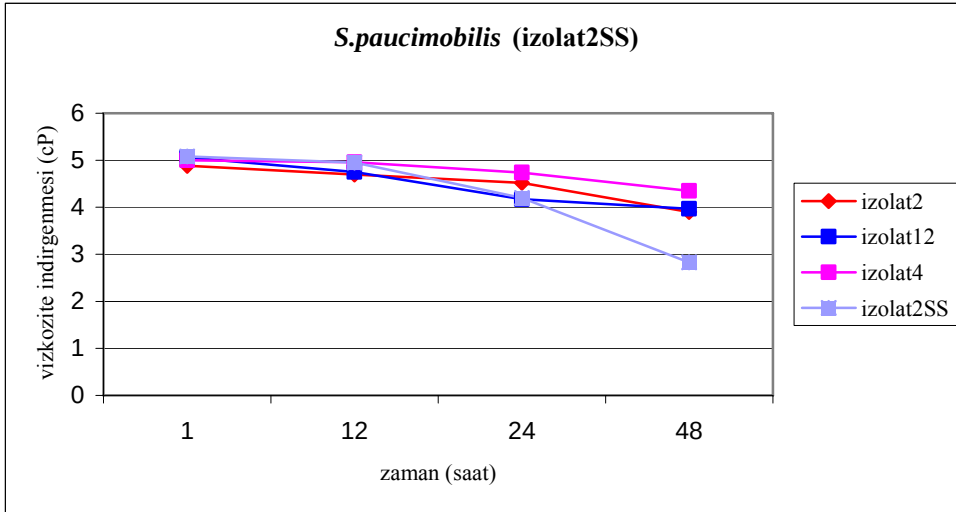


Şekil 3.41. *P.agglomerans* (izolat 9Ba) EPS'si bulunan (%3lük) besiyerinde *S.dysenteriae*.nin (izolat14) EPS'yi hidrolizi.

Çizelge 3.21. *S.paucimobilis* (izolat 2SS) EPS'si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkozite, vizkozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Vizkozite (cP)				Vizkozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	48.saat
<i>S. paucimobilis</i> (izolat 2SS)	5,08	4,95	4,20	2,83	2,56	17,33	44,29	6,8
<i>P. vulgaris</i> (izolat 2)	4,88	4,70	4,52	3,90	4,64	9,28	25,26	4,3
<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> (izolat 12)	5,06	4,75	4,17	3,97	7,64	21,92	26,85	2,5
<i>B. gladioli</i> (izolat 4)	5,00	4,96	4,74	4,35	0,80	5,20	13,00	5,2

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.

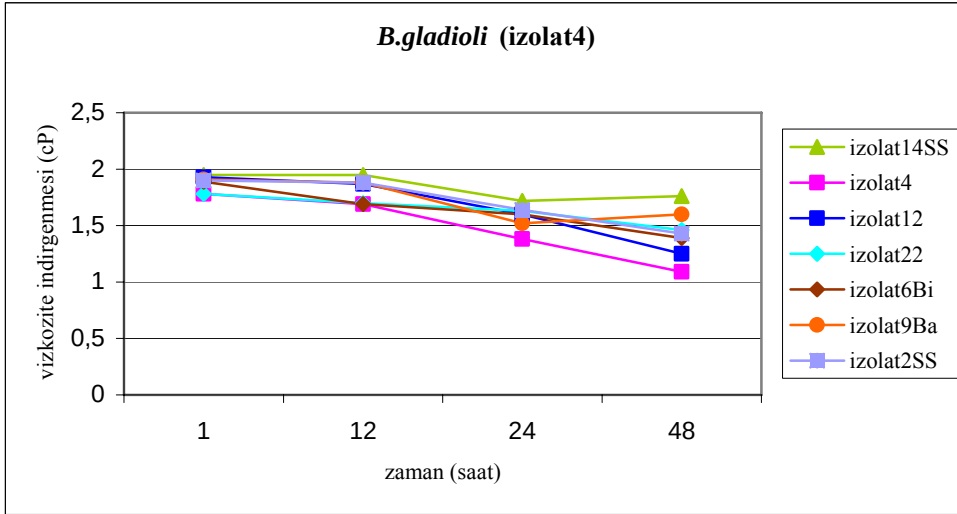


Şekil 3.42. *S.paucimobilis* (izolat 2SS) EPS'si bulunan (%3lük) besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.

Çizelge 3.22. *B.gladioli* (izolat 4) EPS'si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkozite, vizkozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Vizkozite (cP)				Vizkozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	48.saat
<i>B.gladioli</i> (izolat 4)	1,78	1,69	1,38	1,09	5,06	22,47	38,76	3,5
<i>P. fluorescens</i> (izolat 22)	1,78	1,70	1,63	1,46	4,49	8,43	17,98	4,9
<i>P.aeruginosa</i> (izolat 6Bi)	1,89	1,69	1,60	1,39	10,5 8	15,34	26,45	4,2
<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> (izolat 12)	1,93	1,87	1,60	1,25	3,11	17,10	35,23	5,5
<i>B. cepacia</i> (izolat 14SS)	1,95	1,95	1,72	1,76	0,00	11,79	9,74	3,1
<i>S.paucimobilis</i> (izolat 2SS)	1,90	1,88	1,64	1,43	1,05	13,68	24,74	6,0
<i>P.agglomerans</i> (izolat 9Ba)	1,91	1,88	1,52	1,60	1,57	20,42	16,23	4,5

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.

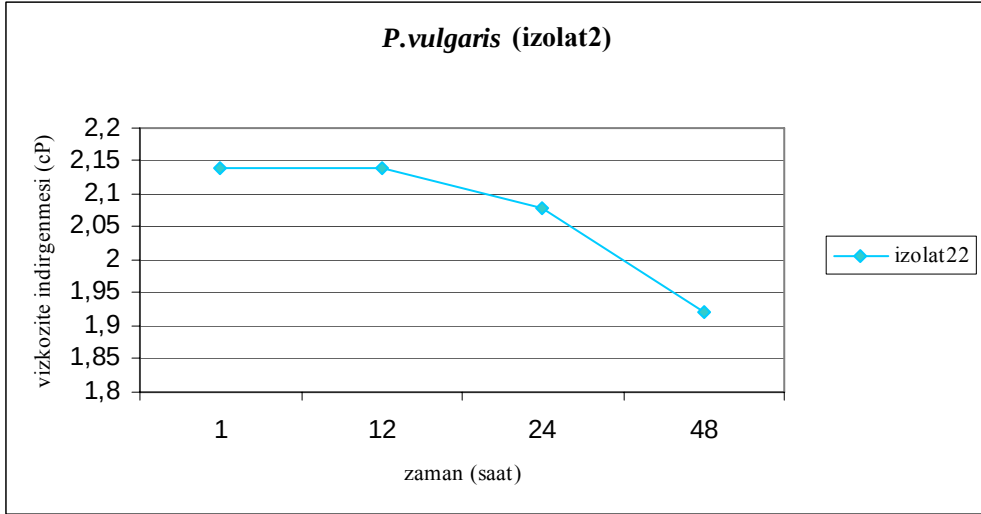


Şekil 3.43. *B. gladioli* (izolat 4) EPS'si bulunan (%3lük) besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.

Çizelge 3.23. *P. vulgaris* (izolat 2) EPS'si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkozite, vizkozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Vizkozite (cP)				Vizkozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	48. saat
<i>P. fluorescens</i> (izolat 22)	2,14	2,14	2,08	1,92	0,00	2,80	10,28	2,1

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.

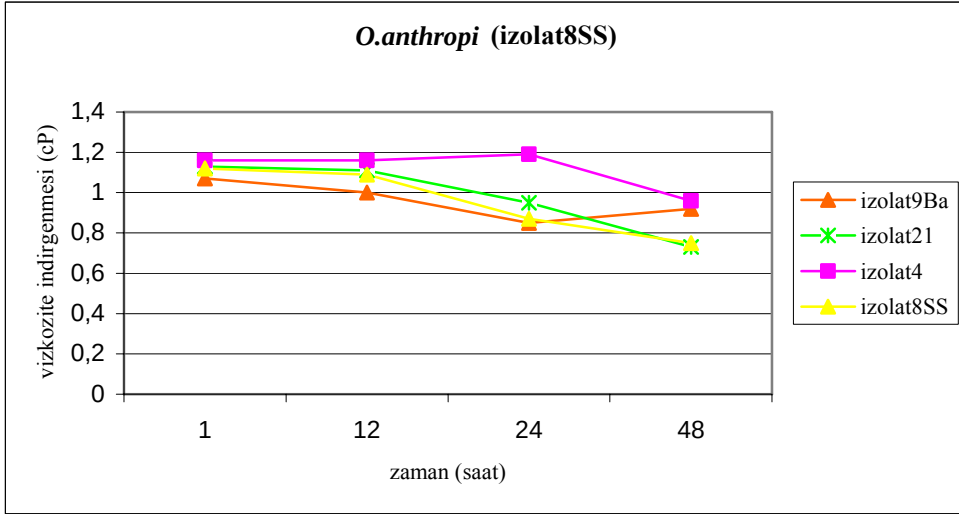


Şekil 3.44. *P.vulgaris* (izolat 2) EPS'si bulunan (%3lük) besiyerinde izolat 22'nin (*P.fluorescens*'in) EPS'yi hidrolizi.

Çizelge 3.24. *O.anthropi* (izolat 8SS) EPS'si ilave edilen (%3lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki viskozite, viskozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Viskozite (cP)				Viskozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	48.saat
<i>B.gladioli</i> (izolat 4)	1,16	1,16	1,19	0,96	0,00	-2,59	17,24	3,7
<i>P.agglomerans</i> (izolat 9Ba)	1,07	1,00	0,85	0,92	6,54	20,56	14,02	2,4
<i>Pasteurella sp.</i> (izolat 8SS)	1,12	1,09	0,87	0,75	2,68	22,32	33,03	4,9
<i>P.haemolytica</i> (izolat 21)	1,13	1,11	0,95	0,73	1,77	15,93	35,40	5,6

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.

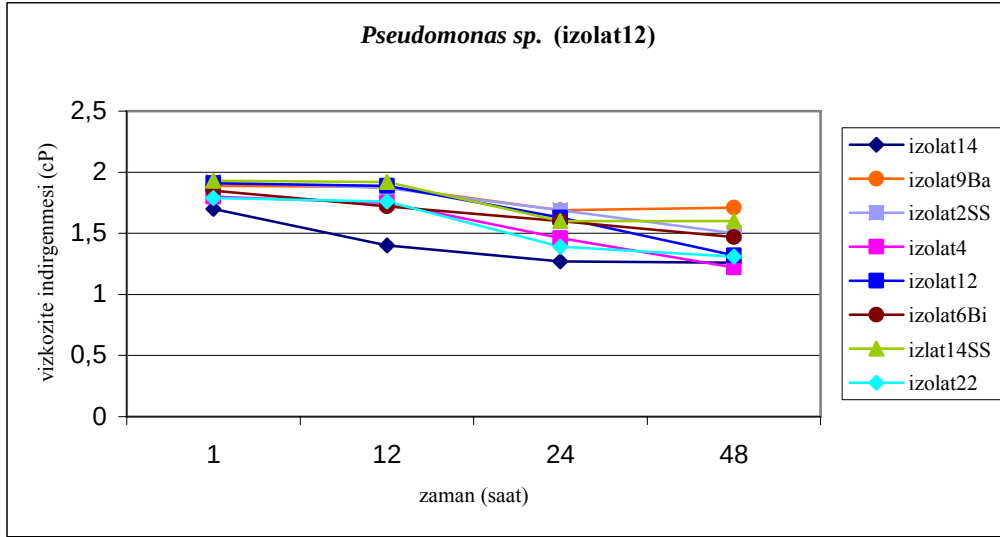


Şekil 3.45. *O.anthropi* (izolat 8SS) EPS'si bulunan (%3'lük) besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.

Çizelge 3.25. *Pseudomonas sp.* (izolat 12) EPS'si ilave edilen (%3'lük) besiyerinde bakterilerin büyütüldüğünde 1., 12., 24. ve 48. saatlerdeki vizkozite, vizkozite indirgenmesi (%) ve indirgenmiş şekerlerin %'si.*

Kültür filtratı (210µl)	Vizkozite (cP)				Vizkozite indirgenmesi (%)			İndirgenmiş şekerler (% substrat)
	1. saat	12. saat	24. saat	48. saat	12. saat	24. saat	48. saat	48.saat
<i>B.gladioli</i> (izolat 4)	1,80	1,75	1,46	1,22	2,77	18,88	32,22	3,6
<i>P.fluorescens</i> (izolat 22)	1,79	1,76	1,38	1,31	1,68	22,91	26,82	4,1
<i>P.aeruginosa</i> (izolat 6Bi)	1,85	1,72	1,60	1,47	7,03	13,51	20,54	3,8
<i>B. cepacia</i> (izolat 14SS)	1,93	1,92	1,60	1,60	0,52	17,10	17,10	2,9
<i>Pseudomonas sp.</i> (izolat 12)	1,91	1,89	1,63	1,32	1,05	14,66	30,89	5,6
<i>S.dysenteriae</i> (izolat 14)	1,75	1,40	1,27	1,26	20,00	27,43	28,00	5,2
<i>S.paucimobilis</i> (izolat 2SS)	1,92	1,87	1,69	1,50	2,60	11,98	21,88	3,0
<i>P.agglomerans</i> (izolat 9Ba)	1,89	1,88	1,69	1,71	0,53	10,58	9,52	4,2

* Tüm sonuçlar paralelli denemelerin ortalamalarıdır.



Şekil 3.46. *Pseudomonas* sp. (izolat 12) EPS'si bulunan (%3lük) besiyerinde bakterilerin EPS'yi hidrolizi.

4. TARTIŞMA

Hücre dışı polisakkarit (EPS) üreten mikroorganizmalar doğada birçok farklı habitatta oldukça yaygın bulunurlar. Tipik olarak toprakta, tatlısularda, deniz suyunda, enfekteli bitki materyalinde veya bozulmuş yiyeceklerde bulunabilirler. Aynı zamanda, birçok insan veya hayvan patojeni de polisakkaritleri sentezleme yeteneğindedirler. Bununla birlikte, doğal çevrelerden yeni strainlerin izolasyonundaki bir problem bu mikroorganizmaların büyüme gereksinimleri ve polisakkarit üretme kapasiteleri hakkında bilgi eksikliğidir. Herhangi bir ekolojik niş'e veya herhangi bir mikrobiyal türe göre genelleştirmek mümkün değildir.

Polisakkarit üreten mikroorganizmaların izolasyonu için özel bir seçici ortam olmamasına rağmen polisakkarit üretimi için genellikle C:N oranı yüksek ortamlar kullanılmaktadır (Duguid ve Wilkinson, 1953; Corpe, 1964). Besiyeri kompozisyonunun EPS üretiminde önemli bir yeri vardır ve EPS üretiminde özellikle C kaynağının teşvikleyici etkisi N kaynağından daha fazladır (Horan ve Eccles, 1986). İnkübasyon genellikle 20-30°C arasında yapılmaktadır. Glukoz, galaktoz ve sakkaroz mikrobiyal türlerin büyük bir kısmının EPS üretimi için yaygın olarak tercih edilen C kaynaklarıdır (Drevetton ve ark., 1994). Bunun nedeni, onların, EPS sentezinde aktive edici prekürsörler olarak önemli bir rol oynamasıdır (Fett ve ark., 1995). Çalışmada, izolasyon amacıyla C kaynağı olarak glukoz, sakkaroz ve galaktoz denenmiştir.

Bir C kaynağı olarak glukoz içeren ortamda, *P.putida* ve *P.fluorescens* glukoz, galaktoz ve piruvattan oluşan bir EPS sentezlemiştir (Read ve Costerton, 1987). Başka bir araştırmada, *S.paucimobilis* GS1; substrat olarak sakkaroz kullandığında; glukoz, glukuronik asit, galakturonik asit ve visköz EPS ürettiği

saptanmıştır (Ashtaputre ve Shah, 1995a). Pal ve ark. (1999) tarafından, *Azotobacter sp.* straininde EPS üretiminin besiyerindeki karbohidrat miktarı arttırıldığında meydana geldiği bildirilmiştir. *Pseudomonas* straini kullanılan diğer bir çalışmada ise, üretimin uygun C kaynaklarının varlığında arttığı rapor edilmiştir (Williams ve Wimpenny, 1977).

Çalışmamızda izolasyon amacıyla her ikisi de yüksek C:N oranlı Glukoz-Yeast Ekstrakt-Kazein Hidrolizatı (GYC) ve Slime Üretimini Teşvikleyici (ESP) ortamlar seçilmiştir. ESP ortamı izolat açısından daha fazla çeşitlilik göstermiştir. Buna karşılık GYC ortamı da organizmanın mukoid koloni oluşturmamasından dolayı, izolatların EPS üretilip üretilmediklerini anlamamıza yardımcı olmuştur. Her iki ortamda farklı fenotiplere sahip mukoid koloni oluşturan toplam 85 adet izolat elde edilmiştir. Tüm bu izolatların EPS verimleri ön taramadan geçirilmiş ve çalışma için en yüksek verime sahip 12 tanesi seçilmiştir. Seçilen 12 bakteri oldukça hızlı büyüme yeteneğine sahip olan yaklaşık 30-90 dakikada aralığında sayısını ikiye katlayan gram (-)'lerdir.

Son yıllarda moleküler tanı testlerinde hızlı gelişmeler olmuştur. Özellikle ribozomal RNA (rRNA) genlerini hedefleyen PCR'a dayalı teknikler yaygınlaşmıştır. Bu nedenle çalışmamızda kültürel ve biyokimyasal testlerle fenotipik karakterizasyonu yapılan izolatların moleküler yöntemlerle ileri tanılamaları gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmaların tayin çalışmalarında; DNA-DNA homolojisi, T_m (DNA'nın çift sarmalının çözülme sıcaklığı değeri) ve 16S rRNA'yı kodlayan DNA fragmentinin sekans dizisinin belirlenmesi bir hayli önem kazanmıştır (Cho ve Tiedje, 2001). Sekans dizisi belirlenirken nükleotid sayısının 1000-1500 arasında olması gerektiği bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarla elde edilen kıyaslama sağlanabilecek verilerin artması ve gen bankasının kullanımının yaygınlaşması ile günümüzde mikroorganizma

tanımlamalarının hemen hemen tümü 16S rRNA'yı kodlayan DNA fragmentinin sekans analizine dayanmaktadır (Lebuhn ve ark., 2000; Bello ve ark., 2001; Kelly ve Chistoserdov., 2001; Leung ve Topp, 2001; Aoi, 2002; Kwon ve ark, 2002; Rickard ve ark., 2002; Lee ve ark. 2003; Rättö ve ark., 2005; Song ve Leff, 2005; Ortega-Morales ve ark, 2007).

170 strainin tanımlanmasına yönelik yapılan bir çalışmada SDS-PAGE (sodium odecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), RAPD (random amplifiye polymorphic DNA) yöntemlerini kullanarak, 170 strainin 4 farklı tür yada genusa ait olduğunu belirlemişlerdir. 4 strainin tür tayinini ise 16S rRNA sekans analizi ile yapmışlardır. Bu da günümüzde tür tayininin esas olarak 16S rRNA sekans analizi ile yapıldığını göstermektedir (Liu ve Tay, 2001).

Kurahashi ve Yokota (2007), 16S rRNA'yı kodlayan gen bölgesinin sekans dizisine dayanarak *Endozoicomonas elysicola* türünü ve yeni bir genusu tanımlamışlardır. Schmidt ve ark. (2007) yeni bir genusu tanımladıkları çalışmada, 27F ve 1492R primerlerini kullanarak 16S rRNA'yı kodlayan gen bölgesini çoğaltmışlardır. Daha sonra sekans analizi yapılarak GenBank'da nükleotid Blast (Basic Local Alignment Search Tool) işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonucunda en yüksek benzerliği %93 oranı ile *Rheinheimera baltica* ile göstermiştir. Bu düşük benzerlik oranı nedeniyle yeni tür olduğu düşünülmüştür. İlave test ve incelemelerle yeni tür ve genus tanımlanmıştır. Bu çalışmada da görüldüğü gibi özellikle tür tayinindeki en belirleyici kriter 16S rRNA'yı kodlayan DNA sekans dizisinin saptanmasıdır.

Farklı universal primer setleri kullanılarak DNA'nın farklı kısımları amplifiye edilebilmektedir. Çalışmamızda değişik genoslara ait izolatlarla çalışıldığından, 16S rRNA'yı kodlayan DNA fragmentinin amplifikasyonu için 27F ve 1522R (Lee ve ark. 2003) universal primerler kullanılmıştır.

Biyofilmlerdeki EPS üreten bakterilerle yapılan tanılama çalışmalarında 27F ve 1518R (Kwon ve ark., 2002), 8F ve 806R (Rickard ve ark., 2002), 27F, 357F ve 1492R (Pratten ve ark., 2003), 27F ve 1492R (Tokajian ve Hashwa, 2004), 8F ve 1492R (Gonzalez ve ark., 2006) gibi diğer universal primerler ile de amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

McCabe ve ark. (1999) tarafından, universal bir primer çifti (8FPL ve 806R) ile DNA amplifikasyonundan sonra tür-spesifik problemlerle klinik izolatların tür identifikasyonu yapılmıştır. Sonuçta elde edilen, *P.mirabilis* GenBank'a 245420 numarası ile kaydedilmiştir. Yerleştirildikten sonra protez kalça aparatı yüzeyinde birikerek yangıya sebep olan bakteriler diğer bir çalışmada incelenmiş, 27F ve 1387R universal primerler kullanılarak PCR ardından 16S rRNA gen sekanslama sonucu bakteriyal genoslardan %8,7'si *Proteus* genusuna ait bulunmuştur (Dempsey ve ark., 2007). Bizim çalışmamızdaki izolatlarımızdan birinin, 16S rRNA gen sekanslama sonucu GenBank veri tabanı ile kıyaslandığında *P.vulgaris* ATCC 29905 straini ile %96 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.26). *Proteus sp.* türleri tarafından doğal ve endüstriyel su sistemlerinde, kateteler gibi yapay yüzeylerde biyofilm oluşturulduğu bilinmektedir (Alski ve ark., 1997).

Birçok çalışmada EPS üretici bakterilerin DNA ekstraksiyonları, hızlı ve oldukça yüksek saflıkta genomik DNA elde edilmesinden dolayı yaygın olarak çeşitli ticari kitlerle gerçekleştirilmiştir. AccuPrep genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (Bioneer) (Lee ve ark., 2003), UltraClean™ Toprak DNA İzolasyon Kiti (MoBio laboratuvarları, Solana Beach, CA), (Leung ve Topp, 2001), QIAamp® DNA Mini Kit-50, Qiagen (Emtiazi ve ark., 2004), Wizard Genomic DNA Saflaştırma Kiti (Promega) (Kwon ve ark., 2002) bunlardan bazılarıdır. Bizim çalışmamızda, ZR Fungal/Bakteriyal DNA Kiti (Zymo Research) kullanılarak

genomik DNA yüksek saflıkta elde edilmiştir. Öyle ki elde edilen DNA'ların A_{260}/A_{280} oranı spektrofotometrede incelendiğinde 1,8-2,1 civarında oldukları yani amplifikasyon için uygun kalitede oldukları (Çizelge 3.2) belirlenmiştir. Bu nedenle ve elektroforezde tek bant eldesi sonucunda incelenen DNA'lara herhangi bir kirlilik giderme işlemi uygulanmamıştır.

DNA'nın amplifikasyonu amacıyla, çalışmamızda kullanılan kit içerisinde (FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack Kiti-Roche) belirtilen PCR koşullarında, PCR sonrası elektroforezde en net ve temiz bantlar elde edilinceye kadar değişiklikler yapılmıştır. Ve böylece bakteriler için en iyi sonuçların elde edildiği koşullar belirlenmiştir. PCR ile elde ettiğimiz 1500bp'lik ürünlerin, mevcut sekanslama sistemi için uygun olduğu RefGen'den öğrenilmiş ve sekanslama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için yeterli ürünün sağlandığından emin olmak amacıyla PCR çevrimleri 35 kere tekrarlanmıştır. EPS üretici bakterilerle yapılan bazı çalışmalarda mikroorganizmaya ve seçilen bölgeye göre değişebilen PCR koşulları denenmiştir (Bello ve ark., 2001; Kwon ve ark, 2002; Lee ve ark. 2003; Pratten ve ark., 2003; Toivola ve ark., 2006).

Çalışmamızda 27F ve 1522R primerleri ile genomik DNA'dan çoğaltılan PCR ürünlerinin boyutu yaklaşık 1500bp olup, diğer farklı kaynaklardan izole edilen EPS üreten mikroorganizmalarla da benzer çalışmalar mevcuttur. Denizsel biyofilmlerden kökenli bakteriler (Kwon ve ark, 2002; Lee ve ark. 2003), petrol boru hatlarındaki biyofilmlerden kökenli bakteriler (Gonzalez ve ark., 2006), su dağıtım sisteminden izole edilmiş *Aeromonas sp.* (Tokajian ve Hashwa, 2004), ağız-içi bakteriyel biyofilmler (Pratten ve ark., 2003) ile yapılan çalışmalar bunlara örnektir. Hilario ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas* strainlerinde 16S rDNA'larının yaklaşık 1300bp'lik kısmını çoğaltarak sekanslamışlar ve GenBank'a kayıt ettirmişlerdir.

Başka bir çalışmada, klorlanmış su dağıtım sisteminden izole edilen çoklu antibiyotik dirençlilikleri saptanan *Aeromonas* türlerinin identifikasyonları bizim yaptığımız şekilde API 20NE ile fenotipik olarak, MicroSeq 500 16S rDNA sekans analizi ile genotipik olarak gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA sekansları, ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, USA) otomatik DNA sekansır ile analizi yapılmıştır. Sekanslar EMBL (FASTA versiyon 3.3t09)'dan elde edilen gen kütüphanesindeki 16S rDNA sekansları ile karşılaştırılmıştır (Tokajian ve Hashwa, 2004). *Aeromonas sp*'nin 16S rDNA sekansları ve onların kayıt numaraları yaklaşık 1200 database'lik GenBank'dan temin edilmiştir. Sonuçta 16S rDNA sekans homolojisi ile % 99 *A.hydrophila* strain 45/90 ve *A.caviae* ATCC 15468T, %98 *A.media* ATCC 33907T ve *A.veronii* clone 4, %96-97 *Aeromonas sp.* PAR3, *A.hydrophila* ATCC 7966T ve *A.veronii* ATCC 35624T olarak saptanmıştır. Çalışmamızdaki izolatlardan bir tanesi de GenBank'taki AY987754.1 kayıt numaralı *A.hydrophila* ATCC 49140'a %100 benzerlik göstermiştir (Şekil 3.18). Sularda *Aeromonas*'ın varlığı halk sağlığı açısından tehdit edici olup, potansiyel enteropatojenler olarak *Aeromonas* strainlerinin su sistemlerindeki varlığının mazur görülmemesi gerekmektedir. Bahsedilen çalışma ve bizim çalışma bulgularımıza göre, API 20NE identifikasyon kiti ve 16S rDNA gen sekans analizi ile şüpheli Aeromonad'ların identifikasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir (Tokajian ve Hashwa, 2004).

Çalışmamızda 12 izolattan birisinin *B.cepacia*, birisinin *B.gladioli*, birisinin de *Ochrobactrum anthropi* olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.4). Benzer olarak, Japonya'daki bir petrol hattındaki yığınların bakteriyal komuniteleri incelenmiş yapılan sekanslama sonucunda ağırlıklı olarak *B.cepacia* ve *Ochrobactrum sp.*'den oluştuğu tespit edilmiştir (Yoshida ve ark, 2005). Başka bir çalışmada, karasal mikroagregatlardan izole edilen 21 EPS üretici strain fenotipik olarak *B.cepacia* ve *B.glathei* olarak tanımlanmış ve filogenetik analizleri de

Beckman Genomiks DNA sekansır ile 16S rDNA (rrs) sekanslarının ve DNA-DNA hibridizasyon verilerinin belirlenmesiyle sağlanmıştır. Elde edilen sekanslar yaklaşık 7000 veri arasından taranmıştır. Sonuçta, *B.cepacia* ve *B.glathei*'ye ilave olarak *B.caribensis*'e ait strainlerin de bulunduğu ortaya çıkmıştır (Achouak ve ark., 1999). Levan tipte hücre dışı polisakkarit üreten laktobasillerin filogenetik tanılanmasında, bizim çalışmamıza benzer olarak elde edilen 16S rDNA sekansları Blast kullanılarak GenBank DNA veritabanları ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta, bakterilerin %100 *Bifidobacterium pseudoacetenum*, *B.ruminantium*, *Enterococcus durans*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus anginosus*, %99,5 *B.ruminantium*, *Eubacterium biforme* ve %95 *E.coli* ile benzerlik gösterdikleri bulunmuştur.

Korozyona uğramış petrol boru hatlarındaki biyofilmlerden yapılan bakteriyal diğer bir karakterizasyon çalışmasında izolatların, GenBank veritabanlarındaki *Enterobacter dissolvens* (accession no. Z96079) ile %100, *E.ludwigii* (AJ853891) ile %99,5, *Citrobacter amalonaticus* (AF025370) ile %99,8, *C.farmeri* (AF025371) ile %99,2, *Halanaerobium praevalens* (M59123) ile %99,2, *H.fermentum* (AB023308) ile %98,5, *H.congolense* (U76632) ile %97,7 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Gonzalez ve ark., 2006). İçme suyu üretim sisteminin farklı bölümlerindeki biyofilm populasyonlarının incelendiği başka bir çalışmada; 16S rDNA sekanslarının GenBank sekanslarıyla kıyaslanması sonucunda, %99 ile *Pseudomonas marginalis* (NZCX27), *Pseudomonas sp.* (C96E) ve β -*Proteobacterium* (UCTN117), %97 ile *Acidovorax sp.* (G8B1), %96 ile α -*Proteobacterium* (FL14F11)'a benzerlik saptanmıştır (Emtiazi ve ark., 2004).

API (Biomrieux,France) ve Vitek GNI+test kart (Biomrieux,Vitek) hızlı tanılama sistemleri *Burkholderia sp.* gibi çoğunlukla klinik kökenli izolatlar için

en iyi çalışırken, çevresel ve yavaş büyüyen bakteriler için daha az uygunluktur. Nitekim, API kitleri ile *B.cepacia* (izolat 14SS) ve *B.gladiali* (izolat 4) tür seviyesinde sırasıyla %99,5 ve %99,2'lik yüksek identifikasyon oranlarıyla sonuç vermiştir (Çizelge 3.2). 16S rRNA gen sekanslama yöntemi ise bakteriyal identifikasyon ve yeni türlerin tayininde hem çevresel hem klinik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Song ve Leff, 2005). Bununla birlikte, GenBank veritabanları ile karşılaştırılarak yüksek tanılama oranları elde edilmektedir. Bu nedenlerden ötürü, 16S rRNA sekanslama ile API, Vitek GNI+test kart, Biolog mikropate (Biolog, Inc., California) gibi fenotipik tanılama sistemlerinin kontrolü ve doğrulaması yapılmalıdır (Kwon ve ark., 2002; Lagatolla ve ark., 2002; Tokajian ve Hashwa, 2004; Rättö ve ark., 2005; Song ve Leff, 2005). Lagatolla ve ark. (2002) tarafından klinik örneklerden izole edilen EPS üretici 7 *B.cepacia*'nın API 20NE kullanılarak biyokimyasal tanınması yapılmış, bulgular PCR temelli analizler olan Random Amplifikasyon Polimorfik DNA (RAPD) tiplendirme ve ribotyping ile doğrulanmıştır.

Petrol deposuna ait su yolundan izole edilen slime-üretici 2 bakterinin, çalışmamıza benzer olarak önce Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'e göre yapılan fizyolojik karakterizasyonu sonucunda *Pseudomonas* genusu üyeleri oldukları, daha sonra 16S rRNA sekansına göre yapılan filogenetik analiz sonucunda ise *P.putida* strain mt-2 ve *P.fluorescens* strain B62'ye yüksek oranlarda benzerlik gösterdikleri saptanmıştır (Hino ve ark., 1997).

Tatlı su biyofilmlerinden izole edilen strainlerin, FASTA3 programı ile EMBL 16S rRNA sekans veritabanı taranarak 2'sinin *P.marcusii*'ye %99,84 ve *Pseudomonas sp.*'ye %99,07 benzerlik gösterdiği, 5 tanesinin de %99,51, %98,39, %96,94, %96,76 ve %99,51 benzerlik oranlarıyla farklı accession numaralarına sahip *Sphingomonas sp.* oldukları tespit edilmiştir (Rickard ve ark.,

2002). Benzer olarak, soğutma suyu kule biyofilmlerinden elde ettiğimiz yüksek EPS üreticilerinden olduğunu bulduğumuz izolata, fenotipik tanılama sonucu *S.paucimobilis* olarak belirlenen izolat 2SS'in genotipik tanılama sonunda GenBank D16144.1 accession numaralı *S.paucimobilis*'e %98 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.17).

Yapılan tüm kültürel, biyokimyasal ve moleküler tanılamalar sonucu çalışmamızdaki 12 izolata 3'ünün *Pseudomonas* genusuna ait olduğu dikkat çekmiştir. Bu genus üyesi bakterilerin topraklar, tatlı veya deniz suyu, klinik örnekler, gıda endüstrisi ve atıkları, meyveler, sebzeler, hastalıklı bitkiler ve hayvanlar gibi daha birçok değişik materyal ve ortamlarda yayılım gösterdikleri bilinmektedir (Kluyver, 1956). Doğada ksenobiyotiklerin parçalanmasında potansiyel yeteneğe sahip türler yanında sadece bitkilerde hastalık etmeni fitopatogenik türler ile insanlar için öldürücü sonuçlar doğuran patojenik olanları da mevcuttur. Mesela, KF'de akciğer fonksiyonlarının bozulmasından primer olarak soumlu tutulan *P.aeruginosa* solunum yolu mukozasına yerleştikten bir süre sonra mukoid fenotipe dönüşmektedir. Bu durum mukoid EPS üretimine bağlı olup biyofilm matriks oluşumuna neden olur. Bu biyofilm aynı zamanda çoğu antimikrobiyal ajan için polianyonik bir bariyer oluşturmakta böylece ilaç direnci geliştirmektedir (Dinwiddie, 2000). Çalışmada ayrıca, yakın bir geçmişe kadar *Pseudomonas* genusundan ayrılan (Yabuuchi ve ark, 1992) *Burkholderia* ve *Sphingomonas* genuslarına ait bakterilere de rastlanmıştır. Bu genuslar dışında; 1 tane *Pasteurella*, 1 tane *Aeromonas*, 1 tane *Pantoea*, 1 tane *Ochrobactrum*, 1 tane *Proteus* ve 1 tane *Shigella* genusuna ait bakteri tanılanmıştır (Çizelge 3.4). Çeşitli kaynaklardan izole edilmiş bu genus üyelerinin slime-layer olarak da bilinen EPS oluşturduğu değişik çalışmalarda bildirilmiştir (Burke ve Gracey 1986; Kiredjian ve ark.,1986; Sutherland ve Kennedy, 1996; Vandamme ve ark., 1997; Hsueh ve ark., 1998; Dinwiddie, 2000; Zhao ve ark.,

2007). Literatürlerde ve yapılan yayın taramalarında soğutma suyu kulesi orijinli EPS üretici biyofilm oluşturabilen mikroorganizmalara dair az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Oysa ki EPS üretebilen mikroorganizmaların bu özellikleri sayesinde kule cidarlarında ve filtre sistemlerinde biyofilm oluşturarak biyofauling'e neden olması önemlidir (Turetgen ve ark., 2004; Turetgen, 2005).

EPS; oksijen, mineraller, C ve N gibi besinlerin kontrollü koşulları altında, mikroorganizmaların bir kısmı tarafından, büyümenin özellikle durgunluk fazında üretilen bir materyaldir. Her mikroorganizma için üretim koşulları aynı olmayacağından dolayı, çalışmamızda glukoz, sakkaroz ve galaktozun orijinal izolasyon ortamlarındaki (ESP) konsantrasyonu olan %0,85 miktarında temel ortama ilave edilerek EPS verimleri incelenmiştir.

Çalışmamızda 30°C'de 5 günlük fermentasyon sonucunda, 12 izolattan 7 tanesinin glukoz ve 5 tanesinin sakkaroz ilaveli ortamda en yüksek EPS miktarına ulaşılmış, galaktoz ilaveli ortamda ise hiçbir izolatın EPS verimi en yüksek olarak bulunmamıştır. Hatta 22, 14, 6Bi ve 12 nolu izolatların %0,85 galaktoz ilavesinde hiç EPS üretmediği görülmüştür. Endüstriyel çapta EPS üretiminde ise tarımsal ve diğer bitkisel materyallerin işlenmesinden ortaya çıkan yan ürünler gibi kompleks ürünler de kullanılmaktadır (Sutherland, 1993).

Mikrobiyal polisakkaritlerin yapı, kompozisyon ve vizkozitesi; kültür ortamı, C ve N kaynağı, mineral tuzlar, iz elementler, bakteri türü ve fermentasyon koşulları (pH, sıcaklık, oksijen konsantrasyonu, çalkalama) gibi birtakım faktörlere bağlıdır (Weuster-Botz, 2000). Bizim çalışmamızda, %0,85'lik glukoz ilavesinden en yüksek EPS verimi (%47,00) izolat 14SS (*B.cepacia*) ile aynı ortamda en düşük EPS verimi (%14,57) ise izolat 2SS (*S.paucimobilis*) ile elde edilmiştir. C kaynağı olarak sakkaroz ilave edilmiş ortamlarda en yüksek verim (%31,01) izolat 22 (*P.fluorescens*), en düşük verim

(%16,27) ise izolat 8SS (*O.anthropi*) ile sağlanmıştır. Çalışmada bazı izolatların aynı genoslara ait olmalarına bağlı olarak EPS üretim verimlerinin birbirleriyle tamamen paralel olmadığı belirlenmiştir. Bunun nedeninin biyofilmdeki bakterilerin fizyolojik ve genotipik değişikliklere uğraması olarak bildirilmektedir (Watnick ve Kolter, 2000; Donlan, 2001).

Bir çalışmada, bakteriyal hücreler 30°C’de 4-5 gün mannitol içeren YEM ortamında (2g/yeast extract, 20g/l mannitol) üretilerek EPS’nin izolasyonu ve saflaştırılması yapılmıştır (Herasimenka ve ark., 2007). Bello ve ark., (2001), *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH 1729’dan EPS 1729 ve *L.sanfranciscensis* LTH 2590’dan EPS 2590’ı; 30°C’de 24 saat 20g sakkaroz, 10g tripton, 7g yeast extract, 2g beef extract, 1ml tween-80 ve iz tuzlar içeren besiyerinde üretmişlerdir. *Enterobacter sp.* ile yapılan bir denemede, tek C kaynağı olarak 40g/l sakkaroz bulunan ortamda, 30°C’de 3 gün inkübasyon sonunda, ramnoz, mannoz, glukoz, fukoz, glukuronik asit ve galakturonik asit şeker içeriğinden oluşan bir hücre dışı materyal elde edilmiştir (Shimada ve ark., 1997). Slime oluşturucu *Lactobacillus casei sp. casei* strain CG11’in 25°C’de 48 saatte elde edilen EPS’sinin %2’lik glukozlu ortamda; %55,1 glukoz, %43,2 galaktoz, %1,7 mannoz, %2 sakkarozlu ortamda; %54,6 glukoz, %43,7 galaktoz, %1,7 mannoz monosakkarit içeriklerine sahip olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada, glukozlu ortamda 145mg EPS/l elde edilirken sakkarozlu ortamda 195mg EPS/l elde edilmiştir (Cerning ve ark., 1992). Karıştırmalı bir fermentörde 28°C’de 48 saatte sakkarozla zenginleştirilmiş ortamda *Aureobasidium pullulans*’ın pullulan verimi %50, maksimum pullulan miktarı 49g/l, biyomas kuru ağırlığı 25g/l olarak bildirilmiştir (Lazaridou ve ark., 2002). Bizim çalışmamızda maksimum EPS verimi %47,00 olup elde edildiği biyomasın hücre kuru ağırlığı 10,53g/l’dir. Başka bir çalışmada, *Rhodotorula rubra* ve yoğurt bakterileri olan *Streptococcus thermophilus* 13a ile *Lactobacillus bulgaricus* 2-11’den oluşan karışık kültürün

fermentör koşullarında en yüksek EPS sentezine (19,3g/l) 28°C’de 84 saatte, 21,0g/l hücre biyoması ile ulaştığı görülmüştür. Aynı çalışmada, elde edilen EPS’nin şeker içeriği; başlıca mannoz (%80 oranında), daha sonra sırayla glukoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdur (Simova ve ark., 2004).

Bonet ve ark., 1993, *Aeromonas salmonicida* bakterisini yeast-ekstrakte-pepton-glukoz mineral tuz ortamında 0-20 g/l arasında değişen konsantrasyonlarda glukozu denemiş ve en iyi bakteri verimi ile EPS veriminin 15g/l glukoz konsantrasyonunda gerçekleştiğini vurgulamışlardır.

Kwon ve ark. (1994), halofilik *Zooglea* türlerinin kültür ortamında %3-5 konsantrasyonda glukoz ve sakkaroz bulunması durumunda bu organizmanın en yüksek verimde ksantan sakızını ürettiğini; Souw ve Demain (1979), ise *Xanthomonas campestris* NRRL-B 1459 tarafından ksantan üretimi için en yüksek verimin %4 glukozlu ve sakkarozlu ortamdan alındığını beirtmişlerdir.

Başka bir çalışmada, *P.putida* ve *P.flourescens*’e C kaynağı olarak fruktoz ve glukozun, hücre verimi ve EPS verimine etkisi araştırılmıştır. *P.putida*’nın fruktoz ve glukozlu ortamda büyütülmesi sonucunda EPS verimi değişmezken hücre veriminin glukozlu ortamda daha düşük olduğu, *P.flourescens*’de ise glukozu ortamda hücre verimi ve EPS üretiminin daha fazla olduğu saptanmıştır (Conti ve ark., 1994). Fett ve ark. (1989), başlıca C kaynağı olarak sakkaroz kullanıldığında *P.flourescens*’in asidik bir EPS’den ziyade nötral bir polimer olan levan ürettiğini; C kaynağı olarak glukonat kullanıldığında, temel bileşimi glukuronat ve asetat olan aljinat üretimini desteklediğini tespit etmişlerdir.

Cerning ve ark. (1994), *Lactobacillus casei* CG11’in EPS verimi üzerine C kaynağı etkisini araştırmışlar; bu amaçla glukoz, galaktoz, laktoz, sakkaroz, maltoz ve mellibiyozun çeşitli konsantrasyonlarını denemişler; en yüksek EPS

üretimini 20g/l glukoz konsantrasyonu ve 20g/l mellibiyoz konsantrasyonunda olduğunu, maltoz, sakkaroz ve galaktozda bu oranın giderek düştüğünü bulmuşlardır.

Çalışmamızda, aynı genus üyesi izolat 14SS ve izolat 4'ün NB+%0,85 glukozlu ortamda en yüksek EPS verimleri elde edilmiştir (Çizelge 3.7). Fakat izolat 14SS'de %47,0'lik çok daha yüksek EPS verimi daha az (10,53g/l) hücre ile elde edilmişken, izolat 4'de %14,6'lık daha düşük EPS verimi 11,75g/l gibi daha yüksek hücre ile elde edilmiştir. Bunun nedeni, %0,85'lik glukozun izolat 4'de daha çok hücre büyümesini teşvik ederken, izolat 14SS'de ise daha çok EPS üretimini teşvik etmesidir.

Krom direçliliğine sahip *P.aeruginosa* ve *Ochrobactrum sp.* ile yapılan bir araştırmada, 50mg/l Cr(IV)'lu ortamda en yüksek EPS üretimi 20°C'de 96h inkübasyonda *P.aeruginosa* ile (863,3mg/l), daha sonra *Ochrobactrum sp.* ile 150mg/l Cr (IV)'lu ortamda 30°C'de 48h'de (430,5 mg/l) elde edilmiştir (Kılıç ve Dönmez, 2007). Çalışmamızda ise, *P.aeruginosa* (izolat 6Bi) ve *Ochrobactrum anthropi* (izolat 8SS) tarafından sırasıyla 1,69 g/l ve 2,00 g/l EPS üretilmiştir.

Çalışmamızdaki EPS'lerin genel olarak başlıca glukoz içerdiği, diğer şekerleri de farklı oranlarda içerdiği belirlenmiştir. EPS'lerdeki tanımlanabilen diğer şekerler galaktoz, mannoz, arabinoz, fruktoz, ramnoz ve ribozdur. Benzer sonuçlar Royan ve ark. (1999) tarafından da bulunmuştur. Araştırmacılar kullandıkları çeşitli *Pseudomonas* strainlerinden elde ettikleri hücre dışı polisakkaritlerde başlıca şeker olarak glukoz, galaktoz, mannoz ve ramnozu bulmuşlardır. Benzer şeker kompozisyonları 0.5 N H₂SO₄ ile hidrolizinden sonra *P.fluorescens* E-91439 hücre dışı materyalinde de tespit edilmiştir (Rättö ve ark., 2001). Çalışmamızdaki *Burkholderia* strainleri (*B.cepacia* and *B.gladioli*) tarafından üretilen EPS'lerde başlıca içerik galaktoz, glukoz, mannoz, arabinoz,

rhamnoz ve ribozdur. Kağıt işleme tesislerinden izole edilen *B.cepacia* and *B.pickettii* strainlerinin EPS'lerinin ise arabinoz ve riboz dışındaki diğer aynı şeker içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir (Lindberg ve ark., 2001). Lindberg ve ark.(2001), üretilen EPS kompozisyonunun mikrobiyal türler ve onların izolasyon kaynaklarına göre değişim gösterdiğini bildirmişlerdir. Bazen farklı mikrobiyal genusların benzer EPS'ler ürettikleri de bildirilmiştir. Örneğin, aljinat *P.aeruginosa* ve *Azotobacter vinelandii*'den elde edilen bir EPS'dir, fakat onların ürettikleri aljinatlar içerik olarak farklılıklar göstermektedir. Bu durum, C2 ve C3 hidroksil kısımları üzerindeki asetil gruplarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır (Schenker ve ark., 1997).

P.vulgaris (ATCC 49990) tarafından üretilen polisakkarit materyalinin 2:1:1 oranında galaktoz:glukoz:pirüvik asit içerdiği yapılan NMR (nuclear magnetic resonance) analizleriyle bulunmuştur (Perry ve MacLean, 1994). Bizim çalışmamızda, HPLC ile *P.vulgaris* (izolat 2) EPS'sinde glukoz (%30), ramnoz (%23,2), mannoz (%20,2), arabinoz (%11,0), galaktoz (%9,0), riboz (%4,9) ve fruktoz (%1,7) belirlenmiştir (Çizelge 3.11).

Lactobacillus reuteri LB121 hücreleri tek C kaynağı sakkarozlu ortamda büyütüldüğünde moleküler ağırlıkları sırasıyla 3,500 ve 150kDa olan bir gluklan (D-glukoz) ve bir fruktan (D-fruktoz)'dan fazla miktarlarda üretmiştir. Yapılan metilasyon ve NMR çalışmaları fruktanın; (2→6)-β-D-fruktofuranan veya levan olduğunu ortaya koymuştur (Van Geel-Schutten ve ark., 1999). Fermente süt ürünlerinden izole edilen 13 adet laktik asit bakterisinin EPS üretimlerinin 181-814 mg/l arasında değiştiği, HPLC ile yapılan monomer analizleri sonucunda, farklı bakteriyel genuslar olmasına karşın bizim çalışma bulgularımıza benzer şekilde, glukoz ve galatozun başlıca içerik olduğu görülmüştür (Savadogo ve ark., 2004). *Rhizobium trifolii*'nin temel mineral ortamına sırasıyla 15, 30 ve

50g/l mannitol ilavesi ile en yüksek EPS üretimi 50g/l olarak elde edilmiştir (Stredansky ve ark., 1999). Lo ve ark. tarafından (1997), *X.campestris*'in 25g/l glukoz ilave elden besiyerinde 21,3 g/l ksantan ürettiğini bildirilmiştir. Ksantan biyosentezi yüksek şeker, kısıtlı besin içeriği isteyen bir prosestir. Yüksek N kaynağı miktarı ortamda sınırlayıcı olarak iş görür. Bunun yanında durgunluk fazındaki hücre yoğunluğu da N kaynaklarından etkilenmektedir. Yüksek miktardaki C kaynağının EPS üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Yine durgunluk fazdaki ksantan üretim miktarı baştaki N kaynağı miktarından da etkilenmektedir. Bugün için, diğer EPS'lerin biyosentezinin aydınlatılmasında ksantan bir model oluşturmaktadır. EPS biyosentezi, fermentasyonda, hücre üretim aşamasından (trofofazdan) sonraki idiyofaz'da gerçekleşmektedir. Uygun şeker seçimi; daha hızlı bir fermentasyon prosesi ve daha yüksek EPS verimi sağlamaktadır (Lo ve ark., 1997). Öyle ki, *L.delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772, temel mineral ortamına tek C kaynağı olarak fruktoz ilavesiyle 30mg/l EPS üretirken, glukoz ilavesiyle üretim 95mg/l'ye çıkmıştır (Grobben ve ark., 1997).

Çeşitli bakterilerden elde edilen EPS'lerde en sıklıkla glukoz ve galaktoz (Cerning ve ark., 1992; Savadogo ve ark., 2004), az olarak ramnoz (Cerning ve ark., 1992; Grobben ve ark., 1997), mannoz (Petit ve ark., 1991), fruktoz (Manca de Nadra ve ark., 1985), arabinoz ve ksiloz (Cerning ve ark., 1992)'un veya N-asetilgalaktosamin (Petit ve ark., 1991), N-asetilglukozamin (Cerning ve ark., 1994) gibi şeker türevlerinin varlığı rapor edilmiştir. Buna göre, bizim çalışmamızda bazı EPS'lerdeki (izolat 14SS, 22, 14, 6Bi, 9Ba, 2SS, 4, 8SS, 12'ye ait) tanımlanmayan şeker içeriğinin muhtemelen şeker türevleri ve diğer olası şekerlerden oluştuğu düşünülmektedir.

Başka bir çalışmada, *P.aeruginosa* G1 ve *P.putida* G12 strainleri %2 gliserol ilaveli *Pseudomonas* Agar P besiyerinde sırasıyla 192±4mg/l ve

182±3mg/l EPS üretmiştir. Gliserol yerine kompleks C kaynağı olarak melas kullanıldığında daha yüksek EPS verimleri elde edilmiştir (367-397±1mg/l). *P.syringae p.v. glyciea* 2159 ve K1 strainlerinin üretim miktarları ise sırasıyla 287mg/l ve 80mg/l'dir (Fishman ve ark., 1997). Çalışmamızda, *Pseudomonas* türleri olan (izolat 12, 22, 6Bi) ile sırasıyla NB+glukoz, NB+ sakkaroz, NB+sakkaroz'lu ortamlarda elde edilen verimin daha yüksek olduğu 1,68-3,07g/l arasında değiştiği saptanmıştır (Çizelge 3.7). Fett ve ark. (1995) tarafından, *P.fluorescens*, *P.gingeri*, *P.putida*, *P.reactans* türlerini içeren fluorescent *Pseudomonas*'lar ile %5 gliserollü *Pseudomonas* ortamında 20-28 °C'de 2-3 gün inkübasyonla 7-79mg/l değişik tiplerde EPS üretilmiştir

C kaynağı olarak çözünür nişasta (20g/l) ve N kaynağı olarak tripton (%0,5w/v) ilave edilmiş temel tuz ortamında *S.paucimobilis* ATCC 31461 ile 20 saatlik inokulumdan %10 oranında aşılandığında 35,7g/l maksimum jelan verimi elde edilmiştir (Nampoothiri ve ark., 2003). Durma fazında jelan üretimi devam etse de, eksponansiyel üreme fazı boyunca gerçekleşen üretim hızından daha yavaş olmaktadır (Nampoothiri ve ark., 2003). Hücre dışı bir polisakkarit olan jelan, hücrelerin dış kısmında matriks şeklinde bulunduğundan dolayı besiyerinde hücrelerin hareketini, ortamla alış-verişini ve oksijen transferini sınırlar. Jelanın sentezi hücre çoğalması ile ilişkilidir ve hücre büyümesinin sınırlanmasıyla indirgenir (Drevet ve ark., 1994; Nampoothiri ve ark., 2003). Çalışmamızdaki, *S.paucimobilis* (izolat 2SS)'in NB+%0,85 glukoz'lu fermentasyon ortamında 30°C'de 5 günde elde edilen 11,67 (g/l) hücreleri ile %14,57'lik EPS verimi sağlanmıştır (Çizelge 3.7).

EPS'ler hücre yüzeyine sıkıca bağlı olup hücreden ayrılmaları için daha özel ekstaksiyon işlemlerine gerek vardır (Royan ve ark., 1999). Bu amaçla, mikroorganizmaların ürettiği EPS miktarını belirlemede EPS'nin izolasyonu

amacıyla alkolde presipitatlaştırılan polisakkaritin toplanması için 200 μ m'lik bir naylon mesh (Horan ve ark., 1988) veya 0,45 μ m'lik bir membran filtre (Anton ve ark., 1988) kullanılmakta veya küçük devirli bir santrifüjde toplanmaktadır (Fett ve ark., 1989; Ford ve ark., 1991). Denemelerimizde alkolde presipitatlaştırılan polisakkarit, kaybı daha az olan yöntemle, yani küçük devirli bir santrifüj kullanılarak toplanmıştır.

Araştırmacıların çoğu santrifüjden sonra elde edilen süpernatantı ya alkol yada aseton gibi maddelerle presipite etmeden önce (Anton ve ark.,1988) veya presipite ettikten sonra (Allison ve Sutherland, 1987; Horan ve ark., 1988; Fett ve ark., 1989; Manzoni ve ark., 1996; Bello ve ark. 2001) diyaliz etmişlerdir. Çalışmamızda, moleküler ağırlığı 12000'den büyük protein ve polisakkaritler gibi yüksek moleküler ağırlığa sahip bileşikleri tutan diyaliz torbası kullanılarak presipite edilen EPS 20ml bidistile suda çözündürülerek 48 saat birkaç kez distile suya karşı diyaliz edilmiştir.

Ekstraksiyon ve diyaliz sonrasında elde edilen ham polisakkariti kurutmak için vakum desikatör (Horan ve ark., 1988; Kim ve ark., 1994; Watanabe ve ark. 1999), 110°C'de kurutma (Anton ve ark.,1988) veya liyofilizasyon (Fett ve ark., 1989; Cerning ve ark., 1992; Conti ve ark., 1994; Bello ve ark. 2001) yöntemleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda ürün kaybı, kararma ve yapışmanın olmadığı liyofilizasyon (-55°C'de vakum altında) yöntemi tercih edilmiş, ekstrakte ve diyaliz edilen EPS materyalleri bu yolla kurutulmuştur.

Kurutulan EPS'nin hidrolizi için çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. 100°C'de 1M H₂SO₄ ile 20 saat veya 2M trifloroasetik asit (TFA) ile 4 saat (Horan ve ark., 1988), 100°C'de 1N HCl ile 4 saat (Anton ve ark.,1988), 100°C'de 1ml 2M TFA ile 1,5, 5 veya 10 saat (Shimada ve ark., 1997), 100°C'de 1N HCl ile 45 dakika (Farrah ve Unz, 1976) veya 100°C'de 0,25M H₂SO₄ ile 16

saat (Sutherland, 1996a), 95°C’de 0,1M H₂SO₄ ile 3 saat (Fett ve ark., 1989) hidroliz edilmekte ve genellikle doymuş Ba(OH)₂ yada BaCO₃ ile nötralize edilmektedir. Denemelerimizde liyofilizasyon yöntemiyle kurutulan EPS Horan ve ark’a (1988) göre 100°C’de 1M H₂SO₄ ile 20 saat hidroliz edildikten sonra doymuş Ba(OH)₂ ile nötralize edilmiştir.

Lazarova ve Manem (1995), EPS’nin analizi amacıyla, biyofilmdeki başlıca komponentler olan karbohidratlar ve proteinlerin saptanmasını önermişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda EPS materyallerinin şeker ve protein içerikleri araştırılmıştır. Karbohidrat miktar tayininde kullanılan en yaygın yöntem Dubois ve arkadaşlarının (1956) spektrofotometrik fenol sülfürik asit yöntemi, protein miktar tayininde Bradford tarafından geliştirilen Coomassie Brilliant Blue yöntemidir (Bradford, 1976). Çalışmamızda EPS’nin şeker ve protein miktarlarının belirlenmesinde kullandığımız bu yöntemler kolay, güvenilirliği yüksek olup yaygın şekilde uygulanmaktadır (Shimada ve ark., 1997; Rättö ve ark., 2001; Zhang ve Bishop, 2003). Fenol-sülfürik asit yöntemi biyofilm tabakasının karbohidrat bileşiminin tayin edilmesinde kullanılan son derece hassas bir metottur (Dubois ve ark., 1956; Storey ve Ashbolt, 2001). EPS, yapısında karbohidratlar dışında protein, nükleik asit ve hücre kalıntılarına da sahiptir. Karbohidratlar dışındaki bileşenlerin düşük miktarda olması bu ölçümün güvenilirliğini etkilememektedir (Lazarova ve Manem, 1995; Jefferson, 2004). Biyofilm tabakasındaki karbohidratlar, proteinlerden en az dört kat daha fazladır (Liu ve Tay, 2001). Brown ve Lester (1980), yaptığı çalışmada biyofilm homojenatında bulunan DNA ve protein miktarları ile karbohidrat miktarları arasında bir ilişki olmadığını, biyofilmin homojenizasyonu esnasında hücrelerin parçalanması sonucu artan DNA ve proteinin sapmalara yol açmasına bağlamıştır. Biyofilm miktarının kantitatif analizinde üronik asit tayini de kullanılmaktadır ancak biyofilmde karbohidratlara oranla daha az bulunması

nedeniyle analiz hassasiyeti daha düşüktür (Tsuneda ve ark., 2003). Araştırmacılar, EPS’de bulunan heksoz ve pentoz miktarlarının bakterinin yüzeye yapışabilme yeteneği ile doğru orantılı olduğunu göstermişlerdir. Çalışma koşullarımızda ürettiğimiz EPS materyallerinin şeker içerikleri HPLC ile detaylı bir biçimde araştırılmıştır (Ruijsenaars ve ark., 1998; Rättö ve ark., 2001). Böylece izole ettiğimiz mikroorganizmaların EPS içeriklerinin aydınlatılması sağlanacak ve EPS’nin temel iskeletini oluşturduğu biyofilmlerin yapısının aydınlatılması için temel bilgiler sağlanmış olacaktır. Zira araştırmacılar biyofilm yapısının ve kompozisyonunun aydınlatılmasının EPS içeriğinin ortaya konulmasıyla sağlanacağını bildirmişlerdir (Hope ve Wilson, 2006; Yun ve ark., 2006; Ivnitsky ve ark., 2007).

Değişkenlik gösterse de EPS’nin kimyasal ve fiziksel olarak öncelikli olarak polisakkaritten oluştuğu, polisakkaritlerden bir kısmının doğal, bir kısmının da anyonik yada katyonik yapıda olduğu ortaya konmuştur (Sutherland, 2001c). Çalışmamızda da elde edilen tüm ham EPS materyallerinin başlıca içeriğinin şeker daha az olarak da proteinden oluştuğu saptanmıştır. % şeker ve % protein içeriğinin birbirine en yakın olduğu EPS (sırasıyla %34,2 ve %29,7), izolat 8SS (*O.anthropi*)’ye aittir. Yapılan bir çalışmada, *P.aeruginosa* SG81 mukoid straini ile polikarbonat filtreler üzerinde geliştirilen model biyofilmlerin, fenol sülfürik asit yöntemi ile toplam karbohidrat miktarı $705,5 \pm 36,8$ ($\mu\text{g}/10^9$ hücre), EPS’sinin $535,8 \pm 40,8$ ($\mu\text{g}/10^9$ hücre) olarak bulunmuştur. Aynı biyofilmin protein miktarı ise $532,6 \pm 8,3$ ($\mu\text{g}/10^9$ hücre), EPS’si $271 \pm 7,0$ ($\mu\text{g}/10^9$ hücre)’dir (Strathmann ve ark., 2002). Shimada ve ark. (1997) tarafından, yüksek emülsifiye edici aktiviteye sahip EPS71a’nın; %45 toplam şeker, %18,75 protein, %7,0 sülfat ve %9,23 üronik asit içerdiğini ifade etmişlerdir. Royan ve ark. (1999) tarafından, *Pseudomonas mendocina* P2d’ye ait EPS’nin şeker içeriği GC (Gas Chromatography) ile heksozlar; ramnoz %50,79, glukoz %7,23, fukoz

%3,33 ve pentozlar; mannoz %19,21, riboz %6,53, arabinoz %0,76 olarak bulunmuştur

Değişik bakterilerden çoklu şekerler içeren heteropolisakkaritler rapor edilmiştir. Bunlara örnek, saprofitik bakteri *P.fluorescens* strain III3'ün EPS'si; glukoz, glukozamin, ramnoz, fukoz, arabinoz ve asetat, bitki patojeni *P.andropogonis* EPS'si; glukoz, glukuronik asit, mannoz, ramnoz ve galaktoz verilebilir (Fishman ve ark., 1997).

EPS şeker içerikleri, aynı genus üyelerine ait bakteriler arasında da farklılık gösterebilmektedir. Öyle ki, *Bukholderia* genusu içerisindeki farklı türlere ait strainlerin (*B.multivorans*, *B.cenocepacia*, *B.cepacia*) EPS'lerinin şeker içeriklerinin değişebildiği, 1 tanesinin glukoz ve galaktoz, 4 tanesinin ramnoz, galaktoz, glukoz, mannoz ve 2 tanesinin sadece galaktoz içerdiği bildirilmiştir (Herasimenka ve ark., 2007). Benzer şekilde bizim çalışmamızdaki *B.gladioli* (izolat 4) EPS'sinde riboz saptanmışken aynı genus üyesi *B.cepacia* (izolat 14SS)'ya ait EPS'de bu şekere rastlanmamıştır. Başka bir çalışmada, *B.cepacia*'nın 5 farklı straininin 3'ünün EPS'sinde arabinoz yokken, 2'sinde %0,1-0,5 oranında bulunmuştur. *B.cepacia* strainlerine ait tüm EPS'lerin diğer şekerlerden glukozu %17-26, ramnozu %5,8-55, mannozu %4,9-42, galaktozu %4,4-9,4, ribozu %0,2-3,4, ksilozu %0,3-3,3, üronik asitleri %0,2-3,4 arasında değişen oranlarda içerdiği bildirilmiştir (Lindberg ve ark., 2001). Bizim çalışmamızda *B.cepacia* (izolat 14SS) EPS'sinin, bahsedilen çalışmaya benzer olarak glukoz (%45,2), ramnoz (%19,0), mannoz (%10,6), galaktoz (%20,6) içerirken farklı olarak arabinoz (%3,5) içerdiği gözlenmiştir. Adı geçen çalışmaya göre, izolat 14SS EPS'mizdeki tanımlanmayan şekerlerin ise ksiloz ve/veya üronik asitler olabileceği düşünülmektedir. Yine, fruktoz *Pseudomonas* türlerinden izolat 12'nin EPS'sinde yokken, izolat 22 ve 6Bi EPS'lerinde ise

sırasıyla %0,2 ve %1,9 oranında mevcuttur. Çalışmamızda, *B.gladioli* (izolat 4)'ün EPS'sinde, *B.cepacia* (izolat 14SS)'dan farklı olarak %0,3 oranında riboz saptanmıştır (Çizelge 3.11).

Diğer bir çalışmada, kağıt üretim tesisinde slime oluşumlarından izole edilen bakteriler genel olarak glukoz, glukuronik asit, ramnoz, mannoz ve fukoz içeren EPS üretmişlerdir (Verhoef ve ark., 2003).

Bazı bakteriler tek tip EPS üretirken bazılarının birden fazla tipte EPS ürettiği bildirilmiştir. Öyle ki, Wozniak ve ark. (2003), *P.aeruginosa* PA01 ve PA14 biyofilmlerinin hücre dışı matriksinin temel içeriğinin sadece aljinattan oluşmadığını, N-asetil şekerler, 3,4,6-bağlı glukoz, ketodeoxyoctulosonat, 2-bağlı ve 3-bağlı ramnoz, 2 ve 4-bağlı ramnoz, 4-bağlı ksiloz şekerlerince de zengin olduğunu belirlemişlerdir. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772'den üretilen EPS'nin düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı olmak üzere 2 kısımdan oluştuğu, düşük moleküler ağırlığına sahip kısmın; 11:1:0,4 oranında, yüksek moleküler ağırlığa sahip kısmın; 5:1:1 oranında sırasıyla galaktoz, glukoz ve ramnoz içerdiği gözlenmiştir (Grobbe ve ark., 1997).

Emülsiyonlar termodinamik bakımdan kararsız sistemlerdir ve bu özellikleri birçok endüstriyel uygulamada sorun çıkarmaktadır. Bir ürünün etki ve yapısında zaman içinde oluşabilecek değişimlerin ortaya konması ve o ürüne ait raf ömrünün belirlenmesi amacı ile emülsiyon kararlılık çalışmaları yapmak gereklidir (Yadav ve ark., 2007). Kimyasal olarak sentezlenen veya bitkisel kökenli emülsifizerler; gıda, farmasötik, kozmetik ve petrol endüstrilerinde kullanılırlar. Bununla beraber, mikrobiyal kaynaklardan elde edilen emülsifizerler sentetik ürünlere göre çeşitli avantajlarından dolayı dikkat çekmektedir. Daha düşük toksisite, daha yüksek biyoparçalanabilirlik, daha iyi çevresel uyum, daha

yüksek seçicilik, ekstrem sıcaklıkta, pH'da ve tuzlulukta spesifik aktivite bu avantajlarındandır (Iyer ve ark., 2006). Mikrobiyal EPS'lerin; karbohidrat yapıları (Kim ve ark., 1994) ve protein içeriklerinden (Randall ve ark., 1988) dolayı emülsifiye edici aktivitelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Özellikle EPS'nin hidrofilik ve hidrofobik kısımları; yağ-su, petrol-su gibi çoğu emülsiyonun kararlılığını arttırıcı niteliktedir (Kim ve ark., 1994; Yadav ve ark., 2007). O nedenle, bugün endüstriyel olarak yaygınca kullanılırlar (Sutherland, 1993; Sutherland, 1998). Bu amaçla, çalışmamızda elde ettiğimiz EPS materyallerinin emülsifiye edici özellikleri incelenmiştir. Çalışmamızda EPS'nin emülsifiye edici aktivitesi; hidrokarbonun sudaki emülsiyonunun zamana bağlı olarak kararlılığının korunması şeklinde tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *S.paucimobilis* (izolat 2SS) EPS'sinin; 30., 60. ve 120. dk.larda (sırasıyla elde edilen absorbans değerleri; 0,72, 0,70 ve 0,67) emülsiyonun kararlılığını fazla miktarda koruduğu gözlenmiştir. Ve aynı EPS'nin 120 dakika sonundaki emülsifiye edici aktivitesi %91,78 olup, çalışmadaki 12 EPS içerisinde en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bunun tersi olarak en düşük emülsifiye edici aktiviteye sahip *A.hydrophila* (izolat 5Bi) EPS'sidir. Sphingomonadların metabolik çeşitliliği ve hücre dışı jelan-benzeri polisakkaritler olan sphinganları üretebilmeleri biyoteknolojik uygulamalar için onların yaygın kullanımına sebep olmuştur (Kawai, 1999). Sphinganların gıda, ilaç sanayii, petrokimya ve diğer endüstrilerde yaygın kullanımı mevcuttur (Sutherland, 1999a). Ayrıca sphinganlar, yüzeylere hücrelerin tutunması ve sonuçta biyofilm oluşumu ve patojeniteyi arttırıcı fonksiyon göstermektedir (Hsueh ve ark., 1998). Bizim çalışmamızda *S.paucimobilis* (izolat 2SS)'den elde ettiğimiz olası sphinganın yüksek emülsifiye edici özelliği bakımından da önemli olduğu düşünülmektedir.

Iyer ve ark. (2006) tarafından, *S.paucimobilis* GS-1'in ürettiği EPS'nin ekstrem pH, sıcaklık ve tuz koşullarında dahi visköz ve emülsifiye edici özelliklerinden dolayı çeşitli hidrokarbonları, yağları ve petrolü, *Enterobacter cloaceae*'ye ait EPS71a'nın alifatik ve aromatik hidrokarbonlar ve bitkisel yağları emülsifiye etmede kullanıldığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar., EPS71a'nın yerfıstığı yağı, hekzan ve ksilene karşı elde edilen emülsifikasyon indeksleri 24 saatte sırasıyla 95, 80 ve 70, 216 saatte ise 85, 75 ve 60 olarak bulmuşlardır. Yine *Acinetobacter calcoaceticus*'tan elde edilen ticari bakteriyal emülsifizer olan emülsan ile hekzadekan emülsiyonları 96 saatte stabilize edilmiştir (Iyer ve ark., 2006). Fishman ve ark. (1997) tarafından, *P.fluorescens*'in de bulunduğu çeşitli *Pseudomonas* türlerine ait EPS'lerin kısmi karakterizasyonu sonucunda moleküler ağırlıkları, viskozite ve emülsifiye edici özellikleri bakımından inceltici, stabilize edici, emülsifiye edici ve jelleştirici ajanlar olarak endüstriyel amaçla kullanılabilecekleri vurgulanmıştır. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da *Pseudomonas* genusuna ait bakterilerden (izolat 12, 22, 6Bi) izole edilen EPS'lerin emülsifiye edici aktivitelerinin yüksek olduğu ve emülsiyon kararlılıklarının zamana bağlı olarak korunduğu görülmüştür (Çizelge 3.12). Başka bir çalışmada, *P.mendocina* P2d'den elde edilen EPS'nin ilk 30 dk içerisinde kararlılığının azaldığı saptanırken, 30. ve 60. dk.larda elde edilen (540nm'de) absorbans değerleri (sırasıyla 0,12 ve 0,13) ile emülsiyon kararlılığının oldukça korunduğu görülmüştür. Aynı EPS'nin emülsifiye edici aktivitesi 30. dk.'da %61,90, 60. dk'da %57,14 olarak bulunmuştur (Royan ve ark., 1999).

EPS'nin, şeker içeriğinin belirlenmesi amacıyla, hidrolizi 1M H₂SO₄ ile 100°C'de 2saat, %3'lük H₂SO₄ ile 125°C'de 2saat, 0,5N H₂SO₄ ile 100°C'de 3saat, 6M HCl ile 100°C'de 4saat veya 0,5M trifluoroasetik asit ile 100°C'de

4saat muamele edilerek gerçekleştirilmektedir (Jääskeläinen ve ark., 2003). Çalışmamızda, bu amaçla EPS'ler 70°C'de 0,01M H₂SO₄ ile hidrolizlenmiştir (Shimada ve ark., 1997).

Bizim çalışmamızda, izolatların EPS üretimi ve EPS içeriğinin yanısıra, kendi ve diğer test edilen bakteriler tarafından üretilen EPS'leri parçalama kapasiteleri de araştırılmıştır. EPS üretici mikroorganizmalar aynı zamanda EPS'yi parçalayabilen enzimlere de sahip olabilmektedir. Verhoef ve ark. (2003) tarafından, kağıt işleme tesisleri biyofilminden izole edilen *Methylobacterium sp.*'e ait EPS'nin 3:2 oranında galaktoz ve piruvatlanmış galaktozdan oluştuğu, EPS üretimi yanında aynı zamanda bakterinin EPS yapısındaki α -(1→3)-galaktan bağımlı koparıp EPS'yi parçalayabildiği ortaya konmuştur (Verhoef ve ark., 2003). EPS üretici *L.reuteri* LB121'nin glukoz, sakkaroz, rafinoz ve maltoz içeren ortamda büyütüldüğünde glukon sükras ve levan sükras enzimlerini ürettiği belirlenmiştir (Van Geel-Schutten ve ark., 1999). Saprofitik bir bakteri *Spartina alterniflora* 2-40'ın agar, aljinik asit, karragenan, karboksimetil selüloz, kitin, β -glukan, laminarin, pektin, pullulan, nişasta ve ksilan gibi kompleks polisakkaritleri parçalayabildiği bildirilmiştir (Gonzales ve Weiner, 2000).

Mikroorganizmaların polisakkaritleri parçalamalarının tayini için çeşitli yöntemler bildirilmiştir. Bu yöntemler ya katı ya da sıvı besiyerlerinde polisakkaraz enzimlerinin varlığının ortaya konulmasıyla sağlanır. Katı besiyerleriyle geliştirilen plak tarama yöntemleri temelde polisakkaritler ile boyalar arasındaki kompleks etkileşimlere (Teather ve Wood, 1982), polisakkaritlerin çözülebilme özelliğine (Hankin ve Anagnostakis, 1977), polisakkaritlerin jel-oluşturma özelliğine (Kennedy ve Sutherland, 1994), çözülebilir ve çözilemeyen boya-işareti polisakkaritlere (Castro ve ark., 1995, McCleary, 1988) dayanır.

Bazı polisakkaritler boyalar ile kovalent olmayan etkileşimde bulunurlar. Bu etkileşim polisakkariti bir plak besiyerinde görülebilir yapabilmektedir. Bu amaçla Kongo Red boyama ile katı bir besiyerinde *Paenibacillus alginolyticus* XL-1 tarafından ksantan yan zincirlerinin parçalanması gösterilmiştir (Ruijsenaars ve Hartmans, 2000). Boyalardan Kongo Red; ksantan ve glukanların parçalanmasının (Ruijsenaars ve Hartmans, 2000), Ruthenyum Red; aljinat ve pektinin parçalanmasının gösterilmesi amacıyla kullanılmıştır (Gacesa ve Wusteman, 1990).

Bazı polisakkaritler ise jel oluşturma kapasitesine sahiptir. Jel oluşturan bu polisakkaritler besiyerini agar gibi katılaştırabilirler. Jelani liyaz üretici mikroorganizmaların kolonilerinin etrafında katı besiyerinde 7. gün sonunda sıvılaşmanın meydana gelmesi ile parçalanma tespit edilmiştir (Kennedy ve Sutherland, 1994).

Boya işaretli polisakkaritlerin kullanımı ile de parçalanmanın gösterimi sağlanmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, Remazol Brilliant Blue, Direct Green I, Ostazin BrilliantRed H-3B ve Mikacion Brilliant Red 5BS gibi azo boyalar ile amiloz, pullulan, akasya çekirdeği sakızı, CMC, CM-amylöse, hydroxethylcellulose ve inulin işaretlenerek kullanılmıştır. Sonrasında, polisakkaraz varlığı, koloni etrafında polisakkaritin parçalanmasıyla açığa çıkan renkli halkanın oluşumu ile tespit edilmiştir (Ruijsenaars ve Hartmans, 2000). Boya işaretli polisakkaritler, McCleary (1988) tarafından sıvıda parçalama-tarama yöntemleri için de önerilmiştir.

Plak yöntemlerinin uygulanabilirliği, polisakkarit içeriğinin tamamen aydınlatılması ve böylece işaretleme için uygun boyanın seçimini gerektirir. Bununla beraber her polisakkarit, boyalar ile etkileşime girmemektedir. Plak tarama yöntemleri genellikle ticari olarak satılan saflığı çok yüksek ham enzim

preparasyonlarının kontrolü amacıyla kullanılmaktadır (Ruijsenaars ve ark., 2000). Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda polisakkaritlerin parçalanmasının tayini için Rättö ve ark. (2001) tarafından bildirilen sıvı ortamdaki tarama yöntemi kullanılmıştır. Nitekim Ruijsenaars ve ark. (2000), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* B40'dan elde ettikleri EPS'nin jelleşme özelliğine sahip olmaması ve boyalarla etkileşime girmemesi sebebiyle tamponlanmış sıvı mineral tuz ortamına EPS'nin ilavesiyle hidrolizini incelemişlerdir.

Yapılan kaynak araştırmasında, katı ortamlardakinin aksine sıvı ortamlardaki polisakkaraz çalışmalarına daha az rastlanmıştır. Yöntemin esasını; tek C kaynağı olarak EPS materyalinin eklendiği sıvı besiyerinde, mikroorganizmaların büyümelerini takiben oluşan indirgenmiş şekerlerin spektrofotometrik olarak tayini ve ortam viskozitesindeki azalmanın tayini oluşturmaktadır. Çalışmamızda, deney koşulları ve spektrofotometrik ölçümlerden kaynaklanabilecek hataları en aza indirmek için denemeler ve ölçümler ikişer kez kontrollü olarak tekrarlanmıştır.

İndirgenmiş şekerlerin tayininde 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) yöntemi veya Neslon-Somogyi yöntemi kullanılmaktadır (Matiz ve ark., 2002). Çalışmamızda indirgenmiş şeker analizi, polisakkarit parçalayıcı enzim aktivitelerinin ölçümünde rutin olarak yaygın kullanıma sahip olması ve diğer yonteme göre uygulamadaki kolaylığı (Matiz ve ark., 2002) nedeniyle DNS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Toprak, su sistemleri gibi doğal çevresel kaynaklı biyomasın diğer klinik kaynaklı biyomasa göre EPS'ler üzerinde daha yüksek parçalama etkisi gösterdiği vurgulanmıştır (Ruijsenaars ve ark., 2000). Çalışmamızda da benzer

olarak su ilişkili kule biyofilm bakterilerinin EPS parçalama kapasiteleri genel olarak yüksek bulunmuştur.

Önceleri kültürlerde bakterilerin kendi hücre dışı polisakkaritlerini parçalamadığı ileri sürülmüşse de bugün için hücre dışı polisakkaritlerin ve biyofilmin kendi üreticileri ve diğer organizmaların saf ve karışık kültürleri tarafından parçalanıp tüketilebildiği ortaya konmuştur. Bu durum, Zhang ve Bishop (2003) tarafından belirtilen 4 evreli mekanizma ile ortaya konmuştur.

Biyofilm oluşumu ile ilişkili problemlerin önlenmesi çoğunlukla insan ve çevre açısından toksik olan biyositlerle giderilmeye çalışılmaktadır. Oysa ki, bugün çevresel yaklaşımlara artan ilgi nedeniyle biyofilm kontrolü için alternatif yöntemler araştırılmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri mikrobiyal birikimin yapılaşmasından sorumlu EPS'yi parçalamak için enzimlerin kullanımıdır. Bu amaçla incelenmiş çeşitli enzimler vardır. Levanaz levanı parçalamak, *Enterobacter sp.*'den elde edilen bir enzim de kolanik asiti parçalamak amacıyla kullanılmıştır (Verhoef ve ark., 2003). Girollo ve ark. (2005) tarafından, tatlı su habitatında bulunan bakteriyel bir popülasyonun, yine aynı habitatından izole edilen *Cryptomonas tetrapyreoidosa*'nın ürettiği EPS'yi parçaladığı bildirilmiştir.

Ruijsenaars ve ark. (2000) tarafından, gıda veya gıda ilişkili çeşitli kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterilerince üretilen EPS'ler ve ticari olarak satılan ksantan ile klavan olmak üzere toplam 7 adet EPS'nin, toprak ve insan dışkısında bulunan mikroorganizmalar tarafından parçalanmaları araştırılmıştır. Bu amaçla toprak örnekleri ve sağlıklı insan dışkıları inokulum olarak kullanılmıştır. Tek C kaynağı olarak sözü edilen EPS'nin eklendiği D ortamına inokulumların süpernatantları ayrı ayrı aktarılıp 5 günlük inkübasyondan sonra şeker tüketimlerine bakılarak parçalanma olup olmadığı

belirlenmiştir. 5 günlük inkübasyon sonunda toprak inokulumu tarafından parçalanmanın olmadığı, *Streptococcus thermophilus* SFi12'den üretilen EPS'deki şeker tüketimine bağlı olarak kısmen parçalanmanın olduğu, *S.thermophilus* SFi39'sinin, ksantan ve klavanın tamamen parçalandığı saptanmıştır. Araştırmacılar şekerlerin tüketiminin saptanmasını, bizim de çalışmamızda kullandığımız DNS yöntemine göre, EPS şeker kompozisyonunu da HPLC ile incelemişlerdir. Fekal orjinli inokulum sadece *S.thermophilus* SFi12, *S.thermophilus* SFi39 ve ksatanı parçalamış, çalışmadaki diğer EPS'lere etki etmemiştir. Ksantan toprak inokulumu tarafından tamamen, fekal inokulum tarafından %35 oranında kısmen parçalanmıştır. Yüksek parçalama kapasitesine sahip türlerin bulunduğu diğer bir genus da *Bacillus*'tur. *Bacillus* türlerinin çok sayıda polisakkarit-parçalayıcı ve protein-parçalayıcı enzim ürettiği bilinmektedir (Ten et al., 2005).

Çalışmamızda tek C kaynağı olarak EPS ilave edilen ortamlarda bakterilerin ΔA_{620} sonuçları; $\geq 0,15$ ise iyi büyüme olarak tanımlanarak dikkate alınmış, $0,05 \leq \Delta A_{620} < 0,15$ arasında az büyüme ve $< 0,05$ ise kötü büyüme düşünülerek dikkate alınmamıştır. Buna göre 12 test bakterisinden çoğunun (8 tanesinin) iyi büyüme ($\Delta A_{620} \geq 0,15$) gösterdiği *Pseudomonas sp.* (izolat 12) EPS'si, en az (1 tanesinin) iyi büyümenin görüldüğü *P.agglomerans* (izolat 9Ba) ve *P.vulgaris* (izolat 2) EPS'leridir. Hatta bazı izolatların kendilerinin ürettiği EPS'ler üzerinde iyi büyüme ($\geq 0,15$) gösterdikleri dikkat çekmiştir. Bu izolatlar; 22, 6Bi, 2SS, 4, 8SS ve 12 nolu izolatlardır (Çizelge3.13). Diğer yapılan bir çalışmada, *P.fluorescens* EPS'sinin bulunduğu besiyerinde bir *B.cereus*, *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.amyloliquefaciens* straini az büyüme gösterirken ($\Delta A_{620} < 0,15$), *B.macerens* E-81138 straini 0,31, *Bacillus sp.* E-91434 0,27 ve

Bacillus sp. E-94548'in 0,35 absorbans değerleri ile iyi büyüme ($\Delta A_{620} \geq 0,15$) gösterdikleri belirlenmiştir (Rättö ve ark., 2001).

Çalışmada, her bir EPS'de iyi büyüme gösteren bakterinin bu ortamlardaki zamana bağlı viskozitelerindeki indirgenmeleri Çizelge 3.14-3.25'de görülmektedir. Sonuçlara göre *B.cepacia*'dan (izolat 14SS) elde edilen EPS'li ortamın en yüksek viskozite indirgenmesi %72,34 ile *A.hydrophila* (izolat 5Bi) ile elde edilirken aynı genusa ait *B.gladioli* (izolat 4)'nin EPS'sini aynı bakteri orta büyüme gösterdiği için dikkate alınmamıştır. 48. saat sonunda *B.gladioli* (izolat 4)'ün en yüksek viskozite indirgenmesinin %38,76 ile yine bakterinin kendisiyle elde edilmesi dikkat çekicidir (Çizelge 3.22). *A.hydrophila* (izolat 5Bi) EPS'li ortamda hem *B.cepacia* (izolat 14SS) hem de *B.gladioli* (izolat 4) tarafından 48. saatlerde viskozitelerde sırasıyla %19,40 ve %39,47'lik indirgenmeler saptanmıştır (Çizelge 3.19).

Denemeler sonucunda, tüm bakterilerle zamana bağlı olarak viskozitelerde genel olarak bir azalma tespit edilmiştir. Öyle ki, *P.fluorescens* (izolat 22) EPS'si ilaveli ortamın 1. saatteki 2,05 cP olan viskozitesi *Pseudomonas sp.* (izolat 12) ile 12. saatte 1,92 cP, 24. saatte 1,66 cP ve 48. saatte 1,07 cP olmuştur (Şekil 3.43). *S.paucimobilis* (izolat 2SS)'in EPS'sinin bulunduğu ortamın viskoziteleri *P.vulgaris sp.* (izolat 2) ile saatlere göre sırayla 4,88, 4,70, 4,52 ve 3,90cP olarak ölçülmüştür. Başka bir çalışmada benzer olarak, *Bacillus licheniformis* E-91446'ya ait EPS'li ortamda *Bacillus macerans* E-81138 ile 1. ve 24. saatlerde elde edilen viskoziteler sırasıyla 2,16 ve 1,19cP, *Bacillus sp.* E-91434 ile 4,02 ve 3,56cP, *Bacillus sp.* E-94548 ile 3,15 ve 1,61cP olarak bulunmuştur (Rättö ve ark., 2001). Bunların aksine çalışmamızda, *B.gladioli* (izolat 4) ile *O.anthropi* (izolat 8SS)'den izole edilen EPS'li ortamın viskozitesinde 12. saate göre 24. saatteki viskozitede artış belirlenmiştir. 12.

saatte 1,19cP olarak bulunmuştur. 1. ve 12. saatler arasında da viskozitede hiçbir değişme görülmemiştir. Bu duruma benzer olarak *P.haemolytica* (izolat 21) EPS'li ortamın viskozitesi (1,53cP) *P.aeruginosa* (izolat 6Bi) ile, *B.gladioli* (izolat 4) EPS'li ortamın viskozitesi (1,95 cP) *B.cepacia* (izolat 14SS) ile, *P.fluorescens* (izolat 22) EPS'li ortamın viskozitesi (1,89 cP) *B.cepacia* ile, *P.vulgaris* (izolat 2)'li ortamın viskozitesi (2,14cP) *P.fluorescens* ile, *S.dysenteria* (izolat 14) EPS'li ortamın viskozitesi *B.gladioli* (2,18cP) ile ve *S. paucimobilis* (2,09cP) ile ilk 12 saatte indirgenmemiş 1. saat ile aynı ölçülmüştür.

Biyofilm hücrelerinin yavaş gelişimi, metabolik olarak daha az aktif olmaları, onların bir iyon değiştirici olarak toksikantları immobilize eden ve aynı zamanda hidrofobik/hidrofilik bir bariyer olan glikokaliksleri tarafından korunmaları hücrelere biyositlerin ulaşmasını engeller (Augustin ve ark., 2004). Proteomik ve genomik birçok çalışma biyofilmdeki mikrobiyal hücreleri “çok yüksek-dirençli fenotipler” olarak tanımlamıştır (Whiteley ve ark., 2001; Danese, 2002; Oosthuizen ve ark., 2002). Bu nedenle, biyofilm mikroorganizmaları üzerinde biyositlerin yüksek dozlarda kullanılması gerekmektedir. Biyositlerin ekolojik birikimi toksik ve karsinojenik olmalarından dolayı istenmeyen birçok sorun yaratır. Bu nedenle, alternatif biyofilm giderim yolları aranmaktadır. Bu amaçla özellikle glikokaliks EPS'lerinin enzimatik parçalanması üzerinde ilgi artmaktadır (Nguyen ve Schiller, 1989; Augustin ve ark., 2004). Enzimatik uygulamalar; endüstriyel soğutma kulelerinde, su depolarında, su dağıtım sistemlerinde, pulp ve kağıt hamuru suyunda, ultrafiltrasyon, diyaliz membranları ve klinik alanda kullanılmaktadır (Nguyen ve Schiller, 1989).

Bir enerji üretim tesisi biyofilminden izole edilmiş *Pseudoalteromonas ruthenica* bakterisinin cam ve polystyrene kısımlar üzerinde biyofilm oluşturduğu, biyofilmdeki *P.ruthenica* hücrelerinin serbest fazdaki hücrelere göre

uygulanan 1mg/l klora 10 kat daha dirençli olduğu saptanmıştır. (Saravanan ve ark., 2006). Augustin ve ark. (2004), test edilen 20 ticari biyositin *P.aeruginosa*, *E.coli*, *L.bulgaricus* ve *S.thermophilus* biyofilm strainleri üzerindeki yok edici etkisinin enzim ilavesiyle arttırılabildiğini vurgulamışlardır.

Farklı kaynaklardan elde edilen enzimler ile EPS matriksin ve dolayısıyla mikrobiyal biyofilmlerin parçalanması sağlanmıştır. Endüstriyel biyofilmlerin EPS'lerinin uzaklaştırılmasında daha önceleri kullanılan ticari enzim preparatlarına (Johansen ve ark., 1997) alternatif olarak, değişik kültür substratlarında geliştirilen mikroorganizmalardan yüksek polisakkarit-parçalama potansiyeline sahip enzimlerin eldesi üzerinde durulmaktadır (Orgaz ve ark, 2006). Farklı C kaynakları ilave edilen ortamda büyütülen *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* ve *Penicillium sp.* H18 süpernatantlarında EPS-karbohidratlarını parçalayıcı enzim aktiviteleri tespit edilmiştir (Orgaz ve ark, 2006). Aynı araştırmacılar, uygun substratın seçimi ile enzim verimlerinin ve EPS-parçalanma etkinliğinin arttırılabileceğini bildirmişlerdir. Öyle ki, *A.niger* ile substrat arap sakızı iken 14. günde 65 ± 5 , aljinat iken 9. günde 38 ± 7 , ksilan iken 8. günde 19 ± 6 , pektin iken 1. günde 60 ± 5 ; *T.viride* ile substrat pektin iken 84 ± 2 ; *Penicillium sp.* H18 ile substrat aljinat iken 45 ± 5 'lik maksimum biyofilm giderimi sağlanmıştır.

Son yapılan bir çalışmada, silikon kateterler üzerindeki birkaç *Candida* türü ve *Saccharomyces cerevisiae* biyofilmini inhibe edici ajanın yine *Candida* hücrelerinin oluşturduğu bir biyofilm olduğu bildirilmiştir (Cateau ve ark., 2008).

Leroy ve ark. (2008) tarafından, biyofilm oluşturuucu denizsel mikroorganizmaların veya makroorganizmaların, dirençliliklerinden dolayı, öldürülmesinden ziyade enzimatik olarak biyofilm matriksin (EPS'nin)

parçalanması ile adhezyonun inhibisyonu önerilmiştir. Hücre dışı polimerik matriksin yapışkanlığının enzimatik olarak giderilmesiyle biyofilm kontrol stratejilerinin mümkünlüğü, kinetik bir modelin önerildiği bir modelleme çalışmasıyla da ortaya konmuştur (Xavier ve ark., 2005).

Endüstriyel biyofilm matriksi çok sayıda heteropolisakkarit içerir. Bu nedenle EPS'lerin şeker içeriğinin tayini ve tüm şekerler için ayrı enzimatik aktivitenin eklenmesi önemlidir (Nguyen ve Schiller, 1989, Augustin ve ark., 2004). Zararlı biyofilmlerle mücadelede EPS'nin parçalanması için spesifik polisakkarazların proteazlar, lipazlar ve glikoproteazlar ile uygulanmasının daha avantajlı olacağı şüphesizdir (Nguyen ve Schiller, 1989). Yine proteazların kullanımıyla yüzeylere sıvı akışı ile taşınan organik biyofauling de önlenilecektir (Augustin ve ark., 2004).

Biyofilm oluşumunda hücreler arası sinyalleşme molekülleri görev alır. Bu sinyalleme sistemlerine müdahale ile de biyofilm oluşumu düzenlenebilir. EPS ve biyofilm oluşumuna karışan hücrelerarası sinyallerin inhibisyonu hem endüstri hem tıpta biyofilmlerce meydana gelen birçok problemin çözümüne yardımcı olabilecektir (Danese, 2002). Patojenik bakterilerde glikokaliks üretimi ile virulans faktörlerin düzenlenmesinde önemli role sahip N-açilhomoserin lakton gibi çeşitli QS moleküllerinin değişik bakteriler tarafından parçalanmasına dayalı son yıllarda pek çok araştırma yapılmıştır (Dong ve ark., 2002; Molina ve ark., 2003; Xu ve ark., 2003; Jafra ve Wolf, 2004; Angelo-Picard ve ark. 2005; Park ve ark., 2005; Rasmussen ve Givskov, 2006). Yine QS tarafından regüle edilen dönme hareketi, yüzme hareketi ve adhezyon gibi biyofilm oluşumunda etkili özelliklerin düzenlenmesi ile biyofilm oluşumu engellenebilmektedir. Örneğin, *B.cepaci*'daki dönme hareketi QS ile açıklanmaktadır. Bu davranışın yok edilmesi ile elde edilen cepR mutant *B.cepacia*'nın olgun biyofilm

oluşturamadığı saptanmıştır. Benzer şekilde *Proteus mirabilis*'in de dönme hareketinin engellenmesi halojenlenmiş furanonlar ile sağlanmış ve böylece bakterinin biyofilm oluşturmadığı gözlenmiştir. Fakat ne yazık ki furanon türevlerinin insan ve diğer memelilerde toksik etki göstermesi uygulamalarını kısıtlamıştır (Danese, 2002).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyofilm bakterilerinin konvensiyonel metodlarla (dezenfeksiyon, biyositler, antimikrobiyal ajanlar vb.) öldürülmesi genellikle etkili olamamaktadır. Antimikrobiyallerin yüksek dozları gerek çevresel (çevresel döngüleri olumsuz yönde etkiler) gerek klinik açıdan (hastalar üzerinde toksik etki gösterirler) tercih edilmemektedir. Biyofilmi tamamen yok etmenin klasik yöntemlerle mümkün olamayacağı açıktır. Kontamineli su veya besin maddesi içeren sıvıların bulaştığı tüm yüzeylerde biyofilm oluşumunun kaçınılmaz olduğu, oluşan EPS'nin ve biyofilmin, bakterileri kalkan gibi koruyacağı ve bakterilerin biyofilm yapısına katıldığında genetik değişimlere uğrayabilecekleri şüphesizdir.

Endüstriyel su sistemlerinde yetersiz dezenfeksiyonların ve temizlik ürünlerinin bilinçsiz kullanımının tesiste üretim ve verim düşüşlerine, enerji ve para kayıplarına neden olacağı bunun yanında patojenik biyofilm organizmalarının neden olduğu hastalıkları arttırıcı özellik göstereceği kaçınılmazdır. Bu nedenle uzun vadede istenmeyen biyofilmlerden kaynaklanan sorunların önlenmesi yada önemli ölçüde kontrol altına alınmasında aşağıdaki önerilerin izlenmesinin etkili olabileceği düşünülmektedir.

1. Mevcut su tesisatında biyofilm oluşumuna izin vermemek için biyositlerin biyodispersanlar, biyosüpfaktanlar gibi çeşitli antibiyofilm maddelerle ya da fırçalama gibi mekaniksel işlemlerle birlikte uygulanması daha avantajlı olacaktır. Böylece mekaniksel temizlik yanında daha etkili mikrobisidal temizlik söz konusu olacaktır.

2. Çevresel sistemlere biyositler tarafından gelebilecek zarar, biyofilmin temel iskeleti olan EPS yapısının yani slime-tabakanın mikroorganizmalar

tarafından kullanımı gibi biyolojik ve enzimatik yöntemler ile giderilmesiyle en aza indirilebilecektir.

3. Slime-tabakanın yapışkanimsı jel özelliğinin giderilmesi amacıyla enzimlerin şelatlayıcı maddelerle kombinasyonu biyofilmlerle mücadeleyi daha da etkin kılacaktır.

4. Gerek sucul gerek diğer biyofilmlerin oluşumunu engelleyebilmek amacıyla; bugün yeni bir yaklaşım olan QQ ile QS moleküllerinin üretiminin önlenmesi, parçalanması veya inhibisyonu, QS sinyalinin alınmasının önlenmesi stratejileri üzerinde durmak önemlidir. Bu amaçla insan ve ekolojik açıdan toksik özellikte olmayan yeni QQ bileşiklerinin sentezi gerekmektedir.

5. Yüzeylere mikrobiyal çekimin azaltılması veya yok edilmesi amacıyla tesislerde mümkün olan en uygun ve önerilen kalitede tesisat malzemesi kullanmak yerinde olacaktır.

6. Sistemde düzenli aralıklarla iyi bir bakım ve mühendislik hizmeti sağlamak, bakım programlarını aksatmamak mikrobiyal birikimin engellenmesi ve tesisin verimi açısından önemlidir.

Yapılan bu çalışma EPS'nin, yine üretici biyofilm mikroorganizmaları tarafından substrat olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Biyofilmlerin önlenmesinde bugün konvensiyonel uygulamalara alternatif olarak daha yüksek polisakkarit parçalama kapasitesine ve verimine sahip mikroorganizmaların keşfi bakımından çalışmanın önemli olduğu düşünülmektedir. Çalışmada, endüstriyel sistemlerden elde edilen bu biyofilm bakterilerinin, EPS'leri parçalayabilme yeteneğine sahip oluşlarının saptanması, istenmeyen biyofilmlere karşı potansiyel-biyoparçalama ajanları olarak kullanılabileceklerini ortaya koymuştur. Bununla beraber, EPS'yi parçalayan bakteriyal polisakkarazlar ve proteazların

daha detaylı taranmasıyla, zararlı biyofimler için dezenfektan ve temizleme ajanı olarak kullanılabilecekleri şüphesizdir. Ayrıca, incelediğimiz bakterilerin enzimlerinin daha ileri saflaştırılması ve uygun ölçekte saf olarak kullanılması ileri araştırmaları gerektirmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Achouak, W., Christen, R., Barakat, M., Martel, M.H., Heulin, T., 1999,** *Burkholderia caribensis* sp. nov. Exopolysaccharide-producing Bacterium Isolated from Vertisol Microaggregates in Martinique. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 787-794.
- Akova, M., 2005,** Bakteriler Arası İletişimin Engellenmesi: Umut Vaadeden Yeni Bir Aktibakteriyal Tedavi Yaklaşımı, ANKEM Derg., 19(2), 126-128.
- Allison, D.G. ve Sutherland, I.W., 1987,** The Role of Exopolysaccharides in Adhesion of Freshwater Bacteria, Journal of General Microbiology, 133, 1319-1327.
- Allison, D. G., 2003,** The biofilm matrix, Biofouling, 19, 139-150.
- Almiron-Roing, E., F. Mulholland, M. J. Gasson, A. M. Griffin., 2000,** The Complete EPS Gene Cluster from *Streptococcus thermophilus* NCFB 2393 Involved in the Biosynthesis of a New Exopolysaccharide, Microbiol, 146, 2793-2802.
- Alski, A.R., Sidorczyk, Z., Kotelko, K., 1997,** Potential Virulence Factors of *Proteus* Bacilli, Microbiol Molecular Biol. Rev., 61(1), 65-89.
- Altınışık, M., 2005,** Karbohidratların Yapısal ve İşlevsel Özellikleri IV Notları, Adnan Menderes Üniv. Tıp Fak., Biyokimya A.B.D., Aydın.
- Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I., Dessaux, Y., 2005,** Diversity of N-Acyl Homoserine Lactone-Producing and -Degrading Bacteria in Soil and Tobacco Rhizosphere, Environmental Microbiology, 7(11), 1796-1808.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Anton, J., Meseguer, I., Valera, F.R., 1988, Production of an Extracellular Polysaccharide by *Haloferax mediterranei*, Appl. and Env. Microbiol., 54, 2381-2386.

Aoi, Y., 2002, In situ Identification of Microorganisms in Biofilm Communities, J. Biosci. Bioeng., 94, 552-556.

Atkinson, S. ve ark., 1999, A Hierarchical Quorum-sensing System in *Yersinia pseudotuberculosis* is Involved in The Regulation of Motility and Clumping, Mol. Microbiol., 33, 1267-1277.

Augustin, M., Ali-Vehmas, Atroshi, F., 2004, Assessment of Enzymatic Cleaning Agents and Disinfectants Against Bacterial Biofilms, J. Pharm. Pharmaceut Sci., 7(1), 55-65.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., 1997, Short Protocols in Molecular Biology, John Wily and Sons, 3rd ed., N.Y.

Ay, S., Tekerekoğlu, M. S., Bayraktar, M., Abut, Latife, Duman, B., 2002, Klinik Örneklerden İzole Edilen Koagülaz Negatif Stafilokok Türlerinde “Slime” Oluşumu ve Antibakteriyallere Duyarlılığı, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 16(1), 40-43.

Barker, J., Brown, M.R.W., Collier, P.J., Farrel, I., Gilbert, P., 1992, Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga* Physiological Status and Susceptibility to Chemical Inactivation, Appl. and Environ. Microbiol., 58(8), 2420-2425.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Baskın, H., 2006, Mikroorganizmalarda Kimyasal Temelli Sosyomikrobiyoloji: Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama), Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi., 36(2), 111-115.

Batte, M., Appenzeller, B.R.M., Grandjean, D., Fass, S., Gauthier, V., Jorand, F., Mathieu, L., Boualam, M., Saby, S., Block, J.C., 2003, Biofilms in Drinking Water Distribution Systems, Rev Environ Sci Biotechnol, 2, 147-168.

Bello, F.D., Walter, J., Hertel, C., Hammes, W.P., 2001, *In vitro* study of Prebiotic Properties of Levan-type Exopolysaccharides from Lactobacilli and Non-digestible Carbohydrates Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, System. Appl. Microbiol. 24, 232-237.

Bilgehan, H., 1996, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. 8. baskı, Barış yayınları, İzmir, 594.

Boe-Hansen, R., 2001, Microbial Growth in Drinking Water Distribution Systems, Thesis (PhD), Denmark Technical University.

Bonet, R., Simon-Pujol, M.D., Congregado, F., 1993, Effects of Nutrients on Exopolysaccharide Production and Surface Properties of *Aeromonas salmonicida*, Appl Environ Microbiol., 59(8), 2437-2441.

Borenstein, S.W., 1994, Microbially Influenced Corrosion Handbook, Industrial Pres Inc., New York, 12(14), 165.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Bos, R., van Der Mei, H.C., Busscher, H.J., 1999, Physico-chemistry of Initial Microbial Adhesive Interactions - Its Mechanisms and Methods for Study, FEMS Microbiol Rev, 23, 179-230.

Boşgelmez, G., 2003, Quorum Sensing in Gram-negative Bacteria, Turk J. Biol., 27, 85-93.

Bott, T.R., 1998, Techniques for Reducing The Amount of Biocide Necessary to Counteract The Effects of Biofilm Growth in Cooling Water Systems, Applied Thermal Engineering, 18, 1059-1066.

Boucher, J.C., Schurr, M.J., Yu, H., Rowen, D.W. Deretic, V., 1997, *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis: Role of *mucC* in The Regulation of Alginate Production and Stress Sensitivity, Microbiology, 143, 3473-3480.

Boyen, C., Kloareg, B., Polne-Fuller, M., Gibor, A., 1990, Preparation of Alginate Lyases from Marine Molluscs for Protoplast Isolation in Brown Algae, Phycologia, 29, 173-181.

Bradford, M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein Dye-binding, Anal. Biochem., 72, 248-254.

Brock, T.D., 2003, Great Events in Microbiology: Significant Events of The Last 125 Years. www.scientifichistory.com (erişim tarihi 08.04.2005).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Brock, T.D. ve Madigan, M.T., 1994, Biology of Microorganisms, Seven Edition, Prenice-Hall International Inc. 899.

Brown, M.J. ve Lester, J.N., 1980, Comparison of Bacterial Extracellular Polymer Extraction Methods, Appl Environ Microbiol., 40, 179-185.

Brown, M.R.W. ve Barker, J., 1999, Unexplored Reservoirs of Pathogenic Bacteria: Protozoa and Biofilms, Trends Microbiol, 7, 46-50.

Bryant, M.P., Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S., 1967, Methanobacillus Omelianskii, A Symbiotic Association of Two Species of Bacteria, Arch. Microbiol., 59, 20-31.

Buret, A., Ward, K.H., Olson, M.E., Costerton, J.W., 1991, An In vivo Model to Study The Pathobiology of Infectious Biofilms on Biomaterial Surfaces, J. Biomed. Mat. Res., 25(7), 865-874.

Burke V. ve Gracey, M., 1986, *Aeromonas* Species in Human Diarrheal Disease, J. Gastroenterol. Hepatol., 1, 237-249.

Calazans G. M. T., Lopes C. E., Lima R. M. O. C., de Franc FP., 1997, Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strains, Biotechnol Lett, 19, 19-21.

Camara M., Williams P., Hardman A., 2002, Controlling Infection by Tuning in and Turning Down The Volume of Bacterial Small-talk, Lancet Infect Dis., 2(11), 667-676.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Castro, G.R., Baigori, M.D., Sineriz, F., 1995, A Plate Technique for Screening of Inulin Degrading Microorganisms, J. Microbiol. Methods, 22, 51-56.

Cateau, E., Berjeaud, J.M., Rodier, M.H., Imbert, C., 2008, Fungal Biofilm Inhibition by a Component Naturally Produced by *Candida albicans* Yeasts Growing as a Biofilm, International Journal of Antimicrobial Agents, 31, 166-170.

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, Y., 1992, Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria, J Dairy Sci 75, 692-699.

Cerning J, Renard CM, Thibault JF, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud M, Topisirovic L., 1994, Carbon Source Requirements for Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer, Appl Environ Microbiol., 60(11), 3914-3919.

Chapman, J.S., 1998, Characterizing Bacterial Resistance to Preservatives and Disinfectants. International Biodeterioration and Biodegradation, 41, 241-245.

Chapman, J.S., 2003, Disinfectant Resistance Mechanisms, Cross-resistance, and Co-resistance, Int Biodet Biodeg, 51, 271-276.

Characklis, W. G., 1990, Microbial Fouling In: W. G. Characklis and K. C. Marshall (Eds.) Biofilms, John Wiley and Sons New York, 523-584.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Chauret, C., Volk, C., Creason, R., Jarosh, J., Robinson, J., Warnes, C., 2001, Detection of *Aeromonas hydrophila* in A Drinking System: A Field and Pilot Study, Can J Microbiol, 47, 782-786.

Chen, X., Schauder, S, Potier, N., Dorssejer, A.V., Pelczer, I., Bassler, L.B., Hugson, M.F., 2002, Sctructural Identification of A Quorum-sensing Signal Containing Boron, Nature, 415, 545.

Cho, J.C. ve Tiedje, M.J., 2001, Bacterial Species Determination from DNA-DA Hybridization by Using Genome Fragments and DNA Microarrays, Applied and Environmental Microbiology, 67, 3677-3682.

Christensen, B.E., 1989, The Role of Extracellular Polysaccharides in Biofilms, J Biotechnol, 10, 181-202.

Christensen, B.E. ve Characklis, W.G., 1990, Physical and Chemical Properties of Biofilms. In: W. G. Characklis and K. C. Marshall (Eds.) Biofilms, John Wiley and Sons New York, 93-130.

Cloete, T.E. ve Brözel, V.S., 1992, Practical Aspects of Biofouling Control in Industrial Water Systems, Int Biodet Biodegrad, 29, 299-341.

Cloete, T.E., 2003, Resistance Mechanisms of Bacteria to Antimicrobial Compounds, International Biodeterioration&Biodegradation, 51, 277-282.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Cole, S.P., Harwood, J., Lee, R., She, R., Guiney, D. G. 2004, Characterization of Monospecies Biofilm Formation by *Helicobacter pylori*, J. Bacteriol., 186, 3124-3132.

Conti, E., Flaibani, A., O'Regan, M., Sutherland, I., 1994, Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P.putida*: Production and Properties, Microbiology, 140, 1125-1132.

Cooksey, K. E., 1992, Extracellular Polymers in Biofilms, Biofilms-science and Technology, Nato ASI series, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Belgium.

Corpe, W.A., 1964, Factors Influencing Growth and Polysaccharide Formation by Strains of *Chromobacterium violaceum*, J. Bacteriol., 88, 1433.

Corpe, W.A., 1975, Metal-binding properties of surface materials from marine bacteria. Dev. Ind. Microbial. 16: 249-255.

Corpe, W.A. ve Jensen, T.E., 1996, The diversity of bacteria, eukaryotic cells and viruses in an oligotrophic lake, Applied Microbiology and Biotechnology, 46(5-6), 622-630.

Costerton, J.W., 1993, Structure of Biofilms, 1-13, Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems, Geesey, G.G., Lewandowski, Z., Fleming, H.C., ISBN: 0-87371-928-X/087371928X Chapter 1, Lewis Publishers, USA.

Costerton, J.W., 1999, Introduction to Biofilm, Int J Antimic Agents, 11, 217-221.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999, Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, *Science*, 284, 18-22.

Costerton, J.W. ve Stewart, P.S., 2001, Battling biofilms, *Sci Am.*, 285(1), 74-81.

Crescenzi, V., Dentini, M., Coviello, T., 1991, Solution and Gelling Properties of Polysaccharide Polyelectrolytes, *Biophysical Chemistry*, 41, 61-71.

Cunliffe, D., Smart, C.A., Alexander, C., Vulfson, E.N., 1999, Bacterial Adhesion at Synthetic Surfaces, *Appl Environ Microbiol*, 65, 4995-5002.

Çetin, E.T., 1983, Endüstriyel Mikrobiyoloji, İstanbul Üniv. Tıp Fak. Yayın No:2(1), 418.

Çotuk, A., 1990, İstanbul Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Mikrobiyoloji Ders Notları, İstanbul, 95.

Çotuk, A. ve Anđ-Küçüker, M., 1995, Biyologlar İçin Mikrobiyoloji Laborayuvur Klavuzu, 2. baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, 128.

Dahlberg, C., Linberg, C., Torsvik, V.L., Hermansson, M., 1997, Conjugative Plasmids Isolated from Bacteria in Marine Environments Show Various Degrees of Homology to Each Other and are not Closely Related to Well-characterized Plasmids, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4692-4697.

Dale, J.W. ve Schantz, M.V., 2002, From Genes to Genomes Concepts and Applications of DANN Technology, John Wile&Sons Ltd., Chichester, 360p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Danese, P.N., 2002, Antibiofilm Approaches: Prevention of Catheter Colonization. Chemistry & Biology, 9, 873-880.

Davey, M.E. ve Ootoole, G.A., 2000, Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(4), 847-867.

Davies, D.G., Psarsek, R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998, The Involvement of Cell-to-cell Signals in The Development of A Biofilm, Science, 280, 295-298.

Davison, J., 1999, Genetic Eexchange Between Bacteria and Environment, Plasmid,.42, 73-91.

De Beer, D. ve Stoodley, P., 1994, Microbial Biofilms, in: Prokaryotes. Springer-Verlag Press, Berlin, 342.

Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2005, Genel Mikrobiyoloji Laboratuvarı, 2. baskı, Karadeniz Teknik Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl., Trabzon, 158.

Dempsey, K.E., Riggio, M.P., Lennon, A., Hannah, V.E., Ramage, G., 2007, Identification of Bacteria on The Surface of Clinically Infected and Non-infected Prosthetic Hip Joints Removed During Revision Arthroplasties by 16S rRNA Gene Sequencing and by Microbiological Culture, Arthritis Research & Therapy, 9(3), 1-11.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Denholm, E.M., Lin, Y.Q., Silver, P.J., 2001, Anti-tumor Activities of Chondroitinase AC and Chondroitinase B: Inhibition of Angiogenesis, Proliferation and Invasion, *Eur. J. Pharmacol.*, 416, 213-221.

Denny T. P., 1995, Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33, 173-197.

Dinwiddie, R., 2000, Pathogenesis of Lung Disease in Cystic Fibrosis, *Respiration*, 67, 3-8.

Dong, Y.H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L., Zhang, L.H., 2002, Identification of Quorum-Quenching *N*-Acyl Homoserine Lactonases from *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4),1754-1759.

Dong, Y.H. ve Zhang, L.H., 2005, Quorum Sensing and Quorum Quenching - Enzymes, *J. Microbiol*, 43, 101.

Donlan, R.M., 2001, Biofilms and Device Associated Infections, *Emerg Infect Dis.*, 7, 277-281.

Donlan, R.M., 2002, Biofilms:Microbial Life on Surfaces, *Emerging Infectious Disease*, 8(9), 881-890.

Donlan, R.M. ve Costerton, J.W., 2002, Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Cli Microbiol Rev*, 15, 167-193.

Douglas, L.J., 2003, *Candida* Biofilms and Their Role in Infection, *Trends in Microbiol.*, 11, 30-36.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Dow, J.M., Dow, J.M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.Q., Feng, J.X., Tang, J.L., 2003, Biofilm Dispersal in *Xanthomonas campestris* is Controlled by Cell-cell Signaling and is Required for Full Virulence to Plants, Proc. Natl. Acad. Sci., 100, 10995-11000.

Drevetton, E., Monot, F., Ballerni, D., 1994, Effect of Mixing and Mass Transfer Conditions on Gellan Production by *P. elodea*, J Fermentation Bioeng., 77, 642-649.

DSM., 1991, Scientific Services of Culture Collection, The DSM-Experience, Campinas, Sao Paulo, Brasil.

Dubois, M., Gilles, A.K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Anal. Chem., 28, 350-356.

Duguid, J.P. ve Wilkinson, J.F., 1953, The Influence of Culture Conditions on Polysaccharide Production by *Aerobacter aerogenes*, J. Gen. Microbiol., 9, 174.

Dunne, M.W., 2002, Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?, Cli. Microbiol Rev, 15, 155-166.,

Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C., Stewart, G.S., Christiansen, G., Chhabra, S.R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S., Givskov, M., 1996, Involvement of N-acyl-L-homoserine Lactone Autoinducers in Controlling The Multicellular Behaviour of *Serratia liquefaciens*, Mol. Microbiol., 20, 127-136.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Edstrom Industry Press, 2003, Biofilm, <http://www.edstrom.com> (erişim tarihi:19.01.2005)

Ehlers, L.J. ve Bouwer, E.J., 1999, RP4 Plasmid Transfer Among Species of *Pseudomonas* in A Biofilm Reactor, Water Sci.Technol., 7, 163-171.

Emtiazi, F., Schwartz, T., Marten, S.M., 2004, Investigation of Natural Biofilms Formed during The Production of Drinking Water from Surface Water Embankment Filtration, Water Research, 38, 1197-1206.

Fang, H.H.P., Xu, L., Chan, K., 2002, Effect of Toxic Metals and Chemicals on Biofilm and Biocorrosion, Wat Res, 36, 4709-4716.

Farrah, S.R. ve Unz, R.F., 1976, Isolation f Exocellular Polymer from *Zooglea* Strains MP6 and from Activated Sludge, Appl. and Env. Microbiol., 32, 33-37.

Fett, W.F., Osman, F.S., Dunn, M.F., 1989, Characterization of Exopolysaccharide Produced by Plant-Associated Fluorescent *Pseudomonads*, Appl. and Env. Microbiol., 55, 579-583.

Fett, W.F., Wells, J.M., Cescutti, P., Wijeyi, C., 1995, Identification of Exopolysaccharides Produced by Fluorescent *Pseudomonads* Associated with Commercial Mushroom (*Agaricus bisporus*) Production, Appl Envir Microbiol., 61(2), 513-517.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Flavier, B.A., Clough, J.S., Schell, A.M., Denny, P.T., 1997, Identification of 3-hydroxypalmitic Acid Methyl Ester as A Novel Autoregulator Controlling Virulence in *Ralstonia solanacearum*, Mol. Microbiol., 26, 251.

Flemming, H.C., 1995, Sorption Sites in Biofilms, Wat. Sci. Tech., 32(8), 27-33.

Flemming, H.C. ve Wingender, J., 2001, Relevance of Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPSs)-Part II: Technical aspects, Wat Sci Tech, 43, 9-16.

Fishman, M.L., Cescutti P., Fett, W.F., Osman, S.F., 1997, Screening The Physical Properties of Novel *Pseudomonas* exopolysaccharides by HPSEC with Multi-angle Light Scattering and Viscosity Detection, Carbohydrate Polymers, 32, 213-221.

Ford, T., Sacco, E, Black, J., Goodacre, R, Berkeley, R.C.W., Mitchell, R., 1991, Characterization of Exopolymers of Aquatic Bacteria by Pyrolysis-Mass Spectrometry, Appl. and Env. Microbiol., 57, 1595-1601.

Francolini, I., Donelli, G., Stoodley, P., 2003, Polymer Designs to Control Biofilm Growth on Medical Devices, Rev Environ Sci Biotechnol., 2, 307-319.

Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A., Gómez, E., 2000, Xanthan Gum: Production, Recovery, and Properties, Biotechnol. Adv., 270(7), 1365-1380.

Gacesa, P. ve Wusteman, F.S., 1990, Plate Assay for Simultaneous Detection of Alginate Lyases and Determination of Substrate Specificity, Appl Envir Microbiol., 56(7), 2265-2267.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Gerhardt, P. ve ark., 1981, Manual of Methods for General Bacteriology, Gerhardt, P., et al. (Eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C., 791.

Gerhardt, P. ve Drew, S.W., 1994, P. Gerhardt and S.W. Drew, Liquid culture. In: P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood and N.R. Krieg, Editors, Methods for General and Molecular Bacteriology, ASM Press, Washington, DC (1994), pp. 224-247.

Ghigo, J.M., 2001, Natural Conjugative Plasmids Induce Bacterial Biofilm Development, Nature, 412, 442-445.

Gilbert, P., McBain, A.J., Rickard, A.H., 2003, Formation of Microbial Biofilm in Hygienic Situations: A Problem of Control, Int Biodet Biodeg, 51, 245-248.

Gimmestad, M., Sietta, H., Ertesvag, H., Bakkevig, K., Jain, S., Suh, S.J., Skjak-Braek, G., Ellingsen, T.E., Ohman, D.E., Valla, S., 2003, The *Pseudomonas fluorescens* AlgG Protein, but not Its Mannuronan c-5-epimerase Activity, is Needed for Alginate Polymer Formation, J. Bacteriol., 185(12), 3515-3523.

Giroldo, D., Vieira, A.A.H., Pausen, B.S., 2005, Extracellular Polysaccharides Produced by A Tropical Cryptophyte as A Carbon Source for Natural Bacterial Populations, Eur. J. Phycol., 4(3), 241-249.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Gonzales, J.M. ve Weiner, R.M., 2000, Phylogenetic characterization of marine bacterium strain 2-40, a degrader of complex polysaccharides, Int J of Systematic and Evolutionary Microbiol., 8, 831-834.

Gonzalez, I.N., Wanga, E.T., Ramirez, F., Romeroc, J.M., Hernandez-Rodriguez, C., 2006, Characterization of Bacterial Community Associated to Biofilms of Corroded Oil Pipelines from The Southeast of Mexico, Anaerobe, 12, 122-133.

Greenberg, E.P., 1997, Quorum sensing in gram-negative bacteria, ASM News, 63(7), 371-377.

Grobben, G.J., Van-Casteren, W.H.M., Schols, H.A., Oosterveld, A., Sala, G, Smith, M.R., Sikkema, J., De Bont, J.A.M., 1997, Analysis of The Exopolysaccharides Produced by *L.delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772 Grown in Continuous Culture on Glucose and Fructose, Appl Microbiol Biotechnol., 48, 516-521.

Gözükara, E.M., 1994, İnönü Üniv. Tıp. Fak. Yayınları, Yayın No:34, 98.

Gugliandola C., Maugeri TL., Cacamo D., Stackebrandt E., 2003, *Bacillusaeolius* sp. Nov a Novel Thermophilic, Holophilic Marine *Bacillus* Species from Eolian Islands (Italy), Systematic and Applied Microbiology, 26(2), 172-176.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Jääskeläinen, A.S., Sun Y., Argyropoulos, D.S., Tamminen, T., Hortling, B., 2003, The Effect of Isolation Method on The Chemical Structure of Residual Lignin, *Wood Sci Technol.*, 37, 91-102.

Hall-Stoodley, L. ve Stoodley P., 2002, Developmental Regulation of Microbial Biofilms, *Environ. Biotechnol.*, 13, 228-233.

Hallam, N.B., West, J.R., Forster, C.F., Simms, J., 2001, The Potential for Biofilm Growth in Water Distribution Systems, *Wat. Res.*, 35, 4063-4071.

Hamai, A., Hashimoto, N., Mochizuki, H., Kato, F., Makiguchi, Y., Horie, K., Suzuki, S., 1997, Two Distinct Chondroitin Sulfate ABC Lyases, *J. Biol. Chem.*, 272, 9123-9130.

Hankin, L. ve Anagnostakis, S.L., 1977, Solid Media Containing Carboxymethylcellulose to Detect Cellulase Activity of Microorganisms, *J. Gen. Microbiol.*, 98, 109-115.

Harris, A., 2000, Problems Associated with Biofilms in Cooling Tower Systems, 139-144, *Biofilms in The Aquatic Environment*, Keevil, C.V., Godfree, A., Holt, D., Dow, C., ISBN 0-85404-758-1, Springer-Verlag, New York, 125.

Hashimoto, W., Sato, N., Kimura, S., Murata, K., 1998, Polysaccharide Lyase: Molecular Cloning of Gellan Lyase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 354(1), 31-39.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Hashimoto, W., Miki, H., Tsuchiya, N., Nankai, H., 2001, Polysaccharide Lyase: Molecular Cloning, Sequencing, and Overexpression of the Xanthan Lyase Gene of *Bacillus* sp. Strain GL1, Applied and Environmental Microbiology, 67(2), 713-720.

Hatch, R.A. ve Schiller, N.L., 1998, Alginate Lyase Promotes Diffusion of Aminoglycosides Through The Extracellular Polysaccharide of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrob. Agents Chemother., 42, 974-977.

Hausner, M. ve Wuertz, S., 1999, High Rates of Conjugation in Bacterial Biofilms as Determined by In-situ Analysis, Appl.Environ.Microbiol., 65, 3710-3713.

Hentzer M. ve Givskov M., 2003, Pharmacological Inhibition of Quorum Sensing for The Treatment of Chronic Bacterial Infections, J Clin Invest., 112(9), 1300-1307.

Herasimenka, Y., Cescutti, P., Impallomeni, G., Campana, S., 2007, Exopolysaccharides Produced by Clinical Strains Belonging to The *Burkholderia cepacia* Complex, Journal of Cystic Fibrosis 6, 145-152.

Hermansson, M., 1999, The DLVO Theory in Microbial Adhesion, Colloids Surfaces, 14, 105-119.

Hibiya, K., Nagai, J., Tsuneda, S., Hirata, A., 2004, Simple Prediction of Oxygen Penetration Depth in Biofilms for Wastewater Treatment, Biochem. Eng. J., 19, 61-68.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Hilario, E., Buckley, T.R. ve Young, J.M., 2004, Improved Resolution of The Phylogenetic Relationships among *Pseudomonas* by The Combined Analysis of *atpD*, *carA*, *recA* and 16S rDNA, *Antonie Leeuwenhoek*, 86, 51-64.

Hino, S., Watanabe, K., Takahashi, N., 1997, Isolation and Characterization of Slime-Producing Bacteria Capable of Utilizing Petroleum Hydrocarbons as a Sole Carbon Source, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(6), 528-531.

Hope C.K. ve Wilson, M., 2006, Biofilm Structure and Cell Vitality in A Laboratory Model of Subgingival Plaque, *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 390-398.

Horan, N.J. ve Eccles, C.R., 1986, Prufication and Characterization of Extracellular Polysaccharide from Activated Sludes, *Wat. Res.*, 20, 1427-1432.

Horan, N.J., Bu'Ali, A.M., Eccles, C.R., 1988, Isolation, Identification and Characterizaton of Filamentous and Floc-Forming Bacteria fom Activated sludge Flocs, *Environ. Tech. Let.*, 9, 449-457.

Hsueh, P.R., Teng, L.J., Yang, P.C., Chen, Y.C., Pan, H.J., Ho, S.W., Luh, K.T., 1998, Nosocomial Infections Caused by *Sphingomonas paucimobilis*: Clinical Features and Microbiological Characteristics, *Clin. Infect. Dis.*, 26, 676-681.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., 2001, The cep Quorum-sensing System of *Burkholderia cepacia* H111 Controls Biofilm Formation and Swarming Motility, Microbiology, 147, 2517-2528.

Hussain, M., Wilcox, M.H., White, P.J., 1993, The Slime of Coagulase Negative Staphylococci: Biochemistry and Relation to Adherence, FEMS Microbiol., 10, 191-207.

Ivnitsky, H., Katz, I., Minz, D., Volvovic, G., Shimon, E., Kesselman, E., Semiat R., Dosoretz, C.G., 2007, Bacterial Community Composition and Structure of Biofilms Developing on Nanofiltration Membranes, Applied to Wastewater Treatment Water Research, 41(17), 3924-3935.
Iyer, A., Mody, K., Jha, B., 2006, Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide, Enzyme and Microbiol Tech., 38, 220-222.

Jafr, S. ve Wolf, J.M., 2004, Fast Screening Method for Detection of Acyl-HSL-Degrading Soil Isolates. Journal of Microbiological Methods, 57(3):415-420.

James, G.A., Beaudette, L., Costerton, J.W., 1995, Interspecies Bacterial Interactions in Biofilms, J. Industrial Microbiology, 15, 257-262.

Jedrzej, M.J., 2000, Structural and Functional Comparison of Polysaccharide-Degrading Enzymes, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 35(3), 221-251.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Jedrzejask, M.J., Mello, L.V., DeGroot, B.L., Li, S., 2002, Mechanism of Hyaluronan Degradation by *Streptococcus pneumoniae* Hyaluronate Lyase: Structures of Complexes with The Substrate, J. Biol. Chem., 277(31), 28287-28297.

Jefferson, K.K., 2004, What Drives Bacteria to Produce A Biofilm?, FEMS Microbiol. Lett., 236, 163-173.

Jenkinson, H.F. ve Lapin-Scott, H.M., 2000, Biofilms Adhere to Stay, Trends Microbiol., 9, 9-10.

Johansen, C., Falholt, P., Gram, L., 1997, Enzymatic Removal and Disinfection of Bacterial Biofilm. Appl Environ Microbiol., 63(37), 24-28.

Johri, A.K., Blank, W., Kaplan, D., 2002, Bioengineered Emulsans from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 Transposon Mutants, Appl. Microbiol. Biotechnol., 59(2-3), 217-223.

Kaiser, D., 1996, Bacteria Also Vote, Science, 272, 1598-1599.

Karaboz, İ. ve Sukatar A., 2004, Bakterilerde Sosyal Davranışlar (Bakterilerde İletişim Mekanizmaları), 02(05), 23-32.

Karlicki, A.P., 2002, Biofilm Inactivation in Secondary Disinfection, Master of Engineering thesis, Dalhousie University, 99.

Kawai, F., 1999, *Sphingomonads* Involved in The Biodegradation of Xenobiotic Polymers, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 23, 400-407.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Kelly, K.M. ve Chistoserdov, A.Y., 2001, Phylogenetic Analysis of The Succession of Bacterial Communities in The Great South Bay (Long Island), FEMS Microbiol. Ecol., 35, 85-95.

Kenne L., ve Lindberg B., 1983, The Polysaccharides, in Aspinall G.O., ed., vol. 2, Academic Press, New York, 287-363.

Kennedy, L. ve Sutherland, I. W., 1994, Gellan Lyases-Novel Polysaccharide Lyases, Microbiol., 140, 3007-3013.

Kılıç, S. ve Karagözlü, C., 1996a, Ekzopolisakkaritler I: Ekzopolisakkarit Üreten Laktik Asit Bakterileri ve Polisakkaritlerin Biyokimyası, Ege Üniv. Ziraat Fak. Dergisi, 33(2-3), 231-238.

Kılıç, S. ve Karagözlü, C., 1996b, Ekzopolisakkaritler II:Yapısı ve işlevleri, Ege Üniv. Ziraat Fak. Dergisi, 33(2-3), 239-241.

Kılıç, N.K. ve Dönmez, G., 2007, Environmental Conditions Affecting Exopolysaccharide Production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp., Journal of Hazardous Materials, 12, 154-160.

Kim, S.K., Kong, I.S., Kwon, K.J., Rha, C.,Shinskey, A.J., Ong, J.Y., 1994, Exopolysaccharides Produce by *Z. ramigera* Mutants and Analysis of Structural Change by Solution Properties, Bitechology Letters, 16, 789-794.

Kiredjian, M., Holmes, B., Kersters, K., Guilvout, I., De Ley, J., 1986, *Alcaligenes piechaudii*, A New Species from Human Clinical Specimens and The Environment, Int. J. Syst. Bacteriol., 36, 282-287.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Kjelleberg, S. ve Molin, S., 2002, Is There A Role for Quorum Sensing Signals in Bacterial Biofilms?, Curr Opinion Microbiol, 5, 254-258.

Kluyver A.J., 1956, *Pseudomonas aureofaciens* Nov. Spec. and Its Pigments, Journal of Bacteriology, 72, 406-411.

Krieg, N.R. ve Holt, C.G., 1984, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, Williams&Wilkins Press, Baltimore, 787.

Kohler, T., Curty, L., Barja, F., Delden, C., Pechère, J.C., 2000, Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is Dependent on Cell-to-cell Signaling and Requires Flagella and Pili, J. Bacteriol., 182, 5990-5996.

Komlos, J., Cunningham, A.B., Sharp, R.R., 1999, Population Dynamics in A Multi Species Biofilm for The Creation of A Reactive Biobarrier, Conference on Hazardous Waste Research, <http://www.erc.montana.edu>.

Kurahashi, M. ve Yokota, A., 2007, *Endozoicomonas elysicola* gen. nov., sp. nov., A Proteobacterium Isolated from The Sea Slug Elysia Ornata, Systematic and Applied Microbiology, 30, 202-206.

Kwon, K.J., Park, K.J., Kim, J.D., Kong, J.Y., Kong, I.S., 1994, Isolation of Two Different Polysaccharides from Halophilic *Zooglea sp.*, Biotechnology Letters, 16, 783-788.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Kwon, K.K., Lee, H.S., Jung, S.Y., Yim, J.H., Lee, J.H., Lee, H.K., 2002, Isolation and Identification of Biofilm-Forming Marine Bacteria on Glass Surfaces in Dae-Ho Dike, Korea, *The Journal of Microbiology*, 40(4), 260-266.

Labbate, M., Qec, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2004, Quorum Sensing-controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1, *J. Bacteriol*, 186, 692.

Lagatolla, C., Skerlavaj, S., Dolzani, L., Tonin, E.A., Bragadin, C.M., 2002, Microbiological Characterisation of *Burkholderia cepacia* Isolates from Cystic Fibrosis Patients: Investigation of The Exopolysaccharides Produced, *FEMS Microbiology Letters*, 209, 99-106.

Långmark, J., 2004, Biofilms and Microbial Barriers in Drinking Water Treatment and Distribution, Phd Thesis, Department of Land and Water Resources Engineering Royal Institute of Technology, Sweden, 67.

Lawman, P. ve Bleiweis, A.W., 1991, Molecular Cloning of The Extracellular Endodextranase of *Streptococcus salivarius*, *J. Bacteriol.*, 173, 7423-7428.

Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W., Caldwell, D.E., 1991, Optical Sectioning of Microbial Biofilms, *J. Bacteriol.*, 173(20), 6558-6567.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Lazaridou, A., Roukas, T., Biliaderis, C.G., Vaikousi, H., 2002, Characterization of Pullulan Produced from Beet Molasses by *Aureobasidium pullulans* in A Stirred Tank Reactor under Varying Agitation, Enzyme and Microbial Technology, 31, 122-132.

Lazarova, V. ve Manem, J., 1995, Biofilm Characterization and Activity Analysis in Water and Wastewater Treatment, Water Res., 29, 2227-2245.

Lebaron, P., Bauda, P., Lett, M.C., Duval-Iflah, Y., Simonet, P., Jacq, E., Frank, N., Roux, B., Baleux, B., 1997, Recombinant Plasmid Mobilization Between *E.coli* Strains in Seven Sterile Microcosms., Can. J. Microbiol., 43, 534-540.

Lebuhn, M., Achouak, W., Schloter, M., Berge, O., Meier, H., Barakat, M., 2000, Taxonomic Characterization of *Ochrobactrum* sp. Isolates from Soil Samples and Wheat Roots, and Description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov., Int. J. Syst. Evol., Microbiol., 50, 2207-2223.

Lechevalier, M.W., Cawthon, C.D., Lee, R.G., 1988, Inactivation of Biofilm Bacteria, Appl. Environ. Microbiol., 54, 2492-2499.

Lee I.Y., Seo W. T., Kim G. J., Kim M. K., Ahn S. G., Kwon G. S., Park Y. H., 1997, Optimization of Fermentation Conditions for Production of Exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*, Bioprocess and Biosystems Engineering, 16(2), 71-75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Lee, Y.K., Kwon, K.K., Cho, K.H., Kim, H.W., Park, J.H., Lee, H.K. 2003. Culture and Identification of Bacteria from Marine Biofilms, *The Journal of Microbiology*, 41(3), 183-188.

Lejeune, P., 2003, Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol.*, 11(4), 179-184.

Leriche, V., Sibille, P., Carpentier, B., 2000, Use of ELISA to Monitor The Shift in Polysaccharide Composition in Bacterial Biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1851-1856.

Leroy, C., Delbarrea, C., Ghillebaert, F., Comperec, C., Combes, D., 2008, Effects of Commercial Enzymes on The Adhesion of A Marine Biofilm-forming Bacterium, *Biofouling*, 24(1), 11-22.

Leung, K. ve Topp, E., 2001, Bacterial Community Dynamics in Liquid Swine Manure during Storage: Molecular Analysis Using DGGE/PCR of 16S rDNA, *FEMS Microbiology Ecology*, 38, 169-177.

Li, S., ve Jedrzejewski, M.J., 2001, Hyaluronan Binding and Degradation by *Streptococcus agalactiae* Hyaluronate Lyase, *J. Biol. Chem.*, 276, 41407-41416.

Lindberg, L.E., Holmbom B.R., Väisänen O.M., Weber A.M.L., Salkinoja, S., Kelly S.J., Lamani E., 2000, Structural Basis of Hyaluronan Degradation by *Streptococcus pneumoniae* Hyaluronate Lyase, *EMBO J.*, 19, 1228-1240.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Lindberg, L.E., Holbom, B.R., Väisänen, O.M., Weber, A.M.L., Salkinoja-Salonen, M.S., 2001, Sugar Composition of Biofilms Produced by Paper Mill Bacteria, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 55, 638-643.

Lindsay, D., Brozel, V.S., Mostert, J.F., von Holy, A, 2002, Differential Efficacy of A Chlorine Dioxide-containing Sanitizer Against Single Species and Binary Biofilms of A Dairy Associated *B.cereus* and *P.fluorescens* Isolate, *J. Apl. Microbiol.*, 92, 352-61.

Linnerborg, M., Weintraub, A., Albert, M. J., Widmalm, G., 2001, Depolymerization of The Capsular Polysaccharide from *Vibrio cholerae* O139 by A Lyase Associated with The Bacteriophage JA1, *Carbohydr. Res.*, 333, 263-269.

Liu, Y. ve Tay, J.H., 2001, Strategy for Minimization of Excess Sludge Production from The Activated Sludge Process, *Biotechnology Adverbs*, 19(2), 97-107.

Liu, B., Li, H., Wu, S., Zhang, X., 2006, A Simple and Rapid Method for The Differentiation and Identification of Thermophilic Bacteria, *Can J. Microbiol.*, 52(8), 753-758.

Lo, Y.M., Yang, S.T., Min, D.B., 1997, Effects of Yeast Extract and Glucose on Xanthan Production and Cell Growth in Batch Culture of *Xanthomonas campestris*, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 47, 689-694.

Loosdrecht, M.C.M, Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J.B., 1990, Influence on Interfaces on Microbial Activity, *Microbiol Rev*, 54, 75-87.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., 2002, The Regulation of Biofilm Development by Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila*, Environ. Microbiol., 4, 18-28.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2000, Brock Biology of Microorganisms, Ninth Edition, Prentice-Hall International Inc., 991.

Mah, T.F.C. ve O'toole, G.A., 2001, Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents, Trends Microbiol, 9, 34-39.

Manca De Narda, M.C., Strasser De Saad, A.M., Pesce de Ruiz Holgado, A.A., Olivier, G., 1985, Extracellular Polysaccharide Production by *Lactobacillus bulgaricus* CRL 420, Milchwissenschaft, 40, 409-411.

Manefield, M., De Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., Jelleberg, S., 1999, Evidence That Halogenated Furanones from *Delisea pulchra* Inhibit Acylated Homoserine Lactone (AHL)-mediated Gene Expression by Displacing The AHL Signal from Its Receptor Protein, Microbiology, 145, 283-291.

Manzoni, M., Bergomi, S., Molinari, F., Cavazzoni, V., 1996, Production and Purification of an Extracellularly Produced K4 Polysaccharide from *Escherichia coli*, Biotechnology Letters, 18, 383-386.

Mara, D. ve Horan, N., 2003, The Handbook of Water and Wastewater Microbiology, Part 39: Microbial Response to Disinfectants, Morato, J., Mir, J., Codony, F., Mas, J. ve Ribas F., Academic press, Elsevier, 657-693.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Marsh, P.D. ve Bowden, G.H.W., 2000, Microbial community interactions in biofilms. In: D.G. Allison, P. Gilbert, H.M. Lappin-Scott and M. Wilson, Editors, SGM Symposium 59: Community Structure and Co-Operation in Biofilms, Cambridge University Press, Cambridge, p. 167-198.

Marotta, M., Martino, A., De Rosa, A., Farina E., 2002, Degradation of Dental Plaque Glucans and Prevention of Glucan Formation Using Commercial Enzymes. Process Biochemistry, 38(1):101-108.

Matiz, A., Torres, C., Poutou, R.A., 2002, Produccion de Etanol Con Celulas Inmovilizadas de *Zymomonas mobilis spp.*, Mvz-Cordoba, 7(2), 216-223.

Matsuda, K. ve Kobayashi, M., 1978, Biosynthesis of Dextrans and Their Applications, Hakko To Kuyyo, 36, 11.

May, T.B. ve Chakrabarty, A.M., 1994, *Pseudomonas aeruginosa*: Genes and Enzymes of Alginate Synthesis, Trends in Microbiology, 2, 151-157.

McCabe, K.M., Zhang, Y.H., Huang, B.L., Wagar, E.A., McCabe, E.R.B., 1999, Bacterial Species Identification after DNA Amplification with a Universal Primer Pair, Molecular Genetics and Metabolism, 66, 205-211.

McCleary, B.V., 1988, Soluble, Dye-labelled Polysaccharides for The Assay of Endohydrolases, Methods Enzymol., 160, 74-86.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Meesters, K.P.H, Groenestjin, J.W., Gerritse, J., 2003, Biofouling Reduction in Recirculating Cooling Systems Through Biofiltration of Process Water, *Wat Res*, 37, 525-532.

Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B., 1993, Biofilms-Science and Technology, Kluwer Academic Publishers, London, 720.

Melton, L.D., Mindt, L., Rees, D.A., Sanderson, G.A., 1976, *Carbohydr. Res.*, 46, 245-257.

Merritt, J., Qi, F., Goodman, S.D., Anderson, M.H., Shi, W., 2003, Mutation of luxS Affects Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*, *Infect. Immun.*, 71, 1972-1979.

Meyer, B., 2003, Approaches to Prevention, Removal and Killing of Biofilms, *Int Biodeter Biodegr*, 51, 249-253.

Michaud, P., Da Costa, A., Coutois, B., Courtois, J., 2003, Polysaccharide Lyases: Recent Developments as Biotechnological Tools, *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(4), 233-266.

Mikolajczak, M.J., Thorne, L., Pollock, T.J., Armentrout, R.W., 1994, Sphinganase, A New Endoglycanase That Cleaves Specific Members of The Gellan Family of Polysaccharides, *Appl. Environ.Microbiol.*, 60, 402-407.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimmann, C., 2003, Degradation of Pathogen Quorum-sensing Molecules by Soil Bacteria: A Preventive and Curative Biological Control Mechanism, FEMS Microbiology Ecology, 45, 71-81.

Momba, M.N.B., Kfir, R., Venter, S.N., Cloete, T.E., 2000, An Overview of Biofilm Formation in Distribution Systems and Its Impact on The Deterioration of Water Quality, Water SA, 26, 59-66.

Moriello VS., Lama L., Poli A., Gugliandolo C., Maugeri TL., Gambacorta A., Nicolaus B., 2003, Production of Exopolysaccharides from a Thermophilic Microorganism Isolated from a Marine Hot Spring in Flegrean Areas, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30(2), 95-101.

Morisaki, H., Nagai, S., Ohshima, H., Ikemoto, E., Kogure, K., 1999, The Effect of Motility and Cell-surface Polymers on Bacterial Attachment, Microbiol., 145, 2797-2802.

Morton, L.H.G., Greenway, D.L.A., Gaylarde, C.C., Surman, S.B., 1998, Consideration of Some Implications of The Resistance of Biofilms to Biocides, International Biodeterioration&Biodegradation, 41, 247-259.

Morton, L.H.G. ve Gaylarde, C.C., 2001, The Role of Microbial Slimes in Biodeterioration, Culture, 22, 1-4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Murata, K., Inose, T., Hisano, T., Abe, S., Yonemoto, Y., Yamashita, T., Takagi, M., 1993, Bacterial Alginate Lyase: Enzymology, Genetics and Application, J. Ferment. Bioeng., 76, 427-437.

Natsume, M., Kamo, Y., Hirayama, M., Adachi, T., 1994, Isolation and Characterization of Alginate Derived Oligosaccharides with Root Growth Promoting Activities, Carbohydr. Res., 258, 187-197.

Nampoothiri, K.M., Singhanian, R.R., Pandey, A., 2003, Fermentative Production of Gellan Using *Sphingomonas paucimobilis*, Process Biochemistry, 38, 1513-1519.

Nguyen, L.K. ve Schiller, N.L., 1989, Identification of A Slime Exopolysaccharide Depolymerase in Mucoid Strains of *Pseudomonas aeruginosa*, Current Microbiology, 18(5), 323-329.

Nishinari, K., Zhang, H., Ikeda, S., 2000, Hydrocolloid Gels of Polysaccharides and Proteins, Curr. Opin. Colloid. Interf. Sci., 5(3-4), 195-201.

Novak, J.S., Tanenbaum, S.W., Nakas, J.P., 1992, Heteropolysaccharide Formation by *Arthrobacter viscosus* Grown on Xylose Oligosaccharides, Appl. and Env. Microbiology, 58, 3501-3507.

Ojnnaka, C., Jay, A.J., Colquhoun, I.J., Brownsey, G.J., Morris, E.R., Morris, V.J., 1996, Structure and Conformation of Acetan Polysaccharide, Int. J. Biol. Macromol., 19, 149-156.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Oosthuizen, M.C., Steyn, B., Theron, J., Cosette, P., Lindsay, D., Von Holy, A., 2002, Proteomic Analysis Reveals Differential Protein Expression by *Bacillus cereus* During Biofilm Formation, Appl. Environ. Microbiol., 68, 2770-2780.

Ophir, T. ve Gutnick, D.L., 1994, A Role for Exopolysaccharide in The Protection of Microorganisms from Desiccation, Appl. Environ. Microbiol., 60, 740-745.

Orgaz,B., Kives, J., Pedregosa, A.M., Monistrol, I.F., Laborda, F., SanJos, C., 2006, Bacterial Biofilm Removal Using Fungal Enzymes, Enzyme and Microbial Technology, 40, 51-56.

Ortega-Morales, B.O., Santiago-García, J.L., Chan-Bacab, M.J., Moppert, X., 2007, Characterization of Extracellular Polymers Synthesized by Tropical Intertidal Biofilm Bacteria, Journal of Applied Microbiology, 102(1), 254-264

Østgaard, K., 1992, Enzymatic Microassay for The Determination and Characterization of Alginates, Carbohydrate Polymers, 19(1),51-59.

Østgaard, K., 1993, Determination of Alginate Composition by A Simple Enzymatic Assay, Hydrobiologia, 260, 513-520.

Oulahal, N., Martial-Gros, A., Bonneau, M., Blum, L.J., 2007, Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/or a chelating agent, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8, 192-196.

Oxoid, 1991, Selective Microbiology for Foods and Dairy Laboratories, 521.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Pal, S., Manna, A., Paul, A.K., 1999, Production of Poly(β -Hydroxybutyric Acid) and Exopolysaccharide by *Azotobacter beijerinckii* WDN-01, World J Microbiol&Biotechnol., 15, 11-16.

Panilaitis, B., Johri, A., Blank, W., Kaplan, D., Fuhrman, J., 2002, Adjuvant Activity of Emulsan, A Secreted Lipopolysaccharide from *Acinetobacter calcoaceticus*, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 9(6), 1240-1247.

Park, S.Y., Kang, H.O., Jang, H.S., Lee, J.K, 2005, Identification of Extracellular *N*-Acylhomoserine Lactone Acylase from a *Streptomyces* sp. and Its Application to Quorum Quenching, Appl Environ Microbiol., 71(5), 2632-2641.

Parsek, M.R. ve Greenberg, E.P., 2005, Sociomicrobiology:The Connections Between Quorum Sensing and Biofilms, Trends in Microbiology, 13(1), 27-33.

Pearson, J.P., Gray, M.K., Passador, L., Tucker, D.K., Eberhard, A., Iglewski, H.B., Greenberg, P.E., 1994, Structure of The Autoinducer Required for Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes, Proc Natl Acad Sci USA, 91, 197.

Pekin, B., 1977, Fizikokimya Deneyleri, Ege Üniversitesi Yayınları, Cilt II, 89.

Perry, M.B. ve MacLean, L.L., 1994, The Structure of The Polysaccharide Produced by *Proteus vulgaris* (ATCC 49990), Carbohydrate Research, 253, 257-263.

Peter, A., 1999, Biofilm, <http://www.uwic.ac.uk> (erişim tarihi:30.01.2005).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Petit, C., Grill, J.P., Maazouzi, N., Marczak, R., 1991, Regulation of Polysaccharide Formation by *Streptococcus thermophilus* in Batch and Fedbatch Cultures, Appl Microbiol Biotechnol., 36, 216-221.

Pratten, J., Wilson, M. ve Spratt, D.A., 2003, Characterization of In vitro Oral Bacterial Biofilms by Traditional and Molecular Methods, Oral Microbiology and Immunology, 18, 45-49.

Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P., 1999, Abiotic Surface Sensing and Biofilm Dependent Regulation of Gene Expression in *E.coli*, J. Bacteriol., 181, 5993-6002.

Prouty, A.M. ve ark., 2002, Biofilm Formation and Interaction with The Surfaces of Gallstones by *Salmonella spp.*, Infect. Immun., 70, 2640-2649.

Pulcini, E., 2001, The Effects of Initial Adhesion Events on The Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* (Ph.D.Dissertation), Bozeman (MT): Montana State University, In: Donlan, R.M., 2002, Biofilms: Microbial Life on Surfaces, Emerg.Inf.Disease, 8, 881-890.

Puskas, A., Greenberg, E.P., Kaplan, S., Schaefer, A.L., 1997, A Quorum-sensing System in The Free-living Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, J. Bacteriol., 179, 7530-7537.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Raad, I., 1998, Intravascular Catheter-related Infections, *The Lancet*, 351, 893-898.

Ramesh H. P. ve Tharanathan R. N., 2003, Carbohydrates the Renewable Raw Materials of High Biotechnological Value, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23, 149-173.

Randall, R.C., Phillips, G.O., Williams, P.A., 1988, The Role of The Proteinaceous Component on The Emulsifying Properties of Gum Arabic, *Food Hydrocoll.*, 2,131-140.

Rasmussen, T.B., Manefield, M., Andersen, J.B., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Steinberg, P., 2000, How *Delisea pulchra* Furanones Affect Quorum Sensing and Swarming Motility in *Serratia liquefaciens* MG1, *Microbiology* , 146, 3237-3244.

Rasmussen, T.B. ve Givskov, M., 2006, Quorum Sensing Inhibitors: A Bargain of Effects, *Microbiology*, 152, 895-904.

Rättö, M., Mustranta, A., Siika-aho, M., 2001, Strains Degrading Polysaccharides Produced by Bacteria from Paper Machines, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 182-185.

Rättö, M., Suihko, M-L, Siika-aho, M., 2005, Polysaccharide-producing Bacteria Isolated from Paper Machine Slime Deposits, *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 32, 109-114.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Read, R.R. ve Costerton, J.W., 1987, Purification and Characterization of Adhesive Exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *P. fluorescens*, Canadian J Microbiol., 33, 1080-1090.

Rickard, A.H., Leach, S.A., Hall, L.S., Buswell, C.M., 2002, Phylogenetic Relationships and Coaggregation Ability of Freshwater Biofilm Bacteria, Applied and Environmental Microbiology, 3644-3650.

Rickwood, D. ve Hames, B.D., 1982, Gel Electrophoresis of Nucleic Acids a Practical Approach, IR Pres, Washington DC, 242 p.

Roberts, A. P., Pratten, J., Wilson, M., Mullany, P., 1999, Transfer of A Conjugative Transposon, Tn5397 in A Model Oral Biofilm, FEMS Microbiol. Lett., 177, 63-66.

Ronner, A.B. ve Wong, A.L., 1992, Biofilm Developments and Sanitizer Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-N, J.Food Prot., 56, 750-758.

Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., Gutnick, D.L., 1979, Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and Emulsifying Properties, Applied and Environmental Microbiology, 37, 402-408.

Rosenberg, M. ve Kjelleberg, S., 1986, Hydrophobic Interactions in Bacterial Adhesion, Advances in Microbial Ecology, 9, 353-393.

Royan, S., Parulekar, C., Mavinkurve, S., 1999, Exopolysaccharides of *Pseudomonas mendocina* P_{2d}, Letters in Applied Microbiology, 29, 342-346.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Ruijsenaars, H.J., van de Wiel, L.G., Hartmans, S., 1998, Screening for Polysaccharide-degrading Microorganisms, New Frontiers in Screening for Microbial Biocatalysts, Proceedings of An International Symposium held in Ede The Netherlands, 239-245.

Ruijsenaars, H.J. ve Hartmans, S., 2000, Plate Screening Methods for The Detection of Polysaccharase-producing Microorganisms, Appl. Microbiol. Biotechnol., 55, 143-149.

Ruijsenaars, H.J., Stinglele, F., Hartmans, S., 2000, Biodegradability of Food-Associated Extracellular Polysaccharides, Current Microbiology, 40, 194-199.

Rusin, P.A., Rose, J.B., Gerba, C.B., 1997a, Health Significance of Pigmented Bacteria in Drinking Water, Wat Sci Tech, 35, 21-27.

Rusin, P.A., Rose, J.B., Gerba, C.B., 1997b, Risk Assessment of Opportunistic Bacterial Pathogens in Drinking Water, Rev Environ Toxicol., 152, 57-83.

Ryan, C.A. ve Farmer, E.E., 1991, Oligosaccharide Signals in Plants: A Current Assessment, Annu.Rev. Plant Physiol., 42, 651-674.

Saravanan, P., Nancharaiah, Y.V., Venugopalan, V.P., 2006, Biofilm Formation of *Pseudoalteromonas ruthenica* and Its Removal by Chlorine, Biofouling, 22(6), 371-381.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Savado, A., Ouattara, C.A.T., Savado, P.W., Barro, N., Ouattara, A.S., Traoré, A.S., 2004, Identification of Exopolysaccharides-producing Lactic Acid Bacteria from Burkina Faso Fermented Milk Samples, African Journal of Biotechnology, 3(3), 189-194.

Scheuermann, T.R., Camper, A.K., Hamilton, M.A., 1998, Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion, J Colloid Interface Sci, 208, 23-33.

Schenker, A., Popp, G., Papier, G., Schwalbach, E., 1997, Enzyme Additions for Biofilming Control in PM Circuits, Wochenbl Papierfabr, 125, 702-709.

Schmidt, M., Prieme, A., Stougaard, P., 2007, *Arsukibacterium ikkense* gen. nov. sp. nov., A Novel Alkaliphilic, Enzyme-producing Proteobacterium Isolated from A Cold and Alkaline Environment in Greenland, Systematic and Applied Microbiol., 30(1), 197-201.

Schulte, S., 2003, Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid Gegenüber Biofilmen, Thesis (PhD), Duisburg-Essen University, 112.

Shankar S, Ye RW., Schlietman D., Chakrabarty AM., 1995, Exopolysaccharide Alginate Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and Regulation of Gene Expression, Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol., 70, 221-255

Shimada, A., Nakata, H., Nakamura, I., 1997, Acidic Exopolysaccharide Produced by *Enterobacter* sp., J of Ferm and Bioeng., 84(2),113-118.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Shoham, Y. ve Rosenberg, E., 1983, Enzymatic Depolymerization of Emulsan, J. Bacteriol., 156, 161-167.

Simova, E.D., Frengova, G.I., Beshkova, D.M., 2004, Exopolysaccharides Produced by Mixed Culture of Yeast *Rhodotorula rubra* GED10 and Yogurt Bacteria (*Streptococcus thermophilus* 13a + *Lactobacillus bulgaricus* 2-11), J of Appl Microbiol., 97(3), 512-519.

Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, E.P., Welsh, M.J., 2002, A Component of Innate Immunity Prevents Bacterial Biofilm Development, Nature, 417, 552-555.

Singh, R., Paul, D., Jain, R.K., 2006, Biofilms: Implications in Bioremediation, Trends in Microbiology, 14(9), 389-397.

Skjevrak, I., Lund, V., Due, A., Herikstad, H., 2004, Biofilm in Water Pipelines; A Potential Source for Off-flavours in The Drinking Water, Wat Sci Tech, 49, 211-217.

Song, B. ve Leff, L.G., 2005, Identification and Characterization of Bacterial Isolates from The Mir Space Station, Microbiological Research, 160, 111-117.

Souw, P. ve Demain A.L., 1979, Nutritional Studies on Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459, Appl Environ Microbiol., 37, 1186-1192.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Sönmez, E., 1998, Damar İçi Kateter Sepsisi, Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 2, 193-199.

Speybroeck, M.M.P., Bruggeman, G., van Poele, J., van Peel, beef and K.L.I., van Damme, E.J., 1996, Exopolysaccharide-degrading Enzyme and Use of The Same PCT Patent Appl. WO 9631610.

Srikanth, S. ve Berk, S., 1993, Stimulatory Effect of Cooling Tower Biocide on Amoebae, Appl Environ Microbiol, 59, 3245-3249.

Stahl, D.A., Flesher, B., Mansfield, H.R., Montgomery, L., 1988, Use of Phylogenetically Based Hybridization Probes for Studies of Rumenal Ecology, Appl. Environ. Microbiol., 54, 1079-1084.

Stewart, P.S., 2002, Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacterial Biofilms, International Journal of Medical Microbiology, 292(2), 107-113.

Stingele F., Neeser, R.R., Mollet, B., 1996, Identification and Characterization of the EPS (Exopolysaccharide) Gene Cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. J. Bacteriol, 178, 1680-1690.

Storey, M.V. ve Ashbolt, N.J., 2001, Persistence of Two Model Enteric Viruses (B40-8 and MS-2 Bacteriophages) in Water Distribution Pipe Biofilms, Wat Sci Tech, 43, 133-138.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Strathmann, M., Wingender, J., Flemming, H.C., 2002, Application of Fluorescently Labelled Lectins for The Visualization and Biochemical Characterization of Polysaccharides in Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*, J Microbiol Methods, 50, 237-248.

Stredansky, M., Conti, E., Navarini, L., Bertocchi, C., 1999, Production of Bacterial Exopolysaccharides by Solid Substrate Fermentation, Process Biochemistry, 34, 11-16.

Suga H. ve Smith KM., 2003, Molecular Mechanism of Bacterial Quorum Sensing as A New Drug Target, Curr Opin Chem Biol., 7(5), 586-591.

Sumner, J.B. ve Somers, G.F., 1949, Dinitrosalicylic Method for Glucose. In: Laboratory Experiments in Biological Chemistry, 2nd edn. Academic Pres, New York, 38-39.

Sungur, E.İ., 2001, Soğutma Kuleleri Suyunda Sülfat İndirgeyen Bakterilerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 120.

Sutherland, I. W., 1977, Microbial Exopolysaccharide synthesis, In Extracellular Microbiya Polysaccharide (eds Sanford, P. A. and Laskin, A.) Am. Chem. Soc., Washington., 40-57.

Sutherland, I.W., 1984, Microbial Exopolysaccharides-Their Role in Microbial Adhesion in Aqueous Systems, CRC Crit. Rev. Microbiol., 10, 173-201.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Sutherland, I.W., 1985, Biosynthesis and Composition of Gram-negative Bacterial Extracellular and Wall Polysaccharides, *Ann. Rev. Microbiol.*, 39, 243-270.

Sutherland, I.W., 1990, *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*, Cambridge University Press, Cambridge, 180.

Sutherland, I.W., 1993, Extracellular Polysaccharides, *Biotechnology*, 3(3), 535-541, H. Dellweg. Deerfield Beach, Florida; Basel: Verlag Chemie.

Sutherland, I.W., 1995, Polysaccharide Lyases. *FEMS Microbiology Reviews*, 16, 323-347.

Sutherland, I. W. ve Kennedy, L., 1996, Polysaccharide Lyases from Gellan-Producing *Sphingomonas spp.*, *Microbiology*, 142, 867-872.

Sutherland, I.W., 1996a, Extracellular Polysaccharides, In: Rehm, H.J., & Reed, g. (Eds.), *Biotechnology* (2nd ed.) VCH: Weinheim, 6(16), 613-657.

Sutherland, I.W., 1996b, Microbial Biopolymers from Agricultural Products; production and potential, *Int. Biodeter.&Biodeg.*, 58, 249-261.

Sutherland, I.W., 1997, Microbial Exopolysaccharides-structural Subtitles and Their Consequences, *Pure&Appl. Chem.*, 69(9), 1911-1917.

Sutherland, I.W., 1998, Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides, *Trends Biotechnol.*, 16(1), 41-46.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Sutherland, I.W., 1999a, Microbial Polysaccharide Products, Biotechnol. Genet. Engin. Rev., 16, 217-229.

Sutherland, I.W., 1999b, Polysaccharases for Microbial Exopolysaccharides, Carbohydrate Polymers, 38, 319-328.

Sutherland, I.W., 2001a, Microbial Polysaccharides from Gram Negative Bacteria, International Dairy Journal, 11, 663-674.

Sutherland, I.W., 2001b, The Biofilm Matrix-An Immobilized But Dynamic Microbial Environment, Trends in Microbiology, 9(5), 222-227.

Sutherland I.W., 2001c, Biofilm Exopolysaccharides: A Strong and Sticky Framework, Microbiology, 147, 3-9.

Sutherland, I.W., 2002, A Sticky Business. Microbial Polysaccharides: Current Products and Future trends, Microbiology Today, 29,134-142.

Şener, B., 2002, Temel Tıptan Kliniği: Kistik Fibroziste Mikrobiyal Patogenez, Hacettepe Üniv. Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalı dergisi, 33(1), 49-57.

Tago, Y. ve Aida, K., 1977, Exocellular Mucopolysaccharide Closely Related to Bacteria Floc Formation, American Society for Microbiology, 24, 308-314.

Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R., 1989, Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, 3. baskı, Ege Üniv. Fen Fak. Tekirler Serisi No:55, İzmir, 260.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Teale, C.J., 2002, Antimicrobial Resistance in Food Chain, J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement, 92, 85-89.

Teather, R.M. ve Wood, P.J., 1982, Use of Congo Red-polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from Bovine Rumen, Appl. Environ. Microbiol., 43, 777-780.

Temiz, A., 1994, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Hacettepe Üniv., Ankara, 266.

Ten, L.N., Im, W.T., Kim, M.K., Lee, S.T., 2005, A Plate Assay for Simultaneous Screening of Polysaccharide and Protein-degrading Microorganisms, Letters in Applied Microbiology, 40, 92-98.

Toivola, M.M.K., Revetta, R.P., Domingo, S.W.J., 2006, Identification of active bacterial communities in a model drinking water biofilm system using 16S rRNA-based clone libraries, FEMS Microbiol Lett., 257, 182-188.

Tokajian, S. ve Hashwa, F., 2004, Incidence of Antibiotic Resistance in Coliforms from Drinking Water and Their Identification Using The Biolog and The API Identification Systems, J Chemother., 16(1), 45-50.

Turakhia, M.H., Cooksey, K.E., Characklis, W.G., 1983, Influence of A Calcium-specific Chelant on Biofilm Removal, Appl Environ Microbiol., 46, 1236-1238.

Turetgen, I., Sungur, E.I., Cotuk, A., 2004, Enumeration of *Legionella pneumophila* in Cooling Tower Water Systems, Envir. Monitor. Assess, 12, 1-6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Türetgen, I., 2005, Su Sistemlerinde Mikrobiyal Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi, 79.

Türetgen, I., 2006, Su Şebeke Sistemlerinde Mikrobiyal Biyofilm Tabakası, Tesisat Mühendisliği Dergisi, 92, 29-32.

Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Banfield J.F., Richardson, P.M., 2004, Community Structure and Metabolism through Reconstruction of Microbial Genomes from the Environment, Nature, 428, 37-43.

Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., 1997, Occurrence of Multiple Genomovars of *Burkholderia cepacia* in Cystic Fibrosis Patients and Proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov, Int. J. Syst. Bacteriol., 47(4), 1188-1200.

Vanderslice, R.W., Doherty, D.H., Capage, M., Betlach, M.R., Hassler, R.A., Henderson, N.M., Graniero, J., 1989, Genetic Engineering of Polysaccharide Structure in *Xanthomonas campestris*. In Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides, ed. Crescenzi, V., Dea I.C.M., Paoletti, S., Stivalo, S.S.&Sutherland, I.W., PP 145-156.

Van Der Kooij, D., Vrouwenvelder, H.S., Veenendaal, H.R., 1995, Kinetic Aspects of Biofilm Formation on Surfaces Exposed to Drinking Water, Wat. Sci. Technol., 32(8), 61-65.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Van Geel-Schutten, G.H., Faber, E.J., Smit, E., Bonting, G., Smith, M.R., 1999, Biochemical and Structural Characterization of the Glucan and Fructan Exopolysaccharides Synthesized by the *Lactobacillus reuteri* Wild-Type Strain and by Mutant Strains, Appl and Envir Microbiol., 65(7), 3008-3014.

Van Kranenburg R., J. D. Marugg., I. I. Van Swam., N. J. Willem, W. M. de Vos., 1997, Molecular Characterization of the Plasmid-Encoded EPS gene cluster Essential for Exopolysaccharide Biosynthesis in *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol., 24, 387-397.

Van Kranenburg, R., Boels, I.C., Kleerebezem, M., Vos, W.M., 1999, Genetics and Engineering of Microbial Exopolysaccharides for Food: Approaches for The Production of Existing and Novel Polysaccharides, Current Opinion in Biotechnology, 10, 498-504.

Verhoef, R., Waard, P., Schols, H.A., Siika-aho, M., Voragena, A.G.J., 2003, *Methylobacterium sp.* Isolated from A Finnish Paper Machine Produces Highly Pyruvated Galactan Exopolysaccharide, Carbohydrate Research, 338, 1851-1859.

Vries, R. ve Visser, J., 2001, *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65(10), 497-522.

Vuyst, L.D., Vin, F.D., Vaningelgem, F., Degeest, B., 2001, Recent Developments in The Biosynthesis and Applications of Heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria, International Dairy Journal, 11, 687-707.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Wang, H.L., Weng, X.L., Dong, H.Y., Zhang, H.L., 2004, Specifity and Enzyme Kinetics of The Quorum-quenching N-acyl Homoserine Lacton Lactonase (AHL-lactonase), J. Biol. Chem., 279, 13645.

Watnick, P. ve Kolter, R., 2000, Biofilm City of Microbes, J.Bacteriol., 182, 2675-2679.

Weuster-Botz, D., 2000, Experimental Design for Fermentation Media Development: Statistical Design or Global Random Search?, J. Biosci. Bioeng. 90, 473-483.

Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R. Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P., 2001, Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Nature, 413, 860-864.

Wiatr, C.L., 1991, Enzyme Blend Containing Cellulase to Control Industrial Slime, United States Patent No. 4.994.390.

Wiley, B.J., Ball, D.H., Arcidiacono, S.M., Sous, S., Mayer, J.M., Kaplan, D.L., 1993, Control of Molecular Weight Distribution of The Biopolymer Pullulan Produced by *Aureobasidium pullulans*, J. Environment Polymer Degrad., 1, 3-9.

Will, F. ve Dietrich, H., 1994, Characterization of Residual Pectins from Raspberry Juices, Carbohyd. Pol., 25, 155-160.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Williams, A.G. ve Wimpenny, J.W.T., 1977, Exopolysaccharide Production by *Pseudomonas* NCIB 11264 Grown in Batch Culture, J General Microbiol., 102, 13-21.

Williams, V. ve Fletcher, M., 1996, *Pseudomonas fluorescens* Adhesion and Transport through Porous Media are Affected by Lipopolysaccharide Composition, Appl.Environ. Microbiol., 62, 1004.

Wirtanen, G., 1997, Biofilm Formation and Its Elimination from Food Processing Equipment, Thesis (PhD), Helsinki Technology University.

Wong, T.Y., Preston, L.A., Schiller, N.L., 2000, Alginate Lyase: Review of Major Sources and Enzyme Characteristics, Structure-function Analysis, Biological Roles and Applications, Annu. Rev. Microbiol, 54, 289-340.

Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J.O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A., Parsek, M.R., 2003, Alginate is not A Significant Component of The Extracellular Polysaccharide Matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms, PNAS, 100(13), 7907-7912.

Xavier, J.B., Picioreanu, C., Rani, S.A., 2005, Biofilm-control Strategies Based on Enzymic Disruption of The Extracellular Polymeric Substance Matrix–A Modelling Study. Microbiology, 151, 3817-3832.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Xu, F., Byun, T., Dussen, H.J., Duke, K.J. 2003, Degradation of *N*-acylhomoserine Lactones, The Bacterial Quorum-sensing Molecules, by Acylase. Journal of Biotechnology, 101(1), 89-96.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H. Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Arakawa, M., 1992, Proposal of Burkholderia Gen. Nov. and Transfer of Seven Species of The Genus *Pseudomonas* Homology Group II to The New Genus, with The Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol., 36(12), 1251-1275.

Yadav, M.P., Johnston, D., Hicks, K.B., 2007, Characterization of Corn Fiber Gums from Coarse and Fine Fiber and A Study of Their Emulsifying Properties, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 55, 6366-6371.

Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsunashi, S., Nishi, Y., Uryu, M., 1989, The Structure and Mechanical-Properties of Sheets Prepared from Bacterial Cellulose, J. Mat. Sci., 24(9), 3141-3145.

Yarwood, J.M. ve Schlievert, P.M., 2003, Quorum Sensing in *Staphylococcus* Infections, J. Clin. Invest., 112, 1620-1625.

Yılmaz, M. ve Çelik, G.Y., 2007, Bakteriyal Ekstraselüler Polisakkaritler, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 05(2), 7-13.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Yoshida, N., Yagi, N., Sato, D., Watanabe, N., Kuroishi, T.,** 2005, Bacterial Communities in Petroleum Oil in Stockpiles, J. Bioscience and Bioengineering, 99(2), 143-149.
- Yu, G., LeBrun, L., Gunay, N.S., Hoppensteadt, D., Walenga, J.M., Fareed, J., Linhardt, R.J.,** 2000, Heparinase I Acts on A Synthetic Heparin Pentasaccharide Corresponding to The Antithrombin III Binding Site, Thromb. Res., 100, 549-556.
- Yun, M.A., Yeon, K.M., Park, J.S., Lee, C.H., Chun, J., Lim, D.J.,** 2006, Characterization of Biofilm Structure and Its Effect on Membrane Permeability in MBR for Dye, Wastewater Treatment Water Research, 40(1), 45-52.
- Yücel, A. ve Kantarcıoğlu, S.,** 2001, Hastane Kaynaklı Mikozlarda Epidemiyoloji: Hastane Kaynaklı (Nozokomiyal) Mantar İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi, Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 32(4), 259-269.
- Zhao, G., Perepelov, A.V., Senchenkova, S.N., Shashkov, A.S., Feng, L.,** 2007, Structural Relation of The Antigenic Polysaccharides of *Escherichia coli* O40, *Shigella dysenteriae* type 9, and *E. coli* K47, Carbohydrate Research, 342, 1275-1279.
- Zhang, T.C., Fu, Y.C., Bishop, P.L.,** 1994, Competition in Biofilms, Wat Sci Tech, 29, 263-270.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Zhang, X., Bishop, P.L., Kinkle B.K., 1999, Comparison of Extraction Methods for Quantifying Extracellular Polymers in Biofilms, Wat Sci Tech, 39, 211-218.

Zhang, X. ve Bishop, P.L., 2003, Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances, Chemosphere, 50, 63-69.

Zobell, C.E., 1943, The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity, J Bacteriol, 46, 539-557.

ÖZGEÇMİŞ

Nur CEYHAN, 22 Ağustos 1975 tarihinde İzmir’de doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi sırasıyla Yıldırım Kemal Bey İlkokulu, Şehit Fethi Bey Ortaokulu ve İzmir Kız Lisesi’nde okudu. 1996 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünün Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalından mezun oldu. 1997 yılında Muğla Üniversitesi Biyoloji Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Aynı bölümdeki yüksek lisans eğitimini 2000 yılında “Muğla İli Ballarının Mikrobiyolojik Özellikleri ve Apiterapideki Yeri” konulu tez ile tamamladı. Halen Muğla Üniversitesine bağlı olarak Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.