



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1
SUŞUNDA SICAKLIK, PH VE KLOR
STRESLERİNE KARŞI BİYOFİLM
OLUŞUMUNU TETİKLEYEN GENLERİN
ETKİNLİĞİNİN REAL-TİME PCR YÖNTEMİ
İLE BELİRLENMESİ**

ÖZGE KEKEÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN

EŞ-DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İSTANBUL, 2014



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1
SUŞUNDA SICAKLIK, PH VE Klor
STRESLERİNE KARŞI BİYOFİLM
OLUŞUMUNU TETİKLEYEN GENLERİN
ETKİNLİĞİNİN REAL-TİME PCR YÖNTEMİ
İLE BELİRLENMESİ**

ÖZGE KEKEÇ

520111018

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN

EŞ-DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İSTANBUL, 2014



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES



**DETERMINING THE BIOFILM FORMATION
INDUCING GENES ACTIVITY AGAINST
HEAT, PH AND CHLORINE STRESS VIA
REAL-TIME PCR IN *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA PAO1 STRAIN**

ÖZGE KEKEÇ

520111018

MASTER THESIS

Department of Biology

Biology Program

THESIS ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN

THESIS CO-ADVISOR

Assist. Prof. Dr.N. Cenk SESAL

ISTANBUL, 2014

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Özge Kekeç'in "*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Suşunda Sıcaklık, pH ve Klor Streslerine Karşı Biyofilm Oluşumunu Tetikleyen Genlerin Etkinliğinin Real-Time PCR Yöntemi İle Belirlenmesi" başlıklı tez çalışması, .../.../... tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN (Danışman)
Marmara Üniversitesi (İMZA).....

Yrd. Doç.Dr. Cenk SESAL (Eş-Danışman)
Marmara Üniversitesi (İMZA).....

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ DUMAN (Üye)
Marmara Üniversitesi (İMZA).....

Prof. Dr. Gülden ÇELİK (Üye)
Yeditepe Üniversitesi (İMZA).....

Yrd. Dr. İskender KARALTI (Üye)
Yeditepe Üniversitesi (İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ... /.../... tarih ve sayılı kararı ile Özge Kekeç'in Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Abdülkerim KAR

MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE
STUDIES IN PURE AND APPLIED
SCIENCES

Özge Kekeç, a Master of Science student of Marmara University Institute for Graduate Studies in Pure and Applied Sciences, defended her thesis entitled “Determining The Biofilm Formation Inducing Genes Activity Against Heat, pH and Chlorine Stress Via Real-Time PCR in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Strain” on .../.../... and has been found to be satisfactory by the jury members.

Jury Members

Assoc.Prof. Figen Esin KAYHAN (Advisor)
Marmara University (SIGN).....

Assoc.Prof. Cenk SESAL (Co-Advisor)
Marmara University (SIGN).....

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ DUMAN (Jury Member)
Marmara University (SIGN).....

Prof. Dr. Gülden ÇELİK (Jury Member)
Yeditepe University (SIGN).....

Assoc.Prof. İskender KARALTI (Jury Member)
Yeditepe University (SIGN).....

APPROVAL

Marmara University Institute for Graduate Studies in Pure and Applied Sciences Executive Committee approves that Özge Kekeç be granted the degree of Master of Science in Department of Biology, Biology Program, on .../.../... (Resolution no:).

Director of the Institute
Prof. Dr. Abdülkerim KAR

TEŞEKKÜR / ACKNOWLEDGMENT

Lisans eğitimimden başlayarak yüksek lisans da devam eden süreçte, karşılaştığım her sorun karşısında çözüm üreten, sabır ve ilgiyle bana yardımcı olan, desteğini her an yanımda hissettiğim çok değerli hocam, Yrd. Doç. Dr. Cenk SESAL'a danışmanlığı ve dostluğu için çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca bir danışmandan çok dost gibi davranarak, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösterici olan kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN'a özel teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışma sürecimde bilgilerinden ve tecrübelerinden sürekli yararlandığım Yrd. Doç. Dr. İskender KARALTI ve Yeditepe Üniversitesi'ne teşekkürü bir borç bilirim. Gerek laboratuvar çalışmalarım sırasında, gerekse tez yazım sürecinde yardım ve desteğini esirgemeyen kıymetli arkadaşım Birkan AÇIKGÖZ'e özellikle teşekkür ederim. Bu süreçte yanımda olan laboratuvar yüksek lisans arkadaşlarım, Buse BERBER'e, Busecan AKSOYDAN'a ve Ümmügülsüm TAHİROĞLU'na ve tüm laboratuvar lisans arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım sırasında Atmosferik Fizik ve Biyofizik Laboratuvarı'nın bütün imkanlarından yararlanma fırsatını sunan Doç. Dr. Bülent AKKOYUNLU'ya destekleri için teşekkür ederim.

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Gülben GÜRHAN'a, Pelin PEHLİVAN'a, hayat arkadaşım Ahmet Eren ŞAHİN'e ve diğer kıymetli arkadaşlarıma özellikle teşekkür ederim.

Her türlü zorluk karşısında beni desteklemekten hiç vazgeçmeyen ve emeklerini ömrüm boyunca ödeyemeyeceğim annem Hatice KEKEÇ'e, babam Nurettin KEKEÇ'e ve abim Özgür KEKEÇ'e sabır ve anlayışlarından dolayı minnetlerimi sunarım.

Nisan / 2014

Özge KEKEÇ

İÇİNDEKİLER / TABLE OF CONTENTS	SAYFA
ÖNSÖZ (PREFACE) / TEŞEKKÜRLER (ACKNOWLEDGMENT)	i
İÇİNDEKİLER / TABLE OF CONTENTS	ii
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
SEMBOLLER / SYMBOLS	x
KISALTMALAR / ABBREVIATIONS	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ / LIST OF FIGURES	xii
TABLO LİSTESİ / LIST OF TABLES	xiv
1. GİRİŞ / INTRODUCTION	1
1.1.Bakterilerde Stres Durumu ve Yanıtı	3
1.1.1. Genel Stres Yanıtları	3
1.1.2. Özel Stres Yanıtları	4
1.1.2.1.Sıcaklık Stresine Karşı Oluşturulan Yanıt	4
1.1.2.2.pH Stresine Karşı Oluşturulan Yanıt	4
1.1.2.3.Oksidatif Strese Karşı Oluşturulan Yanıt	4
1.2. Çoğunluk Algılama (Quorum Sensing)	5
1.3.Biyofilm	6
1.3.1. Biyofilm Oluşma Alanları	6
1.3.2. Biyofilm Oluşma Nedenleri	7
1.3.2.1.Savunma	7
1.3.2.2.Adhezyon ve Kolonizasyon	7
1.3.2.3.Yaşanabilir Çevre Geliştirme	8
1.3.2.4.Topluluk Oluşturmak	8
1.3.3. Biyofilm Yapısı ve Oluşum Aşamaları	8
1.3.3.1.Tutunma	9
1.3.3.2.Yapışma	10
1.3.3.3.Müköz Yapı (Slime) Oluşumu	10
1.3.3.4.Olgun Biyofilm	10
1.3.3.5.Kopma ve Ayrılma	10
1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.4.1. Morfolojisi	11
1.4.2. Tanısı ve Özellikleri	11

1.5.	<i>P. aeruginosa</i> 'da Quorum Sensing Mekanizmaları	12
1.5.1.	lasI / lasR Sistemi	13
1.5.2.	rhlI / rhlR Sistemi	13
1.5.3.	<i>Pseudomonas</i> Kinolon Sinyal (PQS) Sistemi	13
1.5.4.	<i>P. aeruginosa</i> 'nın Virülans Faktörleri	14
1.5.5.	<i>P. aeruginosa</i> 'da Biyofilm Yapımı	15
1.5.5.1.	Çevre Koşullarının <i>P. aeruginosa</i> 'nın Biyofilm Oluşumuna Etkisi	16
1.6.	<i>P. aeruginosa</i> Genetik Cevabı	17
2.	MATERYAL VE YÖNTEM / MATERIAL AND METHOD	19
2.1.	MATERYAL	19
2.1.1.	Bakteri Suşları	19
2.1.2.	Kullanılan Sarf Malzemeler	19
2.1.3.	Kullanılan Cihazlar	20
2.1.4.	Kimyasalların Hazırlanması	21
2.1.4.1.	Bazik Fuksin	21
2.1.4.2.	Klor Çözeltisi	21
2.1.4.3.	HCl Çözeltisi	21
2.1.4.4.	KOH Çözeltisi	21
2.1.5.	Besiyerlerinin Hazırlanması	22
2.1.5.1.	Luria Bertani (LB) Broth	22
2.1.5.2.	Luria Bertani (LB) Agar	22
2.1.5.3.	Koyun Kanlı Agar	22
2.2.	YÖNTEM	23
2.2.1.	Bakterilerin Saklanması ve Çoğaltılması	23
2.2.2.	Bakteri Suşlarının Sıvı Besiyerine Kültüre Alınması ve Yoğunluğunun Belirlenmesi	23
2.2.3.	Suşlara Stres Uygulanması	24
2.2.4.	Biyofilmlerin Boyanması	25
2.2.5.	Hedef Genlerin, Uygun Primerlerin ve Probların Seçilmesi	26
2.2.6.	mRNA İzolasyonu	28
2.2.7.	mRNA' dan cDNA Sentezi	28
2.2.8.	cDNA' ların Gerçek Zamanlı PZR ile Çoğaltılması	29
2.2.9.	PZR Bulgularının Okunması	30

2.2.10.	İstatistiksel Analiz	31
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA /RESULTS AND DISCUSSION	32
3.1.	BULGULAR	32
3.1.1.	Biyofilm Boyama Bulguları	32
3.1.2.	Gerçek Zamanlı PZR Deneyi Bulguları ve CP Değerlerinin Değerlendirilmesi	33
3.1.2.1.	Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak rpoS Gen Anlatım Seviyeleri	34
3.1.2.2.	Farklı pH Değerlerine Yanıt Olarak rpoS Gen Anlatım Seviyeleri	35
3.1.2.3.	Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak rpoS Gen Anlatım Seviyeleri	36
3.1.2.4.	Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak bifA Gen Anlatım Seviyeleri	36
3.1.2.5.	Farklı pH Değerlerine Yanıt Olarak bifA Gen Anlatım Seviyeleri	37
3.1.2.6.	Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak bifA Gen Anlatım Seviyeleri	38
3.1.2.7.	Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak migA Gen Anlatım Seviyeleri	38
3.1.2.8.	Farklı pH Değerlerine Yanıt Olarak migA Gen Anlatım Seviyeleri	39
3.1.2.9.	Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak migA Gen Anlatım Seviyeleri	40
3.1.2.10.	Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak dnaK Gen Anlatım Seviyeleri	40
3.1.2.11.	Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak katB Gen Anlatım Seviyeleri	41
3.1.2.12.	Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak soxR Gen Anlatım Seviyeleri	42
3.1.2.13.	Farklı pH Değerlerine Yanıt Olarak soxR Gen Anlatım Seviyeleri	42
3.1.2.14.	Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak algC Gen Anlatım Seviyeleri	43

3.1.2.15. Farklı pH Değerlerine Yanıt Olarak algC Gen Anlatım Seviyeleri	44
3.1.2.16. Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak algC Gen Anlatım Seviyeleri	44
3.1.3. LightCycler Nano Gerçek Zamanlı PZR Sistemi Bulguları	45
3.1.3.1. Farklı Klor, pH ve Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak rpoS Gen Anlatım Seviyeleri	45
3.1.3.2. Farklı Klor, pH ve Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak bifA Gen Anlatım Seviyeleri	46
3.1.3.3. Farklı Klor, pH ve Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak migA Gen Anlatım Seviyeleri	47
3.1.3.4. Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak dnaK Gen Anlatım Seviyeleri	48
3.1.4. Seçilen Genlerin CP Değerleri ve PZR Karşılaştırmalar İçin İstatistiksel Analiz Bulguları	49
3.2.TARTIŞMA	50
4. SONUÇLAR / CONCLUSIONS	58
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1 SUŞUNDA SICAKLIK, PH VE KLOR STRESLERİNE KARŞI BİYOFİLM OLUŞUMUNU TETİKLEYEN GENLERİN ETKİNLİĞİNİN REAL-TİME PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

Pseudomonas aeruginosa, sporsuz, kapsülsüz, basil morfolojisinde ve bağışıklık yetersizliği olan hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir fırsatçı patojendir. Antibiyotiklere karşı direncindeki artış sebebiyle, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç enfeksiyonların etkeni olan bir bakteridir. Çoğunlukla toprak ve suda bulunan *P. aeruginosa*, yaşamını sürdürebilmek için, farklı çevresel etkenlere karşı kendini korumak zorunda kalmaktadır. Ortam koşullarından korunmak, ortama adapte olmak ve strese cevap oluşturmak için iletişim mekanizmaları geliştirmiştir. Quorum Sensing (QS), bakterinin salgıladığı sinyalleri, sayıları belirli bir seviyenin üzerine çıktığında algılaması ve sinyallere cevap oluşturarak iletişim kurması sistemidir. Ekstrasellüler polimerik madde içine gömülü halde, yüzeye yapışarak yaşayan biyofilm formu, QS ilgili genlerin ekspresyonu ile meydana getirilmektedir. Meydana gelen bu biyofilm, antibiyotik ve dezenfektanlara direncin başlıca sebebidir.

P. aeruginosa'nın yaşadığı ortamlarda maruz kaldığı çeşitli stres durumlarının, QS sistemi tarafından gen ekspresyonu ile kontrol edilen biyofilm oluşumunu, moleküler düzeyde nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda; klor, pH ve sıcaklık streslerine karşı *P. aeruginosa* PAO1 suşunun oluşturduğu yanıt incelenmiştir. Sıcaklık, klor ve pH streslerine maruz bırakılan bakteriler, üç günlük inkübasyonun ardından, biyofilm miktarının ölçülmesi için boyanmıştır. Stres dozları, boyama bulgularına göre belirlenmiştir.

Gerçek zamanlı PZR'nin, bakteriyel gen ekspresyonunu analiz etmek için uygun bir yöntem olduğu bilinmektedir. *P. aeruginosa* PAO1 suşunda biyofilm ve stres oluşumunda etkili olduğu literatürde belirtilen yedi gen bölgesi (*rpoS*, *bifA*, *migA*, *dnaK*, *katB*, *soxR*, *algC*) belirlenmiştir. Bu gen bölgeleri, gerçek zamanlı PZR metodu ile çoğaltılmış, stres durumlarının ve dozlarının genlerin anlatımı üzerine etkisi belirlenmiştir. Ayrıca, kapiller ve LightCycler Nano gerçek zamanlı PZR sisteminin kullanıldığı gerçek zamanlı PZR cihazları, bulguların güvenilirliğini test etmek için karşılaştırılmıştır.

Elde edilen bulgular, klor stresinin *rpoS*, *bifA*, *migA*, *katB*, *soxR* ve *algC* genlerinin anlatımını arttırdığını; düşük pH stresinin *rpoS*, *bifA*, *migA*, *soxR* ve *algC* genlerinin anlatımını arttırdığını aksine yüksek pH stresinin aynı genlerin anlatımını azalttığını ve sıcaklık streslerinin ise *rpoS*, *bifA*, *migA*, *katB*, *soxR*, *algC* ve *dnaK* genlerinin anlatımını etkilemediğini göstermiştir. Sonuç olarak, özellikle yüksek asit ve klorun, biyofilm oluşumunda etkili genlerin anlatımını arttırdığı, yüksek pH'ın ve sıcaklık stresinin ise anlatımda anlamlı değişiklikler yapmadığı ya da doza bağlı olarak anlatımı baskıladığı görülmüştür. Kapiller ve LightCycler Nano gerçek zamanlı PCR sistemlerinin karşılaştırılması sonucu da bulguların birbirlerini desteklediklerini göstermiştir.

Bakterilerin ortadan kaldırılmasında sıklıkla tercih edilen, klorlama, yüksek sıcaklık ve ekstrem pH değerleri yöntemleri dezenfeksiyon için yetersiz kalmakta hatta bakterilerin daha da çoğalmasına sebep olmaktadır. Bu sebeple, bakterilerin ortadan kaldırılması için yeni dezenfeksiyon yöntemlerinin geliştirilmesine ve var olan tekniklerin ise bakteriyi strese sokmadan, ek dezenfeksiyon yöntemleriyle beraber uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Biyofilm gibi tehlikeli bir form ile mücadele ediliyorsa, bütün dezenfeksiyon yöntemlerinin, bakteride yarattığı etki de ayrıntılı olarak incelenmelidir. Etkin bir mücadele için, bu konudaki çalışmaların sayılarının artırılması gerektiği düşünülmektedir.

Nisan / 2014

Özge KEKEÇ

ABSTRACT

DETERMINING THE BIOFILM FORMATION INDUCING GENES ACTIVITY AGAINST HEAT, PH AND CHLORINE STRESS VIA REAL-TIME PCR IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1 STRAIN

Pseudomonas aeruginosa is an important opportunistic pathogen which is a bacillus without capsule, has no spores, and may cause serious infections in patients with immunodeficiency. *P. aeruginosa* is responsible for frequently encountered infections with high morbidity and mortality and hard to treat. *P. aeruginosa* is mostly found in soil and water, and protects itself from various environmental conditions to survive. It creates communication mechanisms to ensure its survival, to resist from environmental conditions and to response to stress. Quorum Sensing (QS) mechanism is the system of communication that bacteria using signals when number of signals reached a certain level and responding them. With the expression of genes related to QS, a biofilm form which lives in adherence to the surface inside extracellular polymeric matter is generated. This generated biofilm is the main reason of the resistance against antibiotics and disinfectants.

This study aims to find out how the several stress conditions that *P. aeruginosa* PAO1 strain exposed in its habitats effects the biofilm formation that is controlled with gene expression by QS system in molecular level additionally, response against heat, chlorine and pH stress is also investigated. Stress severity was designed according to viability results in response to heat, chlorine and pH stress.

Real-time PCR has been used to analyze bacterial gene expression. Seven genes (*rpoS*, *bifA*, *migA*, *dnaK*, *katB*, *soxR*, *algC*) indicated in literature that play role on biofilm formation and stress response determined in *P. aeruginosa* PAO1 strain. These genes were amplified using real-time PCR and effect of stress conditions and severity on gene expression is determined. Tubular and capillar real-time PCR systems were compared in order to test the reliability of the results.

The results obtained showed that chlorine stress increases the gene expressions of *rpoS*, *bifA*, *migA*, *katB*, *soxR* and *algC*; low pH stress increases the gene expressions of *rpoS*, *bifA*, *migA*, *soxR* and *algC*, on the other hand high pH stress reduces the gene

expressions of the same genes, and finally heat stress did not induce any changes for expressions of the genes rpoS, bifA, migA, katB, soxR, algC and dnaK. In conclusion, it is observed that high levels of acid and chlorine increased gene expression related to biofilm formation particularly while high pH levels and heat stress did not have a significant effect or repress based on severity on gene expression. It is observed that the results of capillary and tubular PCR are in accordance with each other when compared.

Methods commonly used for exterminating bacteria such as chlorination, high temperature and extreme pH levels are inefficient and they even cause bacterial growth. Therefore, new disinfection methods should be developed and current methods should be used without stressing out bacteria with additional techniques. If controversy against dangerous form such as biofilm exists, all the effects of disinfection techniques must be investigated in the bacteria. For an effective contention, research in this field should be increased.

April / 2014

Özge KEKEÇ

SEMBOLLER / SYMBOLS

%	: Yüzde
$\pm$	: Artı-Eksi İşareti
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
3-O-C12-HSL	: N-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserin Lakton
C4-HSL	: N-butiril Homoserin Lakton
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	: Kalsiyum Hidroksit
Ca^{+2}	: Kalsiyum
Cl^-	: Klor
g	: Gram
H^+	: Hidrojen
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidroklorik Asit
K^+	: Potasyum
KOH	: Potasyum Hidroksit
l	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Na^+	: Sodyum
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
O_2	: Oksijen
OCl^-	: Hipoklorit
OH^-	: Hidroksit
sn	: Saniye
T_m	: Erime Sıcaklığı
u	: Unit
μl	: Mikrolitre
σ	: Sigma

KISALTMALAR / ABBREVIATIONS

AHL	: Acyl Homoserine Lactone (Açıl Homoserin Lakton)
ATR	: Acid Tolerance Response (Asit Tolerans Yanıtı)
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention (Hastalıklar Kontrol ve Koruma Merkezi)
cDNA	: Complementary Deoxyribonucleic Acid
CECT	: Colección Española de Cultivos Tipo (İspanyol Tip Kültür Koleksiyonu)
CP	: Crossing Point
EMB	: Eozin Metilen Blue
EPS	: Extracellular Polymeric Substances (Ekzopolisakkarit)
HSP	: Heat Shock Protein (Isı Şoku Proteini)
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid
OD	: Optical Density (Optik Yoğunluk)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Tepkimesi)
pH	: Potential of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PQS	: <i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal (<i>Pseudomonas</i> Kinolon Sinyali)
QS	: Quorum Sensing (Çoğunluk Algılama)
ROS	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
UPL	: Universal Probe Library
UV	: Ultraviolet (Ultraviyole)
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLERİN LİSTESİ / LIST OF FIGURES	SAYFA
Şekil 1.1. Bakterilerde biyofilm oluşum aşamaları	9
Şekil 1.2. <i>P. aeruginosa</i> 'daki las/rhl QS sisteminin modellenmesi	12
Şekil 2.1. 625 nm'de bakteri suşuna ait absorbands değeri	24
Şekil 2.2. Mikroplaka içerisindeki kültürler	25
Şekil 2.3. Mikroplaka içinde boyanmış kültürler	26
Şekil 2.4. Universal Prob Kütüphanesi Veri Bankası	27
Şekil 3.1. Boyama sonucunda elde edilen biyofilm miktarlarının grafik ile gösterilmesi	33
Şekil 3.2. Farklı klor değerleri karşısında rpoS geni anlatım seviyesine ait bulgular	34
Şekil 3.3. Farklı pH değerleri karşısında rpoS geni anlatım seviyesine ait bulgular	35
Şekil 3.4. Farklı sıcaklık değerleri karşısında rpoS geni anlatım seviyesine ait bulgular	36
Şekil 3.5. Farklı klor değerleri karşısında bifA geni anlatım seviyesine ait bulgular	36
Şekil 3.6. Farklı pH değerleri karşısında bifA geni anlatım seviyesine ait bulgular	37
Şekil 3.7. Farklı sıcaklık değerleri karşısında bifA geni anlatım seviyesine ait bulgular	38
Şekil 3.8. Farklı klor değerleri karşısında migA geni anlatım seviyesine ait bulgular	38
Şekil 3.9. Farklı pH değerleri karşısında migA geni anlatım seviyesine ait bulgular	39
Şekil 3.10. Farklı sıcaklık değerleri karşısında migA geni anlatım seviyesine ait bulgular	40
Şekil 3.11. Farklı sıcaklık değerleri karşısında dnaK geni anlatım seviyesine ait bulgular	40
Şekil 3.12. Farklı klor değerleri karşısında katB geni anlatım seviyesine ait bulgular	41
Şekil 3.13. Farklı klor değerleri karşısında soxR geni anlatım seviyesine ait bulgular	42
Şekil 3.14. Farklı pH değerleri karşısında soxR geni anlatım seviyesine ait bulgular	42
Şekil 3.15. Farklı klor değerleri karşısında algC geni anlatım seviyesine ait bulgular	43

Şekil 3.16. Farklı pH değerleri karşısında algC geni anlatım seviyesine ait bulgular	44
Şekil 3.17. Farklı sıcaklık değerleri karşısında algC geni anlatım seviyesine ait bulgular	44
Şekil 3.18. LightCycler Nano cihazıyla farklı klor, pH ve sıcaklık değerleri karşısında rpoS geni anlatım seviyesine ait bulgular	45
Şekil 3.19. LightCycler Nano cihazıyla farklı klor, pH ve sıcaklık değerleri karşısında bifA geni anlatım seviyesine ait bulgular	46
Şekil 3.20. LightCycler Nano cihazıyla farklı klor, pH ve sıcaklık değerleri karşısında migA geni anlatım seviyesine ait bulgular	47
Şekil 3.21. LightCycler Nano cihazıyla farklı sıcaklık değerleri karşısında dnaK geni anlatım seviyesine ait bulgular	48

TABLO LİSTESİ / LIST OF TABLES	SAYFA
Tablo 1.1. Yüzeye tutunma ve biyofilm oluşumunda etkili faktörler	10
Tablo 1.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın virülans faktörleri	14
Tablo 1.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın QS, biyofilm ve stres cevabı oluşturmasında etkili genler ve fonksiyonları	18
Tablo 2.1. McFarland standardı spektrofotometre karşılığı	23
Tablo 2.2. Stres dozları	24
Tablo 2.3. Seçilen primerlere ait bilgiler	27
Tablo 3.1. Boyama sonucunda elde edilen biyofilm miktarları	32
Tablo 3.2. Stres uygulanmış örneklerin kodları	34
Tablo 3.3. Klor stresi gen anlatım düzeylerinin Pearson korelasyon katsayısı değerleri	49
Tablo 3.4. pH stresi gen anlatım düzeylerinin Pearson korelasyon katsayısı değerleri	50
Tablo 3.5. Sıcaklık stresi gen anlatım düzeylerinin Pearson korelasyon katsayısı değerleri	50

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ / INTRODUCTION

Geçmişten günümüze kadar, bakterilerin yalnızca çoğalan ve birbirleri ile iletişim kurmayan, asosyal canlılar oldukları düşünülmekteydi. Fakat bugün, bakterilerin de çok hücreli canlılardaki gibi, yaşadıkları çevrenin şartlarına uyum sağlayabilmek için aralarında iletişim kuran, sosyal varlıklar oldukları ve böylece toplu halde yaşayabildikleri bilinmektedir [1]. Bakterilerin kendi popülasyonlarının içinde belirli bir sayının üzerine çıktıklarında, algılama ve yanıtlama kabiliyeti, hücre-hücre etkileşimi, oto-indükleyici moleküller tarafından gerçekleştirilen iletişim mekanizması olarak belirtilen, “Çoğunluk Algılama- Quorum Sensing” (QS) mekanizmasını devreye soktukları belirlenmiştir [2]. QS mekanizması, biyofilm oluşturma, bakterilerde kümeleşme, hareket, antibiyotik sentezi, konjugasyon, virülans gibi pek çok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

Bakteriler, yaşadıkları ortamda bulunan ışık, oksijen (O₂), sıcaklık değişimi, deterjan, dezenfektan vb. kimyasal maddelerin oluşturduğu stresin yanında, gıdalarda bulunan asitlik, pH, tuz oranı, antibiyotik ve yarışmacı flora gibi streslere maruz kalabilmektedirler [3-8]. Mikroorganizmalar, dezenfektanlar gibi kimyasallardan, ultraviyole (UV) ışınları, pH, nem ve sıcaklık dalgalanmaları gibi fiziksel şartlardan, bakterileri yiyerek beslenen canlılar ve virüs gibi biyolojik tehditlerden korumak için biyofilm oluşturmaktadırlar [9]. Ayrıca, geliştikleri biyofilm modeli içerisinde yaşayan türlerin, aynı türe ait planktonik (serbest halde dolaşan) bakterilere göre antibiyotik direncini 3000 kata kadar fazla arttırabildikleri ve dış ortam şartlarında yaşamlarını sürdürebilmek için avantaj kazandıkları gözlenmektedir [10]. Bunun sonucu olarak, birçok tıbbi vakanın oluşmasında, biyofilmin önemli rol oynadığı bildirilmektedirler. Örneğin, ABD’de bulunan Hastalıklar Kontrol ve Koruma Merkezleri (CDC), hastane enfeksiyonlarının %65’inin biyofilmler tarafından meydana geldiğini belirtmektedir. Biyofilmin oluşmasında etkili QS haberleşme mekanizmasının, nasıl meydana geldiği ile ilgili araştırmalar son yıllarda artmaktadır. Özellikle QS mekanizmasının moleküler düzeyde nasıl işlediği, genler ve virülans faktörleri ile ilgili çalışmalarla araştırılmaktadır.

Çoğunlukla toprak ve suda bulunan Gram negatif, çubuk şekilli, *Pseudomonas aeruginosa*'nın, özellikle bağışıklık yetersizliği olan hastalarda, solunum ve idrar yollarının, yanıkların ve açık yaraların fırsatçı patojeni olduğu ve kanda enfeksiyon yapabildiği bildirilmektedir. *P. aeruginosa*, kistik fibrozis olgularında kronik akciğer enfeksiyonlarına neden olabilen fırsatçı bir patojendir. Ayrıca, su kalitesinin düşük olduğu kirli küvet ve jakuzilerde dermatite sebep olabilmektedir. *P. aeruginosa*, son yıllarda artan insidansı, ürettikleri virülans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli yükselen antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır [11].

Birçok bakteri türünde olduğu gibi *P. aeruginosa*'nın da konakçı ile karşılaşma sonrası, hücreden hücreye iletişim sinyalleri salgılayarak, QS sistemi ile bulundukları ortamdaki yoğunluklarını belirleyebildikleri belirtilmiştir [12]. Ayrıca, hücre yoğunluğuna bağlı olarak çalışan bu sistemin, *P. aeruginosa*'nın çeşitli virülans faktörlerinin üretimini de düzenlediği bilinmektedir. Bu şekilde bakteriler, bulunduğu ortam koşullarına göre fenotipik değişiklikler gösterebilmektedir [13].

Çalışmamızda, gerek su sistemlerinde, gerekse vücut içinde biyofilm yaptığı bilinen fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa* PAO1 suşunun, karşılaştığı stres durumlarının hangi seviyesine karşı yanıt oluşturarak biyofilm yapımını tetiklediği test edilmiştir. *P. aeruginosa* ile yapılan genomik ve proteomik çalışmalar, yapısındaki birçok genin etki mekanizmasının çözülmesine neden olmuştur ve araştırmaya devam edilmektedir. Bu genlerin hücre fizyolojisindeki rolleri araştırıldığında, adhezyon, QS, hücre duvar yapımı, metabolizma, stres cevabı, biyofilm oluşumu, virülans faktör üretimi ve plazmide bağlanma gibi durumlarda oldukça etkili oldukları ve birbirleriyle bağlantılı olarak çalıştıkları görülmektedir.

Canlı veya cansız ortamlarda oluşacak biyofilmin ortama ve konağa zarar vermesini engellemek veya tamamen durdurmak için daha etkili yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. QS sistemini ve biyofilm oluşumunu etkileyen çeşitli stres faktörlerinin, bakteride moleküler düzeyde yaratacağı etkiyi araştırmak ileride yapılacak çalışmalara yön verecektir.

1.1.Bakterilerde Stres Durumu ve Yanıtı

Bakterilerin yaşamını sürdürdüğü çevresel koşullar dışında ortamda bulunan, çoğalma ve gelişimlerini olumsuz etkileyebilecek bütün etkenler stres olarak tanımlanmaktadır [14]. Mikroorganizmalar, karşılaşmış oldukları stres faktörünün şekline ve şiddetine bağlı olarak farklı yanıtlar verebilmektedirler. Zayıf stres karşısında bakterilerin sayılarında değişiklik görülmemekte, ancak çoğalmalarında durma ve azalma meydana gelmektedir. Orta şiddetli stres durumunda çoğalmalarında durmaya ek olarak, yaşamsal faaliyetleri zarar görmeye başlamaktadır. Yüksek derecede stres ise, bakteriler için ölümcül sonuçlar doğurmaktadır [3]. Bakteriler için yaşadıkları ortamlarda, ışık, O₂, deterjan, dezenfektan, antibiyotik, asitlik, pH, tuz ve yarışmacı flora gibi çok çeşitli stres durumları bulunmaktadır [3, 5, 6]. Gıda eksikliği, düşük oksijen, düşük pH, yüksek ozmotik basınç, sıcaklıkta ani değişimler ya da antimikrobiyal ajanlara maruz kalma gibi durumlarda bakterilerin çoğalmalarının kısıtlandığı ve bundan dolayı da strese girerek mutasyon oranlarının artmaya başladığı yapılan çalışmalarda gösterilmektedir [3, 15, 16]. Bulundukları çevre içerisinde etkilendikleri stresler, bakterilerin yaşamlarını yitirmelerine veya çevreye adapte olmalarına sebep olmaktadır. Adaptasyon mekanizmalarının aktifleşmesiyle beraber bakteriler, stresli ortamda hayatta kalabilmekte, ancak stresin uzun bir zaman devam etmesi durumunda zarar görmekte veya ölmektedir. Adaptasyon mekanizmaları geliştikçe bakterinin virülansının da arttığı bilinmektedir [17]. Çevreden almış olduğu sinyaller ile yaşamının tehlikede olduğunu düşünen bir bakterinin, biyofilm oluşturarak kendini koruma altına aldığı da yine çalışmalarda belirtilmektedir [18].

1.1.1. Genel Stres Yanıtları

Bakterilerin yaşamını sürdürdüğü çevresel koşullardan dışında ortamda bulunan etkenlere karşı oluşturduğu ilk yanıt, genel stres yanıtı olarak bilinmektedir. Etkilendikleri stres faktörünün çeşidine göre, bakterilerin hücre zarı geçirgenliğinde (soğuk şoku), protein yapısında, ribozomlarında (ısı) ve nükleik asitlerinde (radyasyon) hücresel faaliyetlerini olumsuz olarak etkileyecek çeşitli değişiklikler görülebilmektedir. Bu gibi durumlar karşısında, bakterinin moleküler düzeyde oluşturduğu yanıt, şok düzenleyici proteinleri sentezlemektir. Bu sayede bakteri, sentezlediği şok proteinleri vasıtasıyla stres faktörü ile baş edebilmektedir [3]. Bakteriler tek bir stres faktörüne

karşı yanıt oluşturabildiği gibi, birden fazla stres faktörünün birlikte uyarımıyla da yanıt oluşturabilmektedirler. Genel stres yanıtının aktifleşmesi, bakteri strese maruz kalır kalmaz değil, çoğunlukla logaritmik fazın sonlarına doğru ya da durağan faza geçiş esnasında görülmektedir [19].

1.1.2. Özel Stres Yanıtları

Genel stres yanıtına ek olarak bakterilerin, stresin şekline özgü çeşitli stres mekanizmaları geliştirdiği bilinmektedir.

1.1.2.1.Sıcaklık Stresine Karşı Oluşturulan Yanıt

Bakterilerin ortadan kaldırılmasında yüksek sıcaklık uygulamalarına sıklıkla başvurulmaktadır. Özellikle gıdalarda bulunan bakteriler, gıdaların işlenmesi veya korunması amacıyla ısı ile muamele edilmektedir. Sıcaklık, bakterilerin hücresel bileşenlerinde ve makro moleküllerinde hasara sebep olmaktadır [14]. Her bakterinin, yaşamsal faaliyetlerini en iyi şekilde sürdürebildiği bir optimum sıcaklık değeri bulunmaktadır. Bu değerden uzaklaşıldıkça veya karşı koyabilecekleri maksimum veya minimum sıcaklık sınırı aşıldıkça, mikroorganizmalar ısı şokuna girmektedir. Bakteriler ısı artışı durumunda, yüksek sıcaklığın etkilerinden korunmak için ısı şoku proteinleri (Heat Shock Proteins (HSP)) olarak adlandırılan proteinler sentezlemektedirler [20].

1.1.2.2.pH Stresine Karşı Oluşturulan Yanıt

Tüm bakteriler, optimum yaşam koşulları dışında kalan asit ya da bazik ortam koşullarına karşı değişik seviyelerde yanıt oluşturmaktadırlar. Hatta, tek bir türün fizyolojik fazları (adaptasyon fazı-durağan faz) arasında bile oluşan stres yanıtının değişiklik gösterdiği görülmektedir [3]. Genellikle bakterilerin ölümüne sebep olmayacak seviyede pH değerlerinde ve aşırı düşük pH değerlerinde canlı kalabilmeleri için uyarılan tolerans yanıtına (Acid Tolerance Response – ATR) sahiptirler. ATR, hücre içi ya da hücre dışında meydana gelen pH değişiklikleri ile uyarılmaktadır.

1.1.2.3.Oksidatif Strese Karşı Oluşturulan Yanıt

Aerob koşullarda gelişen bakterilerin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) meydana getirdiği oksidatif strese maruz kalmaları kaçınılmazdır (peroksit, süperoksit (SO)) [8].

Örneğin, gıdalarda bulunan bakterilerin, süper oksit, hidroksil radikalleri (OH⁻) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türlerine maruz kaldıkları bilinmektedir. Bu gibi çeşitli oksidantlara maruz kalan bakterilerin, nükleik asitlerinde, lipidlerinde, hücresel proteinlerinde hasar meydana gelmektedir [3,14]. Bakteriler üzerinde oluşan bu oksidatif stresin, hücresel makro moleküller üzerinde meydana getirdiği hasardan ötürü, yaşamlarını devam ettirebilmek için oksidatif stres cevabı oluşturarak, genetik düzeyde değişime gitmektedirler [8]. Hücrede antioksidan olarak rol alan birçok proteinin, oksidatif stres tarafından indüklendiği bilinmektedir. Oksidatif stres durumlarında anlatımında artış görülen diğer proteinler ise, nükleik asit hasarı başta olmak üzere oksidatif hasarı onarmak için görev almaktadırlar [3,14].

1.2.Çoğunluk Algılama (Quorum Sensing)

Geçmişten günümüze kadar, bakterilerin yalnızca çoğalan ve birbirleri ile iletişim kurmayan, asosyal canlılar oldukları düşünülmektedir. Fakat bugün, bakterilerin de çok hücreli canlılardaki gibi, yaşadıkları çevrenin şartlarına uyum sağlayabilmek için aralarında iletişim kuran, sosyal varlıklar oldukları ve böylece toplu halde yaşayabildikleri bilinmektedir [1]. Bu şekilde toplu yaşayabilen bakteriler, meydana getirdikleri kimyasal sinyalleri, sayıları eşik kabul edilen belli bir seviyeyi aştığında çözümleyip, bu sinyallere yanıt oluşturarak birbirleriyle iletişim kurmaktadır. Bakteriler arasında kullanılan bu iletişim, QS olarak isimlendirilmektedir. Yani QS mekanizmasında bakteriler, etraflarına saldıkları oto-indükleyici (autoinducer) moleküller vasıtasıyla, çevrelerindeki diğer bakterileri algılama ve hücre-hücre etkileşimi kurma kabiliyeti geliştirmektedirler [2]. Diğer bir deyişle QS, bakterilerin bulunduğu alandaki bakteriyel topluluğun yoğunluğunun ve bakterilerin davranışlarının belirlemede, tetikleyici rol oynayan bir mekanizmadır [21]. Çeşitli kimyasal sinyaller ile düzenlenen bu mekanizma, biyofilm oluşturma, kümeleşme, hareket, antibiyotik sentezi, konjugasyon, virülans gibi pek çok fizyolojik olayın meydana gelmesinde etkin rol oynamaktadır. Bununla beraber QS ile bakteriler, yaşadıkları çevredeki gıda kaynaklarının daha rasyonel kullanımı, çevreye uyum sağlama, ortamdaki streslere karşı kendini koruma, aynı çevreyi paylaştığı diğer bakterilerle rekabet, konağın savunma mekanizmasıyla mücadele ve topluluk içindeki birey sayısını ortamın ihtiyaçlarına göre kontrol altında tutma gibi birçok fonksiyona

sahip olabilmektedirler [3, 22-25].

QS sinyal mekanizmaları, kullanılan kimyasal sinyalin çeşidine göre, türler arası ve tür içi QS mekanizmaları olarak ikiye ayrılmaktadır. Türler arası sistemlerde bakteriler, luxS / AI-2 tipi QS mekanizması kullanmaktadırlar [26]. Tür içi mekanizmalar ise, yine kendi içerisinde Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde kullanılan mekanizmalar olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu ayrıma göre;

-Gram negatif bakteriler: luxI / luxR tipindeki QS mekanizması,

-Gram pozitif bakteriler: Oligopeptit / iki bileşenli tipte QS mekanizması kullanmaktadırlar.

1.3.Biyofilm

Biyofilm kısaca, canlı ya da cansız yüzeylere tutunmuş ve etrafları polisakkarit yapıda matriks ile çevrelenmiş bakteri topluluğu olarak tanımlanmaktadır. Fakat biyofilm oluşumu, bakterilerin gelişigüzel bir araya gelerek, bulundukları yüzeye tutunmaları olarak algılanmamalıdır. Bakteriler, sinyaller vasıtasıyla biyofilm oluşturmaktadırlar. Ortama salınarak hücreler arası iletişimi sağlayan moleküllerin (Açıl homoserin lakton - AHL vb.) verdiği sinyal, biyofilm yapımını düzenlemektedir [27].

Uygun bir yüzeye ya da birbirlerine tutunarak çoğalan, büyüme oranları ve gen anlatımına bağlı olarak fenotiplerinde değişiklikler görülebilen ve ekzopolisakkarit (EPS) içine gömülü yaşayan biyofilmlerin, planktonik bakterilere kıyasla 3000 kata kadar daha dirençli olduğu bildirilmektedir [18, 28- 30]. Böylesi bir yapının varlığı, bakterilerin patojenitesini ve çevrelerine adaptasyonlarını kavramada oldukça önemlidir [31, 32].

1.3.1. Biyofilm Oluşma Alanları

Bakteriler bulundukları ortamda rahatça gelişebilmek için, belli miktarlarda neme, sıcaklığa, gıda maddesine, oksijene ve pH değerine gereksinim duymaktadırlar. [33]. Yaşamaları için gerekli koşulları sağlayan, çok çeşitli yüzeylerde (canlı ve cansız yüzeyler) bulunabilmektedirler. Örneğin biyofilm tabakası, tüm su sistemlerinde (kullanma, içme suları ve doğal sular) oluşabilmektedir. Su borularında, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde, havuzların derz aralarında, havuz içi su

döngüsünün yapılamadığı kısımlarda ve soğutma kulelerinde görülebilmektedirler [18, 34]. Bahsi geçen tüm bu cansız yüzeylerin yanında, biyofilmler canlı yüzeylerde de meydana gelebilmektedirler. Kateterler, kontakt lensler, protezler, kalp kapakçıkları, kalp pilleri ve rahim içi araçları gibi kişilere adapte edilen çeşitli medikal malzemelerde ve böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı dokular üzerinde oluşabilmektedirler. Özellikle immün yetmezliği bulunan ve vücudunda sürekli medikal cihaz taşıyan kişilerde ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedirler.

1.3.2. Biyofilm Oluşma Nedenleri

Bakterilerin biyofilm meydana getirmesini gerektiren çeşitli durumlar bulunmaktadır ve bu durumlar aşağıda belirtilmektedir.

1.3.2.1.Savunma

Bakterilerde savunma, uygulanan strese yanıt olarak oluşturulmaktadır. Oluşturdukları biyofilm tabakası sayesinde klor gibi dezenfeksiyonda kullanılan kimyasallardan, oksijen radikallerinden, gıda eksikliğinden, susuzluktan, fagositozdan, pH değişikliklerinden ve antibiyotiklerden korunabilmektedirler. Biyofilmin önemli bir kısmını, savunmada büyük role sahip EPS molekülleri oluşturmaktadır. EPS sayesinde bakteriler, elektrik alandan uzaklaşabilmekte ve böylece fagositozdan kurtulabilmektedirler [35].

1.3.2.2.Adhezyon ve Kolonizasyon

Bakterilerin insan vücudunun herhangi bir bölgesine veya cansız yüzeylere yerleşerek burada kalabilmek için geliştirmiş olduğu belli stratejileri bulunmaktadır. Tutunmak istediği konağın, fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstraselüler matriks proteinlerine, yüzey proteinlerini kullanarak yapışmaktadırlar. Bakterilerin yapısında bulunan, tutunmada görevli çeşitli proteinler, bu iş için anahtar rol oynamaktadır [36]. Tutunmanın ardından bakteriler, belirli bir sayının üzerine çıkarak kendi popülasyonunu oluşturmak için çoğalmakta ve biyofilm yapımına (EPS üretimi vb.) başlamaktadırlar. Aynı zamanda tutunmanın başlamasıyla bakteriler, birbirlerine tutunmaya ve yapışmaya başlamaktadırlar. Kolonize olmaya başladıkça da adhezyon ve motilitede (hareket) etkili proteinlerin sentezi baskılanmaktadır [37, 38].

1.3.2.3.Yaşanabilir Çevre Geliştirme

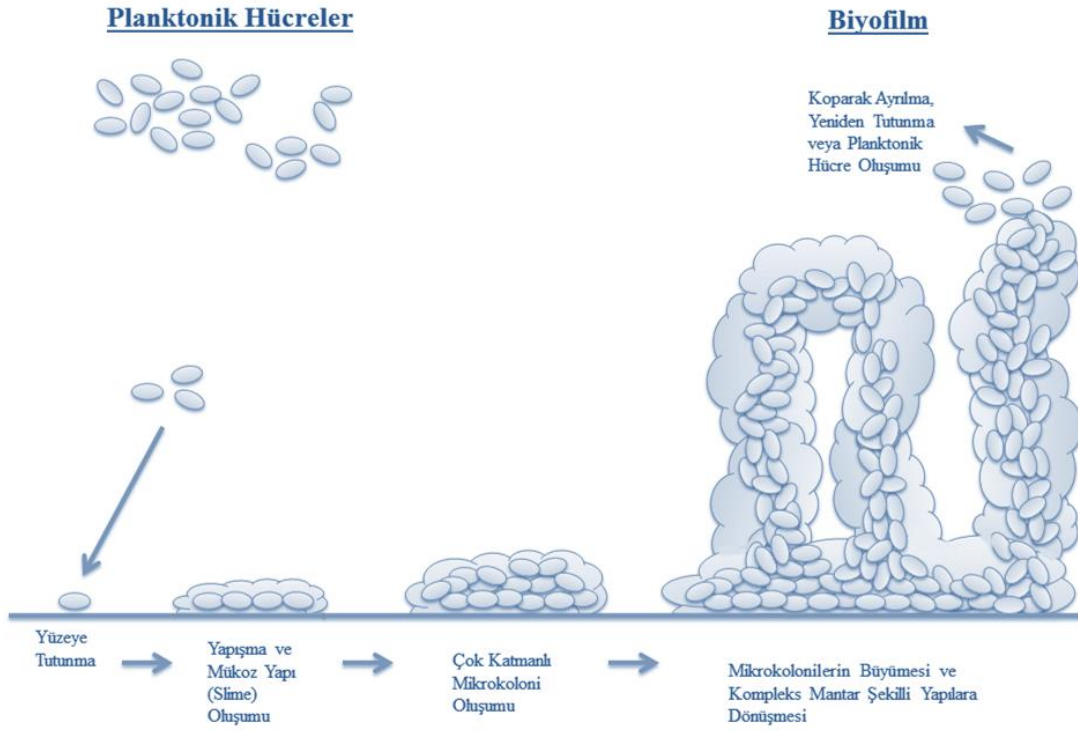
Bakterinin, konakçıda yaşamaya uygun bir ortam geliştirmek ve yaşam alanlarına adapte olmak için biyofilm oluşturmalarının gerekli olduğu belirtilmektedir [39, 40]. Karbon katabolitleri, konakçıya yapışmış bakterinin gen regülasyonunu indükleyerek, biyofilm oluşumunda kritik rol oynamaktadır. Yaşadıkları çevrede bulunan glukoz seviyesinin, bakterilerin EPS üretimini ve biyofilm oluşumunu artırdığı görülmektedir.

1.3.2.4.Topluluk Oluşturmak

Bakterilerin yaşam alanlarına adapte olabilmek için biyofilm meydana getirdikleri sıklıkla görülmektedir. Çevreden aldığı uyaranlar (besin, pH, sıcaklık vb.) sayesinde bakteriler, oluşturdıkları biyofilmden hızla ayrılarak planktonik hale geçebilmektedirler. Uyaranların durumuna göre biyofilm veya planktonik forma geçiş süreci, genler vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Bakterilerin tamamının çevresel uyaranlara karşı ortak yanıt vermeleri ve fenotipik olarak çeşitlilik göstermeleri toplu halde yaşamlarının en önemli göstergesidir.

1.3.3. Biyofilm Yapısı ve Oluşum Aşamaları

Bakterilerde biyofilm oluşumu, yüzeye tutunma, kalıcı olarak yapışma, mikrokoloni oluşumu, olgunlaşma ve koparak diğer bölgelere yayılma şeklinde beş ana süreçten oluşmaktadır (**Şekil 1.1.**) [41].



Şekil 1.1. Bakterilerde biyofilm oluşum aşamaları

1.3.3.1. Tutunma

Bakterilerde yüzeye tutunma, yüzeyin yapısı, yüzeyde oluşan öncül film tabakası, yüzeyin hidrofobik özelliği, bakterinin geliştiği besiyerinin hidrodinamiği, içeriği, bakteri yüzey yapılarının hidrofobik oluşu, bakteride EPS üretimi, flagella ya da pilus bulunup bulunmaması gibi birçok parametrenin kontrolünde gerçekleşmektedir (**Tablo 1.1.**). Bakterilerin sahip olduğu flagella ya da pilusların yapılarında hidrofobik aminoasit kalıntıları bulundurması, hücre dış yüzeylerinin hidrofobik özellik kazanmasına yardımcı olmaktadır. Bunun yanında flagellalar, bakterilerin akışa karşı gelerek yüzeye tutunmalarına da yardımcı olmaktadır [42].

Tablo 1.1.Yüzeye tutunma ve biyofilm oluşumunda etkili faktörler

Kategoriler	Faktörler
Yüzey	- Pürüzlü Yapı - Hidrofobisitesi - Fimbria Bulundurması
Hücre	- EPS Yapısı - Hidrofobisitesi - Flagella Bulundurması
Sıvı Ortam	- pH - Sıcaklık - Akış Hızı - Katyonlar

1.3.3.2.Yapışma

Tutunma gerçekleştikten sonra, yüzeydeki bakteri yoğunluğu arttıkça, QS sistemi vasıtasıyla salgılanan sinyal moleküllerinin konsantrasyonları da yükselmektedir. Sinyal moleküllerinin konsantrasyonundaki bu artış sonucu, biyofilm oluşumuna başlanmakta ve gerekli işlem dizisinin gerçekleşmesiyle, bakteriler yüzeye geri dönüşümsüz olarak kuvvetli bir şekilde yapışmaktadır [43].

1.3.3.3.Müköz Yapı (Slime) Oluşumu

Yapışan ve sayıları gittikçe artan bakteriler mikrokoloniler meydana getirmektedirler.

1.3.3.4.Olgun Biyofilm

Oluşturulan mikrokoloniler büyümekte ve karmaşık şekilli, mantar biçiminde yapılara ya da kulelere dönüşmektedirler.

1.3.3.5.Kopma ve Ayrılma

Olgun biyofilm içinde bulunan bakterilerin, birinin veya küme halinde birden fazlasının koparak çevreye yayılma evresidir. Bu safha ya fiziksel etkiyle ya da genetik kontrol yoluyla gerçekleşmektedir.

1.4.Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa, genellikle toprak ve suda yaşayan, özellikle bağışıklık yetersizliği olan hastalarda solunum ve idrar yollarında, yanık durumlarında ve açık yaralarda hastalık yapan fırsatçı bir patojendir. Tüm bunların yanında çoklu antibiyotik direnci gösteren *P. aeruginosa*, pnömoni, sepsis ve birçok akut enfeksiyona özellikle de kistik fibrozis olgularında, kronik akciğer enfeksiyonlarına sebebiyet veren bir mikroorganizmadır [28, 29, 44]. Ayrıca, temizlenmemiş küvet ve jakuziler gibi sulu ortamlarda dermatit yapabilmektedir. Tüm bu hastane enfeksiyonlarının yanında, *P. aeruginosa*'nın rekreasyonel sularda da sıklıkla biyofilm formunda bulunduğu ve dezenfeksiyona karşı daha dirençli bir form geliştirerek su kaynaklı hastalıklara da sebep olduğu bilinmektedir [45-48]. Son yıllarda, *P. aeruginosa* kökenli hastalıkların oranında, virülans faktör çeşitliliğinde ve antibiyotik direncinde görülen artış, *P. aeruginosa*'nın hastanelerde sıklıkla rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, iyileştirilmesi zor enfeksiyonların etkeni olarak görülmesine neden olmuştur [11, 49, 50]. Tüm hastane kökenli enfeksiyonların %10-25'inden *P. aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır [51].

1.4.1. Morfolojisi

P. aeruginosa, 1.5-3 µm arası uzunluğa ve 0.5- 0.8 µm arası genişliğe sahip olabilen, Gram negatif boyanan, sporsuz, kapsülsüz, basil veya kokobasil morfolojisi gösterebilen ve 5.6 - 8.0 pH aralığında yaşamını sürdürebilen zorunlu aerob bir bakteridir. Sahip olduğu bir adet flagellası sayesinde hareketli bir mikroorganizmadır. Yaşam süresinin ilerlemesine bağlı olarak ya da yaşam alanlarına eklenen antiseptik malzemelerin varlığında deforme olabilmekte ve hareketsiz formlar oluşturabilmektedir. [52-55].

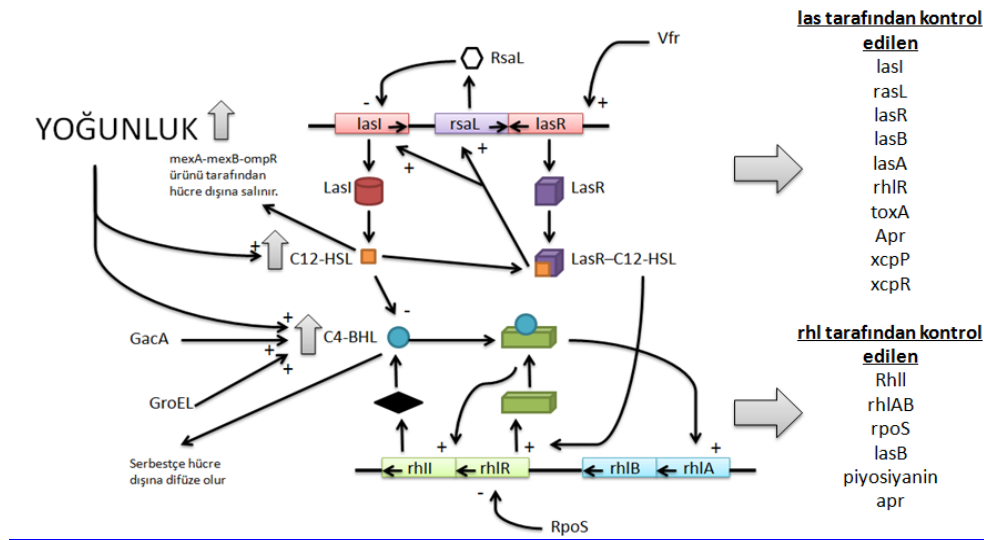
1.4.2. Tanısı ve Özellikleri

P. aeruginosa, ekildiği neredeyse tüm besi yerlerinde kolayca gelişebilen bir bakteridir. 20-42°C sıcaklıklar arasında çoğalabilmesine karşın, en iyi çoğaldığı sıcaklık 37°C'dir. Çoğaltılmasının kolaylığı, izole edilmesini de kolaylaştırmaktadır. Su ve topraktan izole edildiğinde, küçük, kaba koloniler oluştururken, klinik ortamdan izole

edildiğinde ise, yumuşak, düz ve kalkık kenarlı koloniler (mukoid olmayan) veya hücre dışına alginat salgılayan mukoid tipte koloniler meydana getirmektedirler [56]. Karbon kaynağı olarak laktoz içeren besi yerlerinde (EMB-Eozin Metilen Blue, MacConkey agar gibi), laktoz negatif koloni oluşturmaktadırlar. Çoğaldığı besi yerinde, kendine özgü aromatik meyve kokusu oluşturmakta ve bu sayede rahatça ayırt edilebilmektedirler [57]. *P. aeruginosa* suşları, piyosiyenin ve piyoverdin (diğer adıyla fluorescein) olmak üzere, temelde iki çeşit pigment üretmektedirler. Bu pigmentlerden piyosiyenin su ve kloroformda çözünürken, piyoverdin sadece suda eriyebilen bir pigmenttir. Piyosiyenin pigmentinin, ortam pH değeri bazik iken mavi veya yeşilimsi renk vermesinden dolayı, bakteri “*aeruginosa*” ismini almıştır. Aynı zamanda, yalnızca *P. aeruginosa* tarafından üretilen bir pigment oluşu, *P. aeruginosa*’nın ayırt edilmesinde kullanılmasını sağlamaktadır [52, 53, 58, 59].

1.5.*P. aeruginosa*’da Quorum Sensing Mekanizmaları

Gram negatif bakterilerin tamamı, kendilerine özgü bir AHL veya çoklu AHL’ler birleşimi oluşturmaktadırlar. Bu sistem sayesinde, sadece kendi türüne ait bakterilerin onları algılaması ve yanıt vermesi sağlanmaktadır. *P. aeruginosa* da, öteki Gram negatif bakterilerde olduğu gibi ortama AHL’ler salgılanmaktadır. [60-62]. *P. aeruginosa*’nın salgılamış olduğu AHL’ler, lasI/lasR, rhlI/rhlR ve Pseudomonas kinolon sinyali (PQS) olarak adlandırılan sistemler tarafından düzenlenmektedir (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. *P. aeruginosa*’daki las/rhl QS sisteminin modellenmesi

1.5.1. lasI / lasR Sistemi

P. aeruginosa'da las sisteminin temelini, kimyasal sinyallerin ortama salınmasında görev alan lasI sentez proteini ve sinyalin bakteri tarafından algılanmasından görevli lasR transkripsiyonel düzenleyici proteini oluşturmaktadır. lasI sistemi, bir çeşit AHL olan “N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserin lakton (3-O-C12-HSL)” üretiminden sorumludur. Çevreye salınan ve miktarı çoğalan 3-O-C12-HSL, transkripsiyonel faktörü aktifleştirmekte ve bunun sonucunda lasR transkripsiyonel düzenleyici proteini üretilmeye başlanmaktadır [60, 63]. Aynı zamanda lasR transkripsiyonel düzenleyici proteini, lasA, lasB, toxA, apr gibi virülans genlerinin de aktivasyonundan sorumludur. Ortamda bulunan 3-O-C12-HSL ve C4-HSL (N-butiliril homoserin lakton) konsatrasyon seviyesinin tepe değere ulaşmasıyla, farklı virülans genlerinin kopyalanmasını başlatmaktadır.

1.5.2. rhlI / rhlR Sistemi

P. aeruginosa'nın sahip olduğu, diğer QS mekanizması da ramnolipid üretiminden sorumlu olduğu bilinen rhl sistemidir. rhl sisteminin düzenlenmesi, rhlAB operonunun aktivasyonu ile sağlanmaktadır. Oto-indükleyici sentaz geni olarak bilinen rhlI önemli bir AHL olan C4-HSL üretiminde görev almaktadır. rhlR ise, sinyalin bakteri tarafından algılanmasında görevli transkripsiyonel düzenleyici bir proteindir. rhl sistemi kontrolündeki lasA geni proteaz, lasB geni ise elastaz, piyosiyenin, siyanit ve alkalik proteaz üretiminden sorumludur. Aynı zamanda rhl sistemi bakteride genel stres cevabını meydana getiren alternatif sigma faktörü σ (s) diğer adıyla rpoS'nin düzenlenmesinde de görev almaktadır [52, 64].

1.5.3. Pseudomonas Kinolon Sinyal (PQS) Sistemi

lasI ve rhlI sistemlerine ek olarak, kendini kontrol eden genleri ve aynı zamanda pek çok lasR ve rhlR bağımlı genleri bastıran bir 3-O-C12-HSL-duyarlı qscR sistemi bulunmaktadır [65, 66]. AHL sinyal sistemiyle iç içe olan bu sistem, PQS sistemine bağlanmaktadır [62, 67]. PQS sisteminde, 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon sinyal molekülü, las ve rhl sistemlerinden farklı olarak yalnızca PQS sistemine özgüdür [68, 69]. lasR geninin varlığında, PQS sinyal molekülü olan 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon

sentezlenmekte ve bu molekül rhlI geninin transkripsiyonunu indüklenmektedir. Kısaca, lasI / lasR QS sisteminin ürettiği sinyal dizileri oluştuktan sonra, PQS devreye girmekte ve rhlI / rhlR QS sistemi aktive olmaktadır. Böylece PQS, las ve rhl sistemleri arasında bağlantı kurmaktadır [70, 71].

1.5.4. *P. aeruginosa*'nın Virülans Faktörleri

P. aeruginosa'nın, QS mekanizmasının kontrolünde üretilen çok sayıda virülans faktörü tanımlanmıştır. Aynı zamanda *P. aeruginosa*'nın ürettiği bu virülans faktörleri sebebiyle, ciddi seyreden pek çok enfeksiyona sebep olmaktadır. Bakteri yoğunluğunda artışın görüldüğü logaritmik fazda, virülans üretiminin de arttığı belirtilmektedir [72]. *P. aeruginosa* suşlarına ait virülans faktörleri başlıca dört ana başlıkta toplanmaktadır (Tablo 1.2.).

Tablo 1.2. *P. aeruginosa* 'nın virülans faktörleri

Kategoriler	Virülans Faktörleri
Enzim ve Proteaz	Elastaz, Fosfolipaz C, Jelatinaz, Nötral Proteaz, Kollajenaz, Alkalın Proteaz, Lesitinaz, Sitotoksin
Adezyon	Piyocelin, Alginat, Fimbria, Pilus
Pigment	Piyorubin, Piyoverdin (Fluorescein) Piyosiyenin, Piyosin, α - oksifenazin
Toksin	Endotoksin, Ekzotoksin A, Ekzotoksin S, Sitotoksik leptin, Hemolizin

Bakterilerin yaşadığı çevredeki demir iyonu miktarı, azot miktarı, sıcaklık, ozmolarite gibi çevresel uyarıcılar birçok virülans faktörün ekspresyonunda etkili olmaktadır. Fakat virülans faktörlerin ekspresyonu, ancak bakteri yoğunluğunun belli bir eşik değerin üzerinde olduğu durumlarda gerçekleşmektedir [73]. Virülans faktörleri kodlayan genlerin ekspresyonunun ortamda bulunan uyarıcılardan etkilenmesi, virülans faktör üretimi sırasında kullanılan yolların da çeşitlenmesine yol açmaktadır [74, 75]. *P. aeruginosa* 'da virülans üretimi, lasR transkripsiyonel düzenleyici geninin AHL'leri algılayarak virülans faktörleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu tetiklemesiyle

başlamaktadır. Las sisteminin kontrolünde olan lasB geni, elastaz, piyosiyenin, siyanit ve alkalın proteaz; lasA geni proteaz; toxA geni exotoksin A ve aprA geni ise alkalın fosfataz sentezinden sorumludur. Tüm bu genlerin kontrolüyle sentezlenen faktörler, bakterinin virölansını artırmaktadır [52, 53, 76].

P. aeruginosa'nın ürettiği diğér bir önemli virölans faktör de, kistik fibrozis, boşaltım yolları enfeksiyonları, biyoprotezlerde görülen biyofilmlerin yapısında etkin rol alan alginat sentezidir [77]. Alginat, biyofilmin oluşumunun birinci adımı olan tutunmayı sağlayan ve de biyofilm matriksinde yaşayan bakterilerin bir arada kalmasını kontrol eden, önemli bir virölans faktördür [78]. Ayrıca meydana gelen biyofilmi, içinde yaşadığı konağın, lenfosit ve fagositlerinden, solunum sistemi yolundaki epitelin silier aktivitesinden, antikor ve immün sisteminden korumakta görev alarak, biyofilmin tedavi edilmesini zorlaştıran bir virölans faktördür.

1.5.5. *P. aeruginosa*'da Biyofilm Yapımı

Hastane kökenli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının %60'ından fazlasının, bakterinin meydana getirmiş olduğu biyofilme bağılı enfeksiyonlar olduğu belirtilmektedir. Bu tip enfeksiyonların, hastalığın şiddetinde, sıklığında ve tedaviye gösterilen dirençte artışa sebep olduğu da bildirilmektedir [50]. *P. aeruginosa* suşları, biyofilm oluşumunun ilk basamağı olan tutunmayı gerçekleştirmek için flagellalarını kullanmaktadırlar [78]. Alginat üretiminin de tutunmada etkin bir rolünün olduğu bilinmektedir. Bakteriler yüzeye tutunduktan sonra, yüzey üzerinde koloniler oluşturacak şekilde çoğalmakta ve yüzeye geri dönüşümsüz olarak yapışmaktadırlar. Tabakalar şeklinde yüzeye yapışmış olan bakteriler, tabakanın üst kısmında seğirme (twitching) hareketi yapmaktadırlar [79]. Bu seğirme hareketi aracılığıyla mukoz yapı içerisinde mikrokoloni formları oluşmaktadır. Meydana gelen mikrokoloniler büyümekte ve mantar şekline benzer yapılarda olgun biyofilm kolonilerine dönüşmektedir.

Yapılan çalışmalar, hastalarda biyofilm oluşumunun tamamlanması için QS mekanizmasının etkili ve gerekli olduğunu ve *P. aeruginosa*'da bu oluşumun meydana gelmesi için ramnolipid sentezinde görevli rhlA geninin aktif rol aldığını göstermektedir. Aynı zamanda *P. aeruginosa*'da ramnolipid oluşumu, olgun biyofilm

kolonilerinin mantar biçimli yapılara dönüşümünde etkili faktörlerden biridir [52, 53, 80]. lasI geni, *P. aeruginosa* PAO1 yabancıl suşunun biyofilm olgunlaşmasında gereklidir [81]. lasI genini mutasyona uğratarak biyofilm olgunlaşmasına etkilerini gözlemlemenin amaçlandığı çalışma, mutantların 3-O-C12-HSL sentezi yapamadığını, biyofilm gelişiminin mikrokoloni oluşumunun ardından durduğunu göstermektedir. Ortama 3-O-C12-HSL'un eklenmesinin ardından, biyofilmin olgunlaşmaya başladığı görülmektedir [82]. *P. aeruginosa* suşlarında biyofilm kopma noktasına geldiğinde, alginat-liyaz enzimi alginat üretimini azaltır ve bu da hücrelerin biyofilmden ayrılmasına sebep olur. Alginat liyaz enzimini kodlayan algL geninin, bu yüzden hücre ayrılması ile biyofilm yıkımında rol aldığı belirtilmektedir [83].

1.5.5.1.Çevre Koşullarının *P. aeruginosa*'da Yarattığı Stres ve Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Çevre koşullarına bağlı ortaya çıkan stres yanıtının aktifleşmesi, bakteri strese maruz kalır kalmaz değil, çoğunlukla logaritmik fazın sonlarına doğru ya da durağan faza geçiş esnasında görülmektedir [19]. Gram negatif bakterilerde en iyi bilinen genel stres yanıtı sistemleri, rpoS tarafından kontrol edilmektedir. Isı şokunun bütün mekanizması bilinmemekle beraber, genel stres cevabını oluşturan rpoS'ye bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir [84]. *P. aeruginosa*'da ısı şoku yanıtı, ısı şokunda etkili sigma faktörü rpoH kontrolünde lon proteaz ve asrA genleri tarafından gerçekleştirilmektedir [85]. Bakteri üzerine sıcaklık uygulanarak uyarılan çeşitli stres proteinleri, bakteriyi etkileyen sıcaklık nedeniyle hasar gören proteinleri toplamakta ve bakterinin bu hasar görmüş proteinlerden olumsuz olarak etkilenmesini engellemeye çalışmakta (groEL ve dnaK vb.) ya da sıcaklıkla hasar görmüş protein miktarını (lon ve clpAP vb.) azaltmaktadır [19, 86].

P. aeruginosa'nın yaşadığı çevrenin pH aralığı, biyofilmin içinde geliştiği sıvının akış hızı, ortamın sıcaklığı ve glukoz varlığı, meydana gelen biyofilmin şeklini ve oluşumunu etkilemektedir. Ayrıca, meydana getirdiği biyofilm sayesinde, klor gibi çeşitli kimyasallara ve elektrik akımı, ultrases gibi fiziksel dezenfektanlara karşı direnç geliştirerek ortamdan uzaklaştırılmasının zorlaştığı bilinmektedir. QS sonucu biyofilmin oluşabilmesi için AHL'lerin varlığı önemlidir. AHL'lerin bazik pH değerlerine karşı duyarlı oldukları, üretim hızlarının pH 7'de saatler sürerken, pH değeri

8'in üzerine çıktığında dakikalarla ölçüldüğü belirtilmektedir [87]. Yaşadığı çevrenin kimya dengesinin yanında, fiziksel şartları da *P. aeruginosa* biyofilminin oluşumunu etkilemektedir. Meydana getirdiği AHL'ler biyofilmden dışarı salınarak, etrafta bulunan sıvının akış hızına göre uzaklaşırlar, böylece ortamın hidrodinamik yapısına göre eşik seviyeye çıkamayan AHL miktarı, biyofilmin gelişimini etkilemektedir. *P. aeruginosa*'nın biyofilm meydana getirmesinde etkili başka bir faktör de, QS kontrolünde üretilen bir pigment olan piyoverdindir. Piyoverdin, ortamda bulunan demirin bakterinin tarafından alınmasında anahtar moleküldür [88]. Karbon kaynağı olarak glukoz da biyofilmin olgunlaşmasında görev alan başka bir önemli çevresel faktördür [80, 89]. QS sisteminin kontrolü altında, *P. aeruginosa*'nın ortamda süksinat ve glutamat bulunduğu durumlarda katı yüzeylerde yaptığı kayma hareketiyle yassı biçimli biyofilm meydana getirdiği, ortamda yalnızca glukoz bulunduğunda ise kayma hareketi yapmayarak mikrokolonilere ayrılmış biyofilm yapısı gösterdiği bilinmektedir [90]. Bunun gibi *P. aeruginosa*'nın, ortamda glukoz bulunduğunda mantar şeklindeki yapılarını su kanalları ile ayırdığı normal biyofilmler meydana getirdiği, sitrat varlığında ise yassı biyofilmler oluşturduğu yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [91, 92].

1.6.P. aeruginosa Genetik Cevabı

P. aeruginosa'nın ortam koşullarındaki değişikliğe bağlı olarak strese girmesi dolayısıyla biyofilm oluşturmaya ve virülans faktör üretmesi QS sistemi tarafından gen ekspresyonu vasıtasıyla kontrol edilmektedir [77, 93, 94]. Gerçekleştirilmiş genomik ve proteomik çalışmalar ile *P. aeruginosa*'nın strese karşı yanıt oluşturan genlerinin etki mekanizması büyük çoğunlukla çözümlenmiştir ve araştırmalara devam edilmektedir. Yapısında bulunan bu genlerin fizyolojisinde oynadığı roller incelendiğinde, adhezyon, QS, hücre duvar yapımı, metabolizma ve plazmide bağlanma durumlarında oldukça etkili oldukları ve birbirleriyle de bağlantılı olarak hareket ettikleri görülmektedir (**Tablo 1.3.**) [94, 95]. *P. aeruginosa*'nın tür içi ve türler arası iletişim sisteminin ve bu sistemi etkileyen parametrelerin (stres vb.) moleküler düzeyde aydınlatılması, solunum ve idrar yollarından kirli küvet ve jakuzilerde kadar geniş bir etki alanı bulunan *P. aeruginosa* kökenli hastalıkların tedavisinde oldukça önemlidir.

Tablo 1.3. *P. aeruginosa* 'nın QS, biyofilm ve stres cevabı oluşturmasında etkili genler ve fonksiyonları

Gen	Etki Mekanizması	Fonksiyon
LasA	Virölans faktör	Proteaz üretimi
Apr	Virölans faktör	Hemolizin üretimi
LasB	Virölans faktör	Elastaz, piyosiyanin, siyanit ve alkalın proteaz üretimi
ToxA	Virölans faktör	exotoksin üretimi
LasI	Quorum sensing	
LasR	Quorum sensing	
RhlI	Quorum sensing	
RhlR	Quorum sensing	
RhlA	Quorum Sensing	Ramnlipid sentezi
RpoH	Stres	Sıcaklık stresi
AsrA	Stres	Sıcaklık stresi
GroEL	Stres	Sıcaklık stresi
DnaK	Stres	Sıcaklık stresi
RpoS	Stres	Genel Stres cevabı, Biyofilm oluşumu
AlgU (RpoE)	Adhezyon	Biyofilm
AlgA	Adhezyon	Besin stresi alginat sentezi
AlgD	Adhezyon	Alginat sentezi düşük nitrojen, Biyofilm
AlgC	Adhezyon	Alginat sentezi yüksek osmolarite
PilA	Motilite	Pili protein
FlgD	Motilite	Flagellar basal-yapı modifikasyon proteini
FliD	Motilite	Flagellar protein (örtü)
FlgE	Motilite	Flagellar protein (çengel)
migA	Hücre	Hücre duvarı yapımı
bifA	Hücre	Membran sentezi

BÖLÜM 2

2. MATERYAL VE YÖNTEM / MATERIAL AND METHOD

2.1. Materyal

2.1.1. Bakteri Suşları

Yapılan çalışmada stres durumunda biyofilm genlerinin etkinliğini saptamak üzere *P. aeruginosa* PAO1 CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) 4122 standart suşu seçilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

1. LB Broth Besi Yeri (Conda)
2. Koyun Kanlı Agar (Salubris)
3. Agar Agar (Sigma)
4. Etil Alkol (Merck)
5. Eldiven (Küçük Pudralı/Pudrasız) (Beybi)
6. Ependorf Tüpü (0.2 ml ve 1.5 ml) (Axygen)
7. Cam Deney Tüpleri (Medlab)
8. Portüp
9. Polistiren 24 Kuyucuklu Plak (TPP)
10. Plastik Petri Kutusu (Fıratmed)
11. Bek Alevi
12. Platin Öze
13. Pipet Ucu (10µl, 100 µl, 1000 µl) (Axygen)
14. Quartz Spektrofotometre Küveti (1400 µl) (Hellma)
15. 0.45 µm'lik Filtre (Whatman)
16. Distile Su
17. Bazik Fuksin (Scharlau)
18. Gliserol (Merck)
19. High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche)
20. Gerçek zamanlı PZR kiti(Taqman)
21. cDNA sentez kiti (Fermentas)

22. Proteinaz K (Sigma)
23. KOH (Sigma)
24. HCl (Merck)
25. Klor (Superchlor)

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

1. **Manyetik Karıştırıcı (Sartorius):** Besi yerleri otoklava atılmadan önce karışımın homojenize edilmesi için kullanılmıştır.
2. **UV-VIS Spektrofotometre (Beckman-Coulter):** Sıvı bakteri kültürlerinin optik yoğunluklarının ve boyanan biyofilm miktarlarının ölçümünde kullanılmıştır.
3. **Dijital Hassas Terazî (Denver Instrument):** Besiyeri ve katı kimyasalları tartmak için kullanılmıştır.
4. **İnkübatör (MMM/Incucell ve Sanyo):** Besiyerlerine ekilen suşların inkübasyonu ve bazik fuksin hazırlanması sırasında kullanılmıştır.
5. **Vorteks (Labnet):** Sıvı bakteri kültürlerinin ve kimyasalların çalkalanmasında kullanılmıştır.
6. **Mini Santrifüj (Labnet):** PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), mRNA (mesajcı ribonükleik asit) ve cDNA (kopya deoksiribonükleik asit) karışımlarını çalkalamak için kullanılmıştır.
7. **pH Metre (Thermo/Orion):** HCl (Hidroklorik asit) ve KOH (Potasyum hidroksit) kullanılarak pH stres dozlarının ayarlanmasında kullanılmıştır.
8. **Derin Dondurucu (Thermo Scientific):** Suşların -86°C’de uzun süreli saklanması (3-6 ay) kullanılmıştır.
9. **Derin Dondurucu (Vestel):** Primer, prob, mRNA, cDNA ve kitlerin -20 °C’de saklanması için kullanılmıştır.
10. **Buzdolabı (Siemens):** Kimyasal ve hazırlanan katı-sıvı besî yerlerinin +4 °C’de saklanması için kullanılmıştır.
11. **Otoklav (Nüve):** Besiyeri hazırlama ve tüm sterilizasyon işlemleri sırasında kullanılmıştır.
12. **Otomatik Pipetler (1000µl, 100µl, 10µl) (Thermo/ Finnpiptette):** Besi yerleri, sıvı bakteri kültürleri ve sıvı kimyasalların aktarımında kullanılmıştır.

- 13. Gerçek Zamanlı PZR (Roche LightCycler 2.0):** Biyofilm yapımında etkili olduğu literatürde belirtilen genlerin çoğaltılmasında kullanılmıştır.
- 14. Gerçek Zamanlı PZR (Roche LightCycler Nano):** Biyofilm yapımında etkili olduğu literatürde belirtilen genlerin çoğaltılmasında kullanılmıştır.
- 15. Class II (Biyohazart) Ayaklı Steril Kabin (Tez-San ve Faster):** mRNA ve cDNA'ların kontamine olmasını engellemek için kullanılmıştır.
- 16. Çeker Ocak (Tez-San):** Kimyasalların hazırlanmasında kullanılmıştır.
- 17. Mikrodalga Fırın (Phillips):** Besi yeri hazırlanmasında kullanılmıştır.
- 18. Ultra Distile Saf Su Cihazı (Millipore):** Besi yeri ve PZR karışımı hazırlanması sırasında kullanılmıştır.
- 19. Magna Pure Compact Sistemi (Roche):** mRNA izolasyonunda kullanılmıştır.
- 20. Termal döngü cihazı (Techne):** mRNA'lardan cDNA eldesinde kullanılmıştır.

2.1.4. Kimyasalların Hazırlanması

2.1.4.1. Bazik Fuksin

Toz halindeki 10 g bazik fuksin tartılıp bir miktar %95'lik etil alkolde çözdürüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır. 37°C'de bir gece inkübatörde bekletilen çözelti 0.45 µm por çapında filtreden süzölmüş ve ışık geçirmeyen kapaklı cam şişelerle alınarak +4°C'de kullanıma kadar saklanmıştır.

2.1.4.2. Klor Çözeltisi

Toz halindeki 0.05 g klor tartılarak bir miktar distile suda çözdürölmüş ve hacmi 10 ml'ye tamamlanmıştır. Klorun uçuculuğunun yüksek olmasından dolayı çözelti deney sırasında hazırlanmış ve tüketilmiştir.

2.1.4.3. HCl Çözeltisi

% 37'lik HCl çözeltisi asidik pH stresi oluşturmak için kullanılmıştır.

2.1.4.4. KOH Çözeltisi

Çalışmalarda kullanılmak üzere %10'luk KOH çözeltisi için toz halinde 10 g KOH tartılarak bir miktar distile suda eritilmiş ve hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır. Oda

sıcaklığında kapaklı cam şişelerde kullanıma kadar saklanmıştır.

2.1.5. Besiyerlerinin Hazırlanması

2.1.5.1. Luria Bertani (LB) Broth

- 10 g tripton
- 5 g maya özütü
- 5 g NaCl

Toz halindeki LB brothdan 20 g tartılmış ve bir miktar distile suda çözündürülerek hacmi 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra cam tüplere 10'ar ml dağıtılmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan tüpler 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra kullanıma kadar +4°C buzdolabına kaldırılmıştır.

2.1.5.2.Luria Bertani (LB) Agar

- 10 g tripton
- 5 g maya özütü
- 5 g NaCl
- 12 g Agar agar

Toz halindeki LB brothdan 20 g tartılmış ve üzerine 12 g Agar agar eklenerek bir miktar distile suda çözündürülmüş ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra 45°C'ye kadar soğutulmasının ardından steril koşullarda petri kutularına uygun miktarlarda dağıtılmıştır. Petri kutuları içerisinde donan besi yerleri kullanıma kadar +4°C buzdolabında saklanmıştır.

2.1.5.3.Koyun Kanlı Agar

Kültürün saflığını kontrol etmek amacıyla %5 koyun kanı içeren hazır katı besi yeri kullanılmıştır.

2.2.Yöntem

2.2.1. Bakterilerin Saklanması ve Çoğaltılması

Bakteri stok kültürleri, -86°C’de %50 gliserol içerisinde muhafaza edilmiştir. Stok kültürden deney sırasında kullanmak üzere LB broth besi yerine uygun koşullarda ardı ardına 2 kere pasaj alınmıştır. Sıvı besi yerinde gelişen kültürlerin saflığı kanlı agara çizgi ekim yapılarak kontrol edilmiştir.

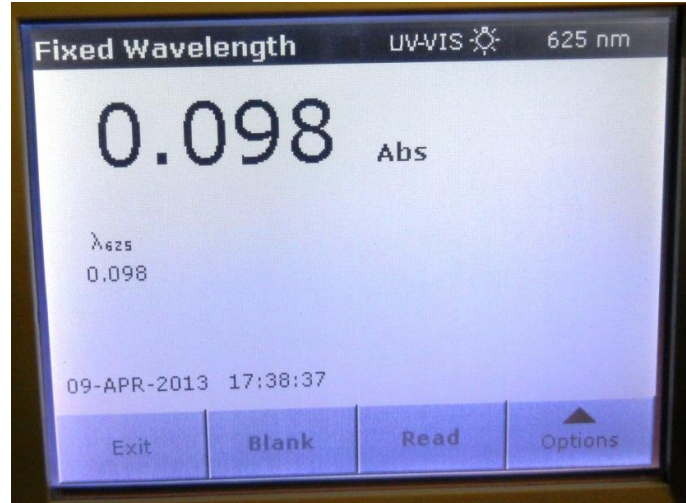
2.2.2. Bakteri Suşlarının Sıvı Besiyerine Kültüre Alınması ve Yoğunluğunun Belirlenmesi

Deneylerde kullanılan bakteri suşları kullanıma hazır hale getirilmek için LB broth besi yerine ekilmiş ve çoğalmaları için 37°C’de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonrasında deneylerde test edilecek bakteri yoğunluğu, 625 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometrede optik yoğunluğa (O.D.) göre seri dilüsyona tabi tutularak 0.5 McFarland’a ayarlanmıştır (**Tablo 2.1. ve Şekil 2.1.**).

Tablo 2.1. McFarland standardı spektrofotometre karşılığı

0,5 McFarland Standardı	İçerik
Baryum Klorit, 0.048M solüsyonu	0.5 ml
Sülfirik Asit, 0.18M solüsyonu	99.5 ml
625 nm Optik Yoğunluğa göre (O.D.)	0.08-0.1

McFarland Standardı	0.5
Yaklaşık Bakteri Yoğunluğu x 10 ⁸	1.5



Şekil 2.1. 625 nm’de bakteri süşuna ait absorbans değeri

2.2.3. Süşlara Stres Uygulanması

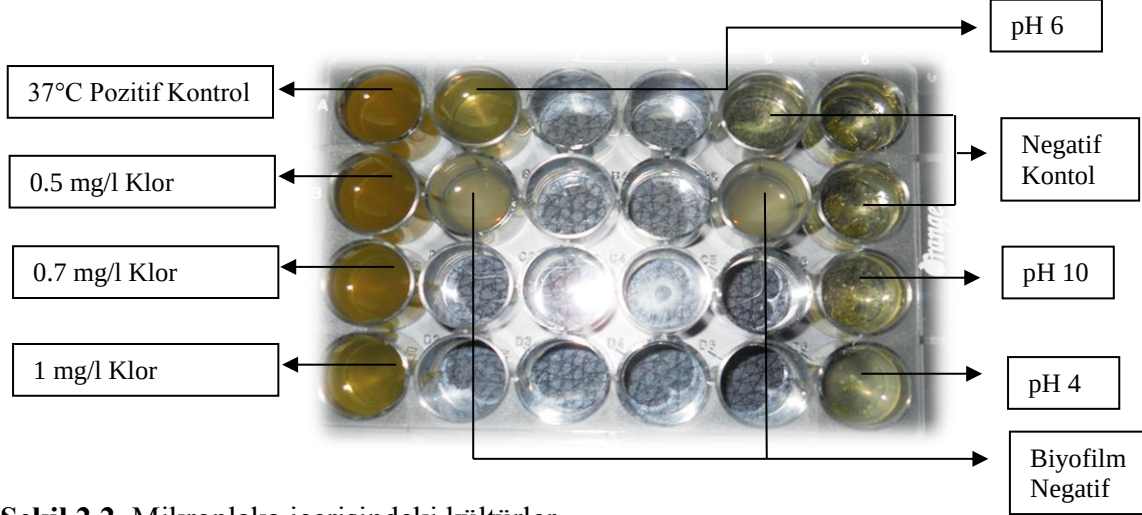
0.5 McFarland standardına ayarlanan bakteri kültüğü ayrı ayrı sıcaklık, klor ve pH streslerine tabi tutulmuştur. Seçilen her bir stres durumu için üç farklı doz test edilmiştir (Tablo 2.2. ve Şekil 2.2.).

Tablo 2.2. Stres Dozları

Parametre	Doz 1	Doz 2	Doz 3
pH	4	6	10
Sıcaklık (°C)	25	37	40
Klor (mg/l)	0.5	0.7	1

Test için 24 kuyucuklu plaka içerisine 2’şer ml LB broth besi yeri eklenerek, üzerine 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlı 100 µl bakteri örneğı konulmuştur. Kültürde 0.5 mg/l, 0.7 mg/l, 1 mg/l klor stresleri yaratmak için, besi yerlerine gerekli oranlarda klor çözeltisi eklenmiştir. pH 4, pH 6, pH 10 pH stresi yaratmak için ise besi yeri içerisine yavaş yavaş HCl ve KOH çözeltileri eklenmiştir. Klor ve pH doz ayarlamaları çeker ocak içerisinde yapılmıştır. Klor ve pH stresleri için hazırlanan plakalar 37°C’de, 3 gün inkübe edilerek biyofilm oluşturulmuştur. Dozların kültürler üzerinde yarattığı öldürücü etkinin test edilmesi için, stres dozları kuyucuklara eklendikten bir saat sonra, her bir kuyucuktan alından 10 µl örnek, LB agar besi yerine ekilmiştir. Sıcaklık stresi

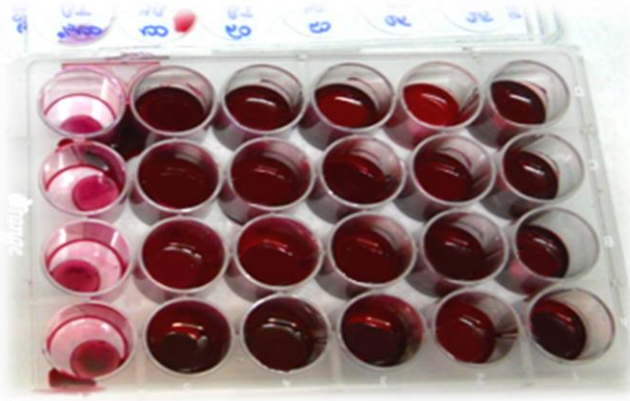
için ise doz 1 (25°C) test plakaları oda sıcaklığında, doz 2 (37°C) test plakaları 37°C'ye ayarlı inkübatör içerisinde, doz 3 (40°C) test plakaları ise 40°C'ye ayarlı ayrı bir inkübatörde tutulmuştur. Aynı koşullarda hazırlanmış ancak stres uygulanmamış ve biyofilm oluşturmamış bir gecelik normal bakteri kültürü karşılaştırma yapmak için hazırlanmıştır. Biyofilm pozitif kontrolü olarak da stres uygulanmayan *P. aeruginosa* PAO1 suşu 37°C'de üç gün bekletilmiştir. Negatif kontrol için ise steril LB Broth besi yeri, boş bir kuyucuğa eklenmiştir. Her deney 3'er kez tekrar edilmiştir.



Şekil 2.2. Mikroplaka içerisindeki kültürler

2.2.4. Biyofilmlerin Boyanması

Sıcaklık, klor ve pH streslerine maruz bırakılan bakteriler, 3 günlük inkübasyonun ardından biyofilm miktarının ölçülmesi için boyanmıştır. İnkübasyonun yapıldığı 24 kuyucuklu plakalarda bulunan planktonik bakteriler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklar 3 kere distile su ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından kuyucuklara 400 µl %10'luk bazik fuksin eklenmiştir. 5 dakika boya ile müdahelenin ardından, boyanın fazlasını kaldırmak amacıyla kuyucuklar tekrar 3 kere distile su ile yıkanmıştır. Yıkamış kuyucuklara -20°C'de saklanan %99'luk etil alkol ilave edilmiş ve 10 dakika bekletilmiştir. Etil alkol içinde çözünmüş biyofilmin yoğunluğu, spektrofotometre ile 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kör olarak aynı işlemlerden geçirilmiş negatif kontrol kullanılmıştır. Test bulguları, pozitif kontrol PAO1 suşunun absorbans değerleri ile karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır.



Şekil 2.3. Mikroplaka içinde boyanmış kültürler

2.2.5. Hedef Genlerin, Uygun Primerlerin ve Probların Seçilmesi

Hedef gen bölgeleri, konuyla ilgili literatür taraması ve internet aracılığı ile elde edilen *P. aeruginosa* PAO1 tüm genom dizisi üzerinden (www.pseudomonas.com) seçilmiştir. *P. aeruginosa* PAO1 suşunda biyofilm ve stres oluşumunda etkili olduğu belirtilen yedi gen bölgesi (*rpoS*, *bifA*, *migA*, *dnaK*, *katB*, *soxR*, *algC*) belirlenmiştir. Bölgelere has primer dizileri ve uygun proplar, *Roche Universal Probe Library*'den (UPL) (<http://www.roche-applied-science.com/>) belirlenmiştir (Şekil 2.4. ve Tablo 2.3.).

- ▼ Real-Time PCR
 - ▶ LightCycler® Carousel-Based System
 - ▶ LightCycler® 480 System
 - ▶ LightCycler® 1536 System
 - ▶ LightCycler® 96 System
 - ▶ LightCycler® Nano System
- ▼ Universal ProbeLibrary System
 - ▶ System Description
 - ▶ Technology
- ▼ Assay Design Center
 - ▶ Assay Design Guide
 - ▶ Quick Reference
 - ▶ Probe No. Conversion

Universal ProbeLibrary Assay Design Center

Design RT-qPCR assays, including the probe and gene specific primer for your targets of choice, in just 3 easy steps.

Simply:

1. Select your organism
2. Enter your gene accession number, gene name, or sequence
3. Click Design

1. Start by selecting your target organism below:

Select organism ▼

Explore the links below for more information, including how to combine target assays with Universal ProbeLibrary reference gene assays.

Universal ProbeLibrary for Other organism

Specify your target(s):

[Advanced primer3 settings](#)

By sequence

e.g.

>Sequence in FASTA format or plain sequence format

```
CGATTGAGCTTTGGAGCCAAITGTGAAAGCTGGTGAATGTTGCAACCTGGGGACCTA
AAGGAGCCGAACCGATTATTTCGAGCTCTGTTTCAAGTTCTTATTCTCGGCCAGTTGAGA
ATGAGAATGTAATCCGAAAGCGTTTGAATTCCTCCACCACTCAATTCTCTCTCCAACA
AGGAAATCCGACGTATCGACAGGATGTTCTTCGACTGAATGCGGCAITTAATGGATCCCA
ATGGGCCGCTGTGTTCAATGTACCAAGCCATACAGTATCTATGAGATCGTGATGACAC
```

☒ Automatically select an intron spanning assay.

Design

[ProbeFinder Version: 2.49](#)

Şekil 2.4. Universal Prob Kütüphanesi Veri Bankası

Tablo 2.3. Seçilen primerlere ait bilgiler

Primer	Uzunluk	Pozisyon	Tm	%GC	Dizi
bifA (Sol)	20	1119 - 1138	55,1	55	catcggtatcaccctgttcc
bifA (Sağ)	20	1159 - 1178	56,5	55	gccttctgcagcagttctc
dnaK (Sol)	21	563 - 583	56,4	52	acaccgtgatcgcttatgacc
dnaK (Sağ)	19	604 - 622	55,1	58	cgatctcgatcaccgacac
migA (Sol)	19	166 - 184	57,2	58	tccaccgacaacagctacg
migA (Sağ)	19	207 - 225	57,4	58	gagctggaaccgtggact
rpoS (Sol)	20	293 - 312	55,3	55	ggatgatcgagagcaacctg
rpoS (Sağ)	20	340 - 359	54,7	50	gacagtccgcgattgacata
katB (Sol)	20	742 - 761	53,8	45	aagaacctcgatccgaaaca
katB (Sağ)	20	783 - 802	57	55	tggtcatgtggctgtagtcg
soxR (Sol)	20	74 - 93	53,8	50	ccctgcatttctacgaaacc
soxR (Sağ)	19	138 - 156	56,8	58	tagcgtctcgcgactgaag
algC (Sol)	20	1014 - 1033	54,4	50	cttcgacgatggcatctaca
algC (Sağ)	18	1063 - 1080	56,1	61	gctgtcacgctgatcctg

2.2.6. mRNA İzolasyonu

Biyofilm oluşturmak için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucu, bakterilerde strese karşı en etkili biyofilm yanıtı oluşturan dozlar seçilmiş ve bu stresi oluşturan dozların örneklerinden mRNA izolasyonu yapılmıştır. Seçilen stres koşulları (sıcaklık, klor ve pH) için üçer farklı doz ile oluşturulan ve optimize edilen biyofilm kültürlerinin her birinden 500'er µl örnek alınmış ve üzerlerine 40'ar µl proteinaz K eklenmiştir. 95°C'de 15 dakika su banyosunda bekletilen örneklerin izolasyonu, kit kullanılarak (*High Pure RNA Isolation Kit*) yapılmıştır. İzole edilen mRNA'lar, kullanıma kadar dondurularak -20°C'de saklanmıştır. Kullanım esnasında ise buz içinde muhafaza edilmiştir.

2.2.7. mRNA' dan cDNA Sentezi

İzole edilen mRNA'lardan, cDNA eldesi kit kullanılarak (Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) yapılmıştır. Buz üzerinde çalışılacak örnek sayısı kadar, içeriği aşağıda verilen karışım hazırlanmıştır.

Random Hexamer Karışımı:

RNA	8 µl
Random hexamer (0.2 µg/ µl)	1 µl
<u>dH₂O</u>	<u>3 µl</u>
Toplam	12 µl

Hazırlanan tüpler PZR cihazında 80°C'de 3 dakika tutulmuş, daha sonra buz üzerinde 2 dakika bekletilmiştir. Reverse transkriptaz enzimi ve RNaz inhibitörü buz üzerinde tutularak aşağıda içeriği verilen cDNA karışımı hazırlanmıştır.

cDNA Karışımı:

5X RT Buffer	4 µl
10 mM dNTP	2 µl
RNase inhibitör (20 u/ µl)	1 µl
<u>Reverse Transcriptase (200 u/ µl)</u>	<u>1 µl</u>
Toplam	8 µl

Hazırlanan cDNA karışımından her bir random hexamer tüpü içerisine 8 µl eklenmiştir. PZR tüpleri termal döngü cihazında, aşağıda belirtilen cDNA protokülüne göre çalıştırılmıştır.

cDNA PZR Protokolü

37 °C 90 dakika

94 °C 2 dakika

PZR tamamlandıktan sonra cDNA'lar -20 °C'de kullanıma kadar saklanmıştır.

2.2.8. cDNA'ların Gerçek Zamanlı PZR ile Çoğaltılması

Elde edilen cDNA'lar, uygun primerler ve problr kullanılarak gerçek zamanlı PZR yöntemiyle çoğaltılmış ve belirlenen stres durumlarının biyofilm oluşturma yeteneğini gen ekspresyonu seviyesinde nasıl etkilendiği incelenmiştir. cDNA'ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltılması (*TaqMan Real Time PCR Master Mix*) kit kullanılarak yapılmıştır. Çalışılacak örnek sayısı kadar aşağıdaki karışım hazırlanmıştır.

PCR Karışımı:

Su	8,8 µl
Primer Left	1 µl
Primer Right	1 µl
Probe	0,2 µl
Enzim	4 µl
<u>cDNA</u>	<u>5 µl</u>
Toplam	20 µl

Deneyleler öncelikle Roche LightCycler 2.0 PZR cihazı ile yapılmış, ışıık yansıması için Taqman prob kullanılmıştır ve aşağıda belirtilen protokol uygulanmıştır.

PCR Döngüsü:	45 döngü	
Denatürasyon:	95°C	10 dk
Amplifikasyon:	95°C	10 sn - Denatürasyon
	54-56°C	40 sn - Yapışma
	72°C	1 sn - Uzama
Soğuma:	40°C	30 sn

Çalışmalar daha sonra LightCycler Nano gerçek zamanlı PZR cihazı ile tekrar edilerek kapiller sistem ile LightCycler Nano gerçek zamanlı PZR sistemi bulgularının güvenilirliği test edilmiştir.

2.2.9. PZR Bulgularının Okunması

Bulgular, gerçek zamanlı PZR cihazı tarafından oluşturulan crossing point (CP) denilen ışıık seviyelerinin, değerlendirilmesi ile yapılmıştır. Gerçek zamanlı PZR cihazı tarafından oluşturulan CP ışıık seviyeleri, her örneğin ışıık değeri artmaya başladığı döngüyü, o örnek için CP değeri olarak belirlemiştir. Yani gen anlatım miktarı fazladır. CP değeri ne kadar küçükse, çoğalma o kadar erken başlamıştır. CP değeri, gen anlatım seviyesi ile ters orantılıdır ve küçük CP değerleri çoğalmanın erken döngülerde başladığını göstermektedir.

2.2.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 paket programı ve Bestkeeper ver. 1.0 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Gen anlatımları arasındaki uyum Pearson korelasyon testine ve regresyon analizlerine dayanarak değerlendirilmiştir. Kapiller ve LightCycler Nano gerçek zamanlı sistemi kullanan gerçek zamanlı PZR bulgularının karşılaştırmaları student t testi kullanılarak yapılmıştır.

BÖLÜM 3

3. BULGULAR VE TARTIŞMA / RESULTS AND DISCUSSION

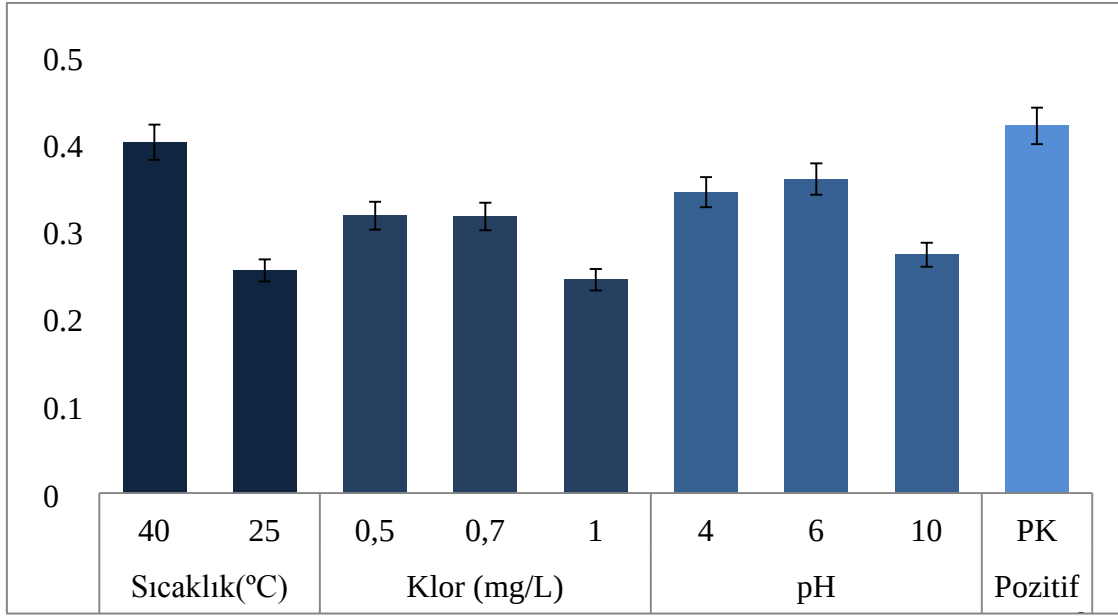
3.1.Bulgular

3.1.1. Biyofilm Boyama Bulguları

Sıcaklık, klor ve pH streslerine maruz bırakılan bakteriler 3 günlük inkübasyonun ardından biyofilm miktarının ölçülmesi için boyanmıştır. Stres koşulları, biyofilm boyamaları ile yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda seçilmiştir. Her deney üçer kez tekrar edilmiş, 540 nm dalga boyunda ölçülen kültürler bazik fuksin ile boyanmış ve biyofilm miktarlarının ortalamaları alınmıştır. Spektrofotometrik ölçümler sonucu elde edilen biyofilm miktarına ait absorbans değerleri aşağıda verilmiştir (**Tablo 3.1., Şekil 3.1.**).

Tablo 3.1. Boyama sonucunda elde edilen biyofilm miktarları

Parametre	Stres Koşulu	Biyofilm Absorbans Değeri (540 nm)
Sıcaklık (°C)	25	0.285±0.092
	40	0.449±0.050
Klor (mg/l)	0.5	0.355±0.013
	0.7	0.354±0.028
	1	0.273±0.024
pH	4	0.385±0.023
	6	0.402±0.035
	10	0.305±0.007
Pozitif Kontrol	37 °C	0.470±0.041



Şekil 3.1. Boyama sonucunda elde edilen biyofilm miktarları

Ölçüm bulgularına göre, en yüksek biyofilm miktarının, stres uygulanmamış *P. aeruginosa* PAO1 yabanıl suşuna ait olduğu görülmüştür. 37 °C ile 40 °C sıcaklık stresine maruz bırakılmış bakterilerde, biyofilm miktarı birbirine yakın değerlerde ölçülürken, 25 °C’lik stres durumunda biyofilm miktarında azalma gözlenmiştir. 0.5 mg/l ve 0.7 mg/l klor stresi uygulanmış bakteri kültürlerinde, 1 mg/l klor stresi uygulanmış kültüre göre daha fazla biyofilm oluşmuştur. pH 6 asit ortamına maruz bırakılan örneklerde ölçülen biyofilm miktarı, pH değerinin pozitif kontrole yakın oluşundan dolayı kontrole benzer olarak ölçülmüştür. Asitlik ve bazlık arttıkça biyofilm oluşumunda azalma meydana gelmiştir.

3.1.2. Gerçek Zamanlı PZR Deneyi Bulguları ve CP Değerlerinin Değerlendirilmesi

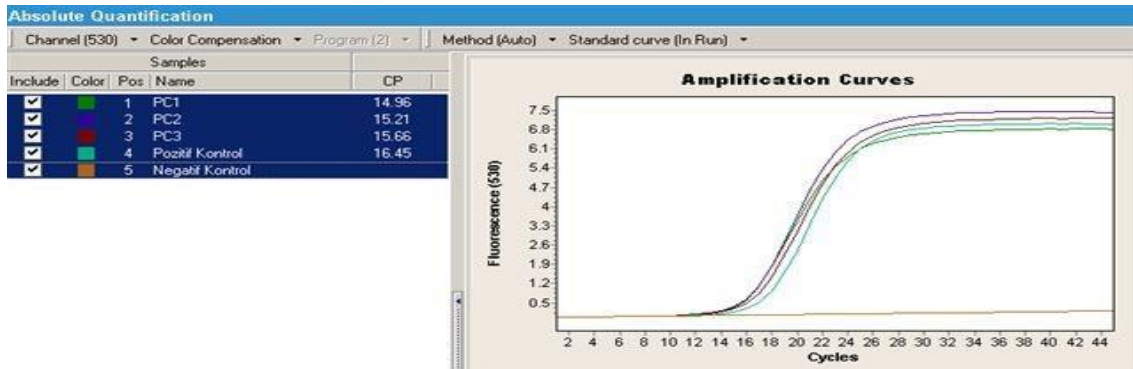
PZR çalışması için kullanılan cDNA’lar, uygulanan streslerin çeşidi ve bu streslerin içeriklerine göre kodlanmıştır (**Tablo 3.2.**).

Tablo 3.2. Stres uygulanmış örneklerin kodları

Örnek Kodu	Stres Koşulu
PS1	25°C
PS2 (Kontrol)	37°C
PS3	40°C
PH1	pH 4 (HCl)
PH2	pH 6 (HCl)
PH3	pH 10 (KOH)
PC1	0.5 mg/l Klor
PC2	0.7 mg/l Klor
PC3	1 mg/l Klor
PN	Biyofilm Negatif

LightCycler 2.0 PZR cihazı kullanılarak, rpoS, bifA, migA, dnaK, katB, soxR ve algC genlerinin stres karşısındaki etkinliğinin belirlenmesi için yapılan çalışma bulgularını gösteren analiz grafikleri aşağıda verilmiştir. Her genin farklı dozlarda uygulanan klor, pH ve sıcaklık stresleri biyofilm pozitif ve biyofilm negatif örnekler ile kendi aralarında CP değerlerine göre değerlendirilmiştir.

3.1.2.1.Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak rpoS Gen Anlatım Seviyeleri

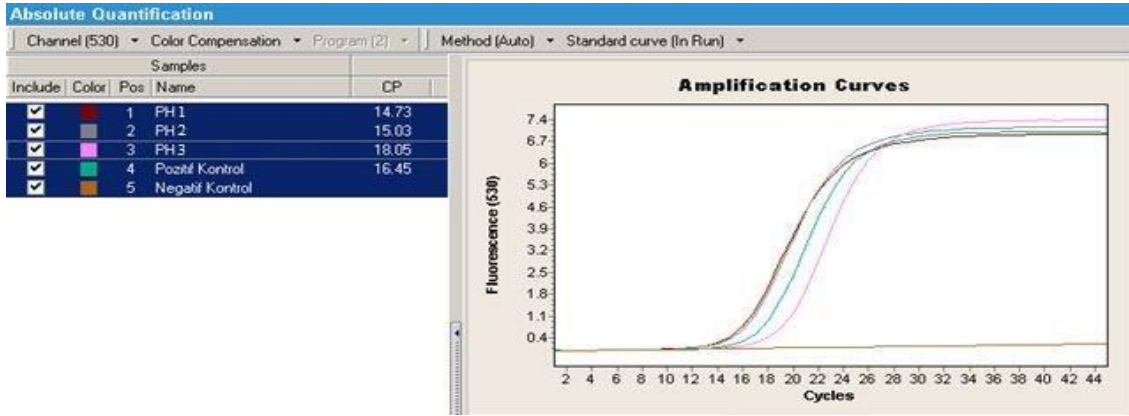


Şekil 3.2. Farklı klor değerleri karşısında rpoS geni anlatım seviyesine ait bulgular

Literatürde, genel stres cevabında ve biyofilm oluşumunda etkili olduğu belirtilen rpoS geninin, klor stresi grafikleri ve gerçek zamanlı PZR cihazı tarafından oluşturulan CP ışıma değerleri Şekil 3.2.'de gösterilmektedir. Stres uygulanmamış

pozitif kontrole (PS2) ait rpoS geni anlatım seviyesinin CP değeri, **16.45** olarak bulunmuştur. PC1 (14.96), PC2 (15.21) ve PC3 (15.66) örneklerine ait CP değerleri 16.45'den düşük seviyede ölçülmüştür. Bu bulgu, gen anlatımının normalden daha yüksek olduğuna işaret etmektedir. PC1 örneğinde CP değerinin diğer örneklere kıyasla daha düşük ölçülmesi, 0.5 mg/l klor stresine maruz bırakılmış örneklerin daha yüksek anlatım yaptığını düşündürmektedir. Stres uygulanmamış ve biyofilm oluşturmamış bir gecelik kültüre (PN) ait rpoS geni anlatım seviyesinin CP değeri **Şekil 3.18.**'de verilmiştir. **24.512** olarak ölçülen PN'ye ait CP değeri PS2 ile karşılaştırıldığında, gen anlatımının biyofilm durumunu arttığı tespit edilmiştir. Yine bu veriler boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında, rpoS geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

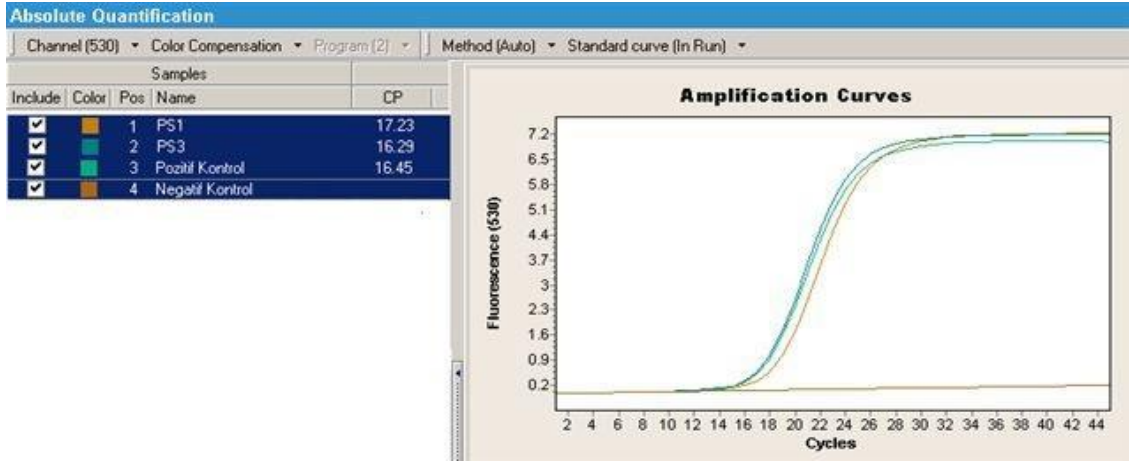
3.1.2.2.Farklı pH Değerlerine Yanıt Olarak rpoS Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.3. Farklı pH değerleri karşısında rpoS geni anlatım seviyesine ait bulgular

Şekil 3.3.'te verilmiş PH1(14.73) ve PH2 (15.03) örneklerindeki CP değerleri PS2'ye (**16.45**) göre düşük seviyede ölçülmüştür. PH1 ve PH2 için ölçülen değerler gen anlatımının normalden daha yüksek olduğunu, PH3 (18.05) örneklerinde normalden yüksek bulunan CP değeri ise gen anlatımının azaldığını göstermiştir. PH1 örneğinde CP değeri diğer örneklere kıyasla daha düşük ölçülmüştür. Bu bulgu, pH 4 asit stresine maruz bırakılmış örneklerin daha yüksek anlatım yaptığını işaret etmektedir. **Şekil 3.18.**'de verilmiş **24.512** olarak ölçülen PN'ye ait CP değeri PS2 ile karşılaştırıldığında, biyofilm durumunda gen anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Yine bu veriler boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında, rpoS geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

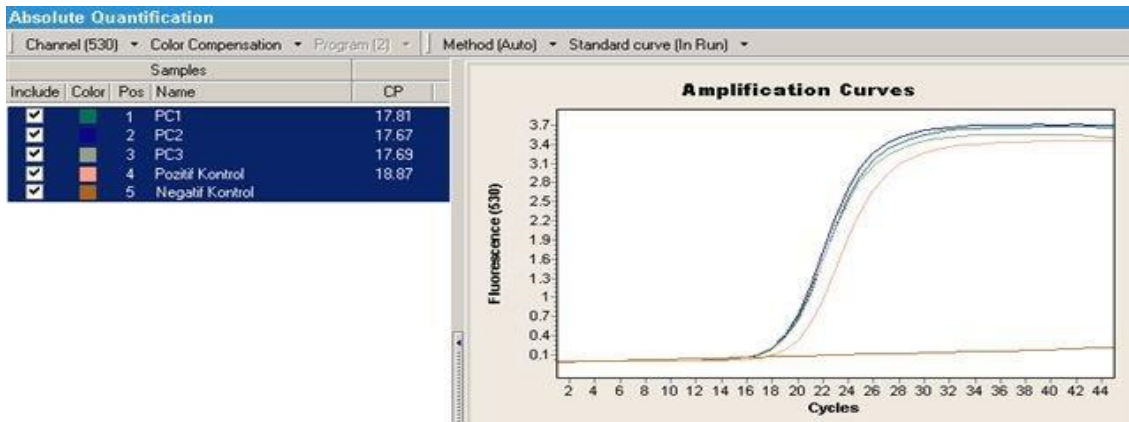
3.1.2.3.Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak rpoS Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.4. Farklı sıcaklık değerleri karşısında rpoS geni anlatım seviyesine ait bulgular

Şekil 3.4.'te verilmiş PS1 (17.23) örneğinde CP değeri PS2 (16.45)'den yüksek seviyede ölçülürken, PS3 (16.29) örneğinde ise CP değeri pozitif kontrol seviyesinde ölçülmüştür. PS1'de CP değerinin normalden yüksek oluşu, gen anlatımının azaldığını göstermiştir. PS3 gen anlatımında ise belirgin bir değişiklik olmamıştır. Şekil 3.18.'de verilmiş 24.512 olarak ölçülen PN'ye ait CP değeri PS2 ile karşılaştırıldığında, gen anlatımının biyofilm durumunda arttığı tespit edilmiştir. Yine bu veriler boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında, rpoS geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

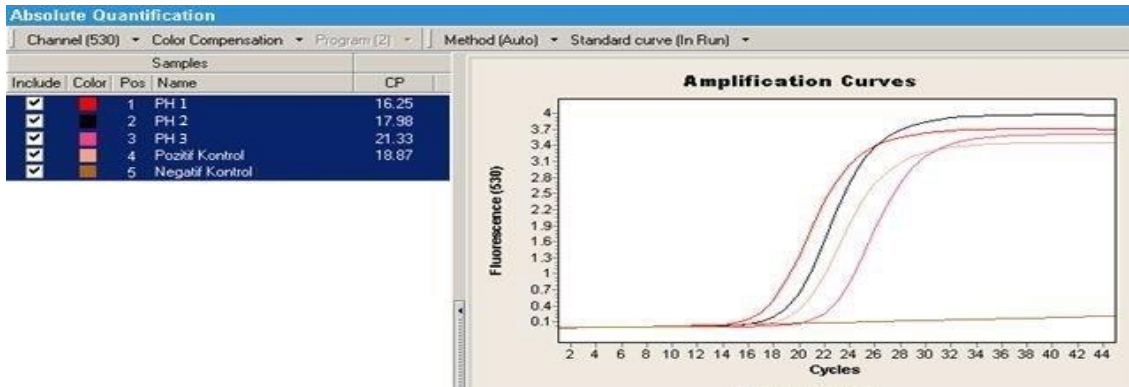
3.1.2.4.Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak bifA Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.5. Farklı klor değerleri karşısında bifA geni anlatım seviyesine ait bulgular

Literatürde biyofilm oluşumunda ve hücre membranı yapımında etkili olduğu belirtilen bifA geninin, farklı dozlarda klor stresine tabi tutularak elde edilen anlatım seviyelerine ait bulgular **Şekil 3.5.**'de belirtilmiştir. PS2'ye ait bifA geni anlatım seviyesinin CP değeri, **18.87** olarak ölçülmüştür. PC1 (17.81), PC2 (17.67) ve PC3 (17.69) örneklerine ait CP değerleri 18.87'den düşük seviyede ölçülmüştür. Bu bulgu, gen anlatımının normalden daha yüksek olduğunu göstermektedir. PN'ye ait rpoS geni anlatım seviyesinin CP değeri **Şekil 3.19.**'da verilmiştir. **26.753** olarak ölçülen PN'ye ait CP değeri PS2 ile karşılaştırıldığında, gen anlatımının biyofilm durumunda arttığı tespit edilmiştir. Yine bu veriler boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında, bifA geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

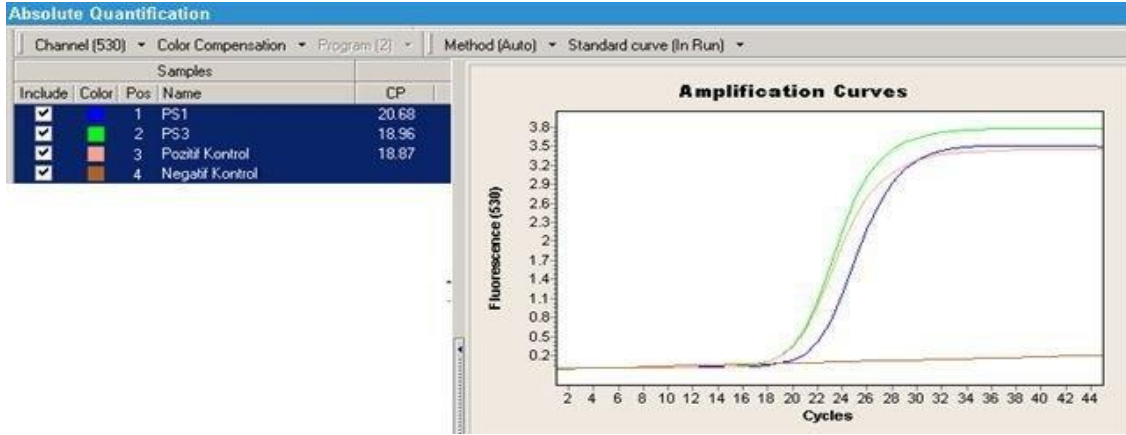
3.1.2.5.Farklı pH Değerlerine Yanıt Olarak bifA Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.6. Farklı pH değerleri karşısında bifA geni anlatım seviyesine ait bulgular

Şekil 3.6.'da verilmiş PH1 (16.25) ve PH2 (17.98) örneklerinde CP değerleri PS2 (18.87)'ye göre düşük seviyede ölçülmüştür. PH1 ve PH2 için ölçülen bu değerler gen anlatımının normalden daha yüksek olduğunu, PH3 (21.33) örneklerinde normalden yüksek bulunan CP değeri ise gen anlatımının azaldığını göstermiştir. PH1 ve PH2 arasında değerlendirme yapıldığında ise asidite yükseldikçe gen miktarının da artmakta olduğu görülmektedir. **Şekil 3.19.**'da verilmiş **26.753** olarak ölçülen PN'ye ait CP değeri PS2 ile karşılaştırıldığında biyofilm durumunda gen anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Yine bu veriler boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında bifA geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

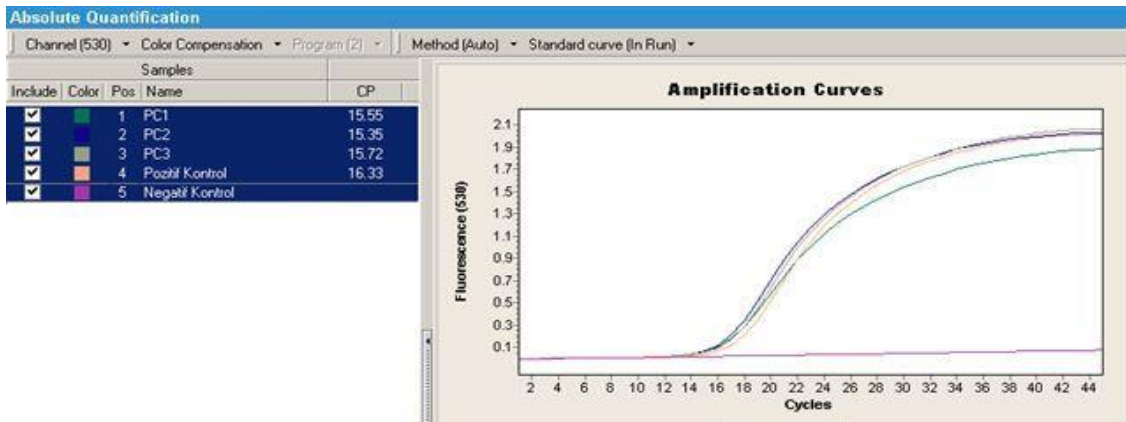
3.1.2.6.Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak bifA Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.7. Farklı sıcaklık değerleri karşısında bifA geni anlatım seviyesine ait bulgular

Şekil 3.7.'de verilmiş PS1 (20.68) örneğinde CP değeri PS2 (18.87)'den yüksek seviyede ölçülürken, PS3 (18.96) örneğinde ise CP değeri pozitif kontrol seviyesinde ölçülmüştür. PS1'de CP değerinin normalden yüksek oluşu, gen anlatımının azaldığını göstermiştir. PS3 gen anlatımında ise belirgin bir değişiklik olmamıştır. Şekil 3.19.'da verilmiş 26.753 olarak ölçülen PN'ye ait CP değeri PS2 ile karşılaştırıldığında biyofilm durumunda gen anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Yine bu veriler boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında, bifA geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

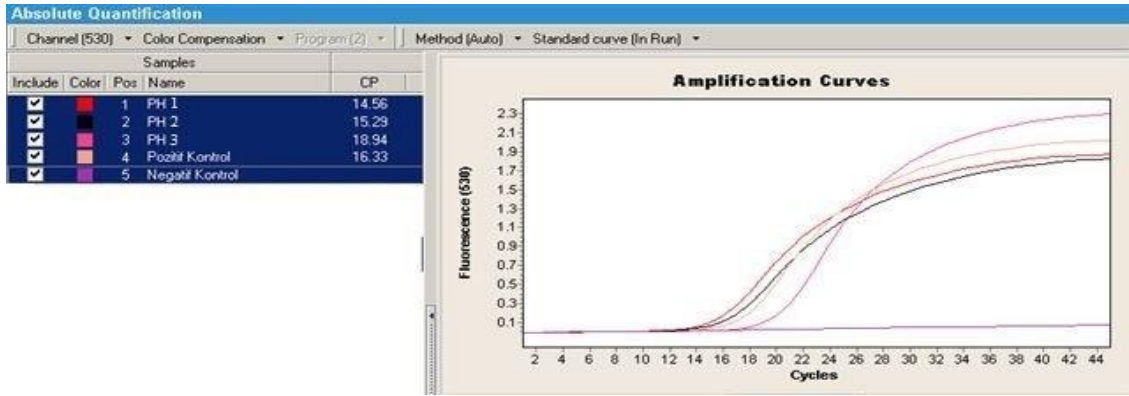
3.1.2.7.Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak migA Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.8. Farklı klor değerleri karşısında migA geni anlatım seviyesine ait bulgular

Literatürde biyofilm oluşumunda ve bakteri hücre duvarı sentezinde etkili olduğu belirtilen migA geninin, farklı dozlarda klor stresine tabi tutularak elde edilen anlatım seviyelerine ait bulgular **Şekil 3.8.**'de belirtilmiştir. PS2'ye ait migA geni anlatım seviyesinin CP değeri, **16.33** olarak ölçülmüştür. PC1 (15.55), PC2 (15.35) ve PC3 (15.72) örneklerine ait CP değerleri 16.33'den düşük seviyede ölçülmüştür. Bu bulgu, gen anlatımının normalden daha yüksek olduğunu göstermektedir. PN'ye ait migA geni anlatım seviyesinin CP değeri **Şekil 3.20.**'de verilmiştir. **24.181** olarak ölçülen PN'ye ait CP değeri PS2 ile karşılaştırıldığında biyofilm durumunda gen anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Yine bu veriler boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında, migA geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

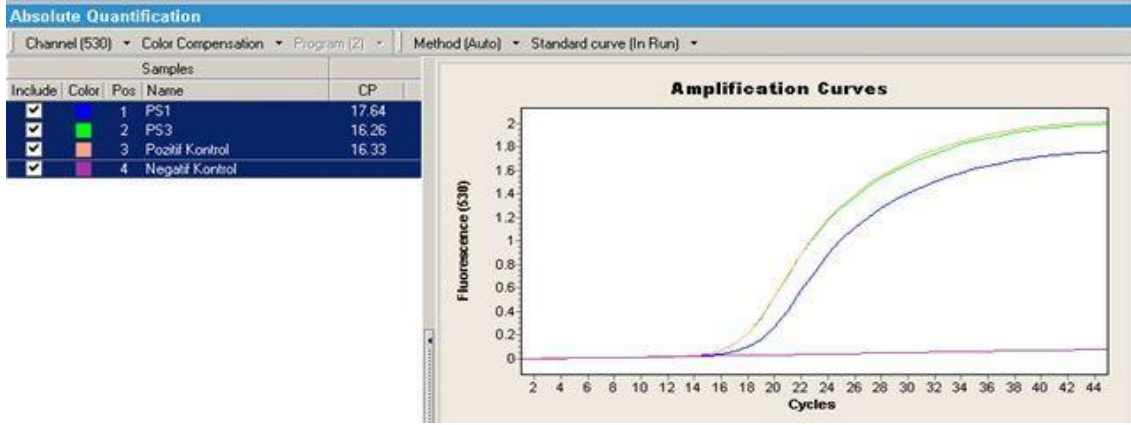
3.1.2.8.Farklı pH Değerlerine Yanıt Olarak migA Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.9. Farklı pH değerleri karşısında migA geni anlatım seviyesine ait bulgular

Şekil 3.9.'da verilmiş PH1 (14.56) ve PH2 (15.29) örneklerinde CP değerleri PS2 (16.33)'ye göre düşük seviyede ölçülmüştür. PH1 ve PH2 için ölçülen bu değerler gen anlatımının normalden daha yüksek olduğunu, PH3 (18.94) örneklerinde normalden yüksek bulunan CP değeri ise gen anlatımının azaldığını göstermiştir. PH1 ve PH2 arasında değerlendirme yapıldığında ise asidite yükseldikçe gen miktarının da artmakta olduğu görülmektedir. **Şekil 3.20.**'de verilmiş **24.181** olarak ölçülen PN'ye ait CP değeri PS2 ile karşılaştırıldığında biyofilm durumunda gen anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Yine bu veriler boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında, migA geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

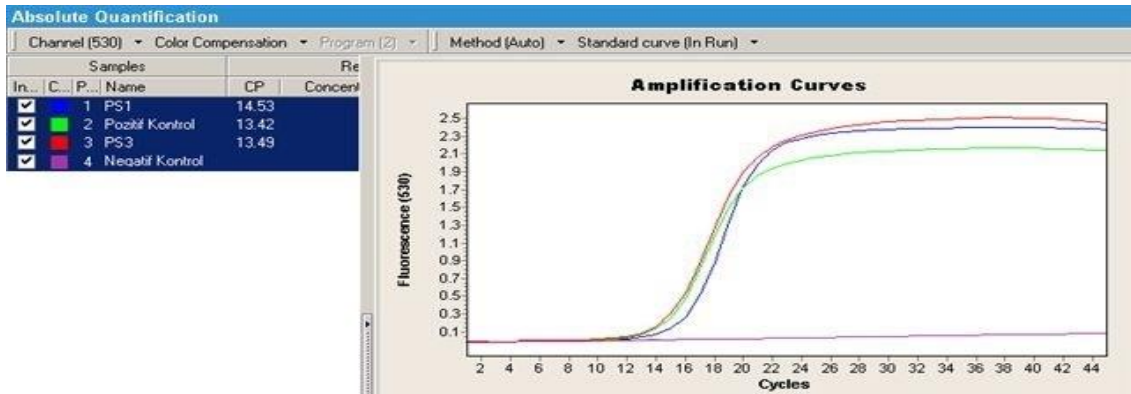
3.1.2.9. Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak migA Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.10. Farklı sıcaklık değerleri karşısında migA geni anlatım seviyesine ait bulgular

Şekil 3.10.'da verilmiş PS1 (17.64) örneğinde CP değeri PS2 (16.33)'den yüksek seviyede ölçülürken, PS3 (16.26) örneğinde ise CP değeri pozitif kontrol seviyesinde ölçülmüştür. PS1'de CP değerinin normalden yüksek oluşu, gen anlatımının azaldığını göstermiştir. PS3 gen anlatımında ise belirgin bir değişiklik olmamıştır. Şekil 3.20.'de verilmiş 24.181 olarak ölçülen PN'ye ait CP değeri PS2 ile karşılaştırıldığında biyofilm durumunda gen anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Yine bu veriler boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında, migA geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

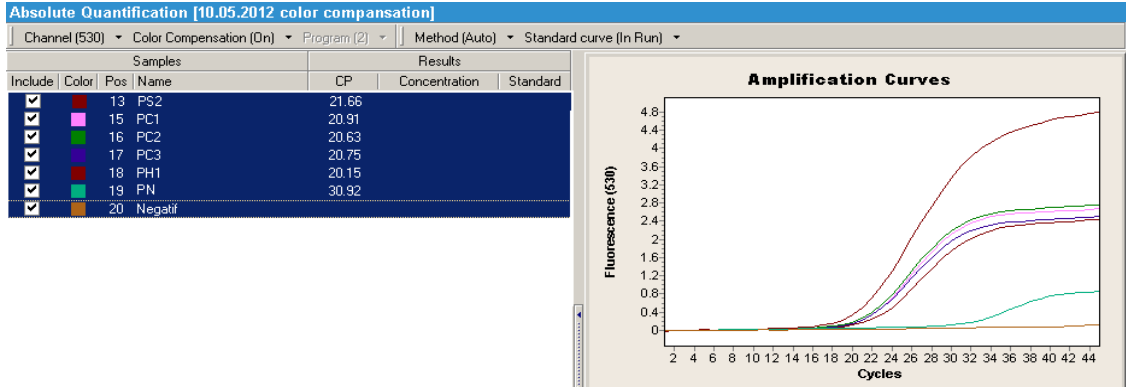
3.1.2.10. Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak dnaK Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.11. Farklı sıcaklık değerleri karşısında dnaK geni anlatım seviyesine ait bulgular

Literatürde sıcaklık stresinde etkili olduğu belirtilen dnaK geninin, farklı dozlarda sıcaklık stresine tabi tutularak elde edilen anlatım seviyesine ait bulgular **Şekil 3.11.**'de belirtilmiştir. PS2'ye ait dnaK geni anlatım seviyesinin CP değeri, **13,42** olarak ölçülmüştür. PS1 (14.53) örneğinde 13.42'den yüksek seviyede ölçülen CP değerinin kontrolden yüksek oluşu gen anlatımının azaldığını göstermektedir. PS3 (13.49) örneğinde ise CP değeri pozitif kontrol seviyesinde bulunmuş ve gen anlatımında belirgin bir değişiklik olmamıştır. **Şekil 3.21.**'de verilmiş PN'ye ait dnaK geni anlatım seviyesinin CP değeri **25.734** bulunmuştur. PS2 ile PN değerleri karşılaştırıldığında gen anlatımının arttığı tespit edilmiştir.

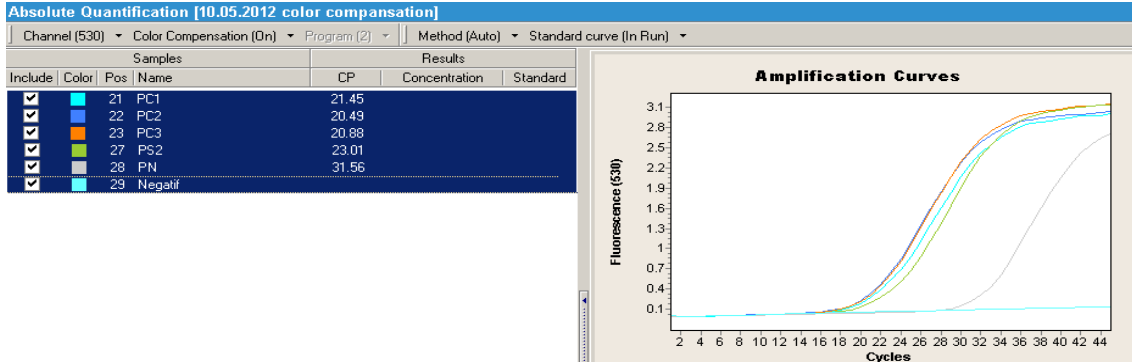
3.1.2.11. Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak katB Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.12. Farklı klor değerleri karşısında katB geni anlatım seviyesine ait bulgular

Literatürde oksidatif stres durumlarında etkili olduğu belirtilen katB geninin, farklı dozlarda klor stresine tabi tutularak elde edilen anlatım seviyesine ait bulgular **Şekil 3.12.**'de verilmiştir. PS2'ye ait katB geni anlatım seviyesinin CP değeri **21.66** olarak ölçülmüştür. PC1 (20.91), PC2 (20.63) ve PC3 (20.75) örneklerinde CP değeri PS2'den düşük seviyededir. Bu bulgu, stres koşullarında gen anlatımının kontrolden daha yüksek olduğunu, en yüksek anlatımın ise PC2 örneklerinde bulunduğunu göstermiştir. PN'ye ait katB geni anlatım seviyesinin CP değeri ise **30.92** bulunmuştur. Bu veri PC1, PC2, PC3 ve PS2'ye ait CP değerleri ile karşılaştırıldığında normal şartlar altında katB geninin anlatım yaptığını ve stres durumunda anlatım seviyesinin arttığını göstermiştir. Anlatım seviyesindeki artış klorun oksidatif stres yarattığını ortaya çıkarmıştır.

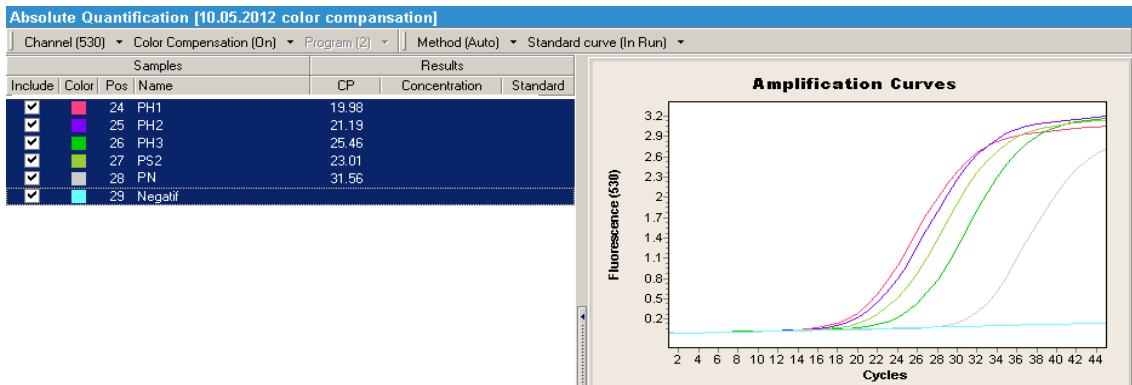
3.1.2.12. Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak soxR Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.13. Farklı klor değerleri karşısında soxR geni anlatım seviyesine ait bulgular

Literatürde oksidatif stres durumlarında etkili olduğu belirtilen soxR geninin, farklı dozlarda klor stresine tabi tutularak elde edilen anlatım seviyelerine ait bulgular Şekil 3.13.'te verilmiştir. PS2'ye ait soxR geni anlatım seviyesinin CP değeri **23.01** olarak ölçülmüştür. PC1 (21.45), PC2 (20.49) ve PC3 (20.88) örneklerinde CP değeri PS2'den düşük seviyededir. Bu bulgu, stres koşullarında gen anlatımının kontrolden daha yüksek olduğunu göstermiştir. En yüksek anlatım ise PC1 örneklerinde görülmüştür. PN'ye ait soxR geni anlatım seviyesinin CP değeri ise **31.56** bulunmuştur. Bu veri PC1, PC2, PC3 ve PS2'ye ait CP değerleri ile karşılaştırıldığında normal şartlar altında soxR geninin anlatım yaptığı ve stres durumunda anlatım seviyesinin arttığı görülmüştür. Anlatım seviyesindeki artış klorun oksidatif stres yarattığını ortaya çıkarmıştır.

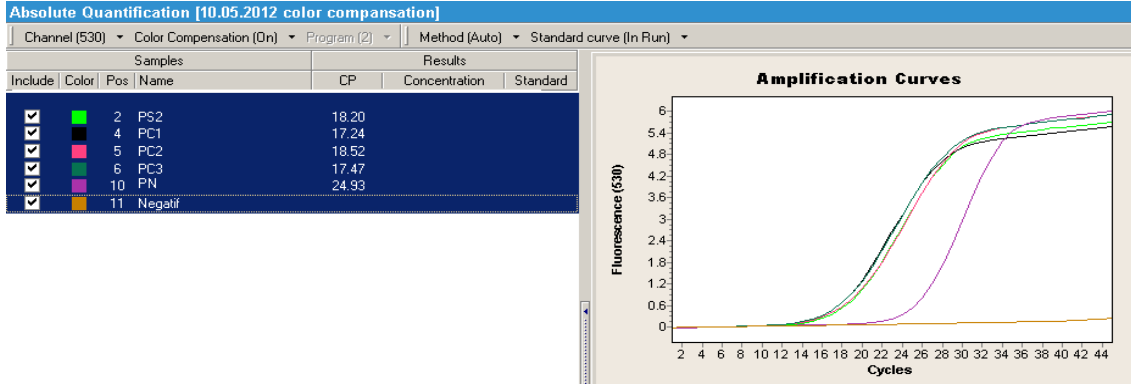
3.1.2.13. Farklı pH Değerlerine Yanıt Olarak soxR Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.14. Farklı pH değerleri karşısında soxR geni anlatım seviyesine ait bulgular

Şekil 3.14.'de verilmiş PH1 (19.98) ve PH2 (21.19) örneklerinde CP değeri PS2'nden düşük seviyededir. PS2 (23.01)'den düşük seviyede ölçülen bu değerler gen anlatımının arttığını göstermiştir. PH1 ve PH2 örnekleri kendi aralarında değerlendirildiğinde asitlik arttıkça gen anlatımının da arttığı sonucuna ulaşılmıştır. PH3 (25.46) örneklerinde ise kontrole göre düşük çıkan CP değeri anlatımın azaldığına işaret etmektedir. PS2' ye ait CP değerleri PN ile karşılaştırıldığında, normal şartlar altında soxR geni anlatım yapmıştır. PH1 ve PH2 örneklerinin anlatım seviyesindeki artış düşük pH'nın oksidatif stres yarattığını ortaya çıkarmıştır.

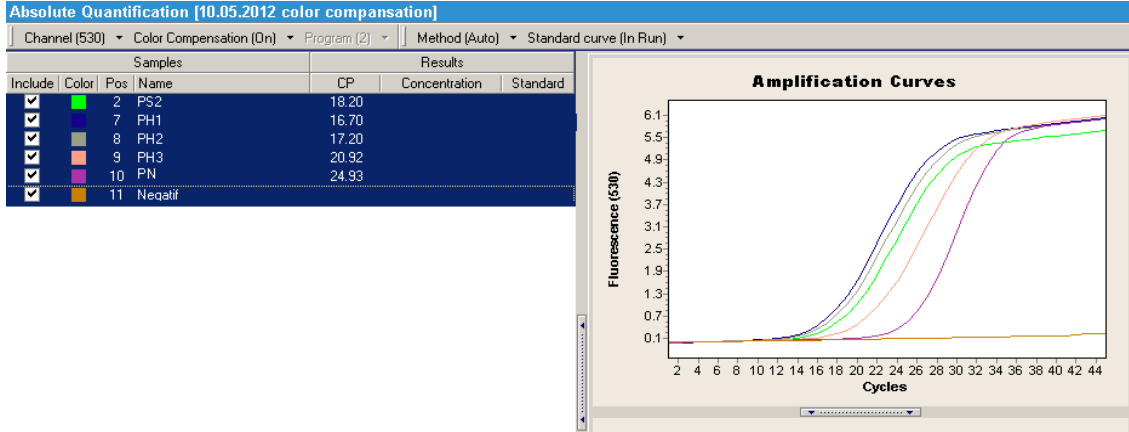
3.1.2.14. Farklı Klor Değerlerine Yanıt Olarak algC Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.15. Farklı klor değerleri karşısında algC geni anlatım seviyesine ait bulgular

Literatürde biyofilm oluşumunda ve alginat sentezinde etkili olduğu belirtilen algC geninin, farklı dozlarda klor stresine tabi tutularak elde edilen anlatım seviyesine ait bulgular **Şekil 3.15.**'da belirtilmiştir. Pozitif kontrole ait CP değeri **18.20** olarak ölçülmüştür. PC1 (17.24) ve PC3 (17.47) örneklerinde PS2'den düşük seviyede ölçülen CP değeri gen anlatımının daha yüksek olduğunu göstermektedir. PC2 (18.52) örneklerinde ise pozitif kontrol seviyesinde ölçülen değerler anlatımda bir değişiklik olmadığına işaret etmektedir. PC1 örneğinde ölçülen düşük CP değeri, 0.5 mg/l klor stresinin anlatımı daha fazla arttırdığını göstermiştir. CP değeri **24.93** olarak ölçülen PN değeri ise algC geninin normal şartlar altında da anlatım yaptığını göstermiştir. PS2 ile PN değerleri karşılaştırıldığında gen anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında ise algC geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

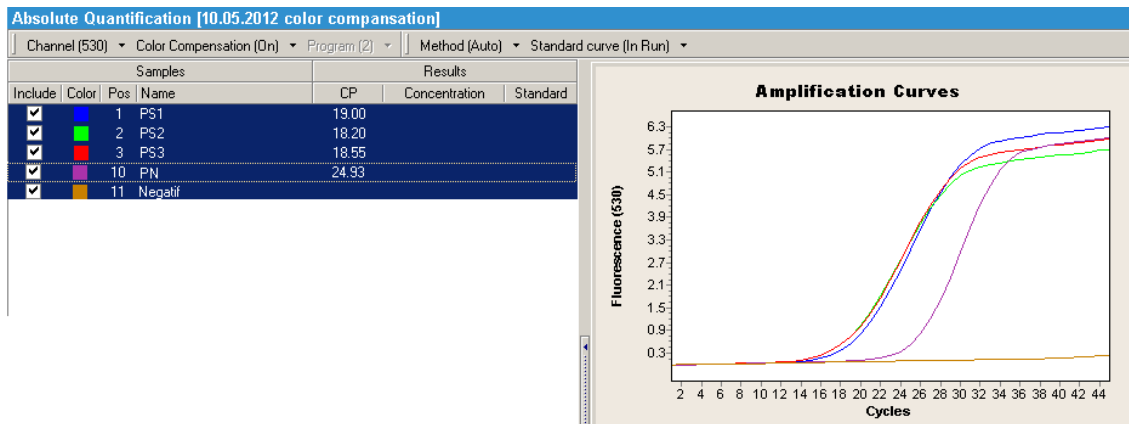
3.1.2.15. Farklı pH Değerlerine Yanıt Olarak algC Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.16. Farklı pH değerleri karşısında algC geni anlatım seviyesine ait bulgular

Şekil 3.16.'da verilmiş PH1 (16.70) ve PH2 (17.20) örneklerinde PS2 (18.20)'den düşük seviyede ölçülen CP değeri gen anlatımının daha yüksek olduğunu göstermiştir. PH3 (20.92) örneklerinde ise yüksek seviyede ölçülen CP değeri gen anlatımının azaldığına işaret etmektedir. PH1 örneğinde ölçülen daha düşük CP değeri, yüksek asit stresinin anlatımı daha fazla arttırdığını göstermiştir. PS2 ile PN değerleri karşılaştırıldığında gen anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında ise algC geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

3.1.2.16. Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak algC Gen Anlatım Seviyeleri



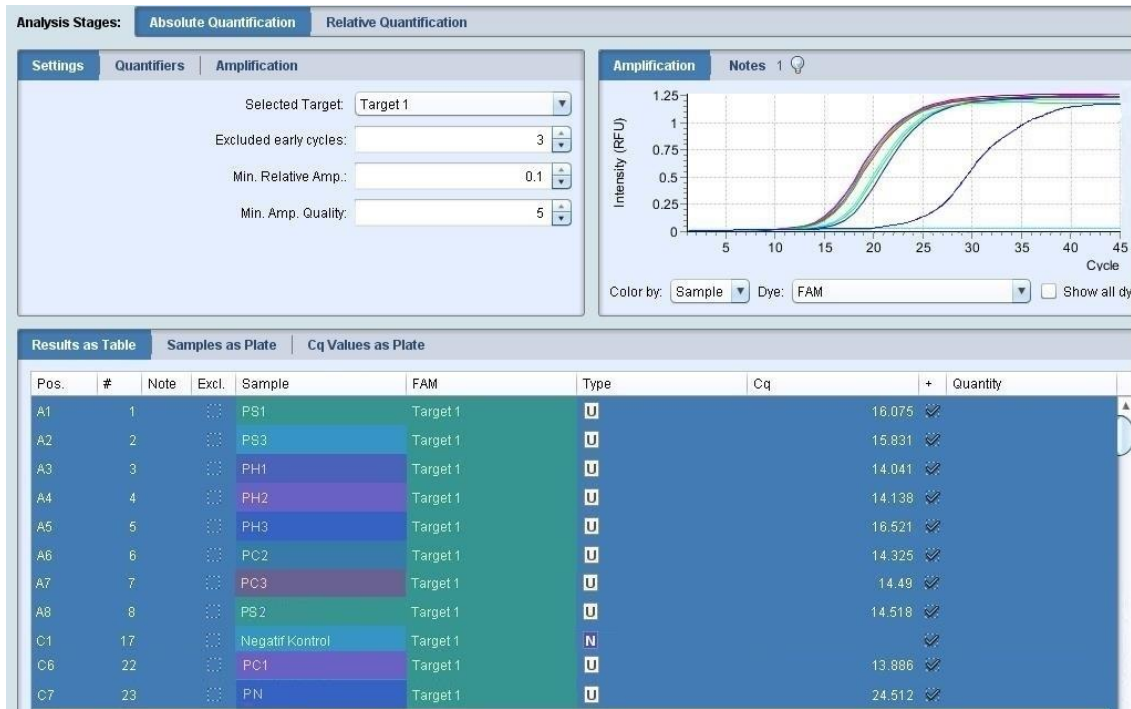
Şekil 3.17. Farklı sıcaklık değerleri karşısında algC geni anlatım seviyesine ait bulgular

Şekil 3.17.'de verilmiş PS1 (19.00) ve PS3 (18.55) örneklerinde PS2 (18.20)'den yüksek seviyede ölçülen CP değeri, gen anlatımının normalden daha düşük olduğunu, PS1 örneğinde PS3'e göre daha da düşük anlatımın olduğunu göstermiştir. PS2 ile PN değerleri karşılaştırıldığında gen anlatımının arttığı tespit edilmiştir.

3.1.3. LightCycler Nano Gerçek Zamanlı PZR Sistemi Bulguları

LightCycler 2.0 gerçek zamanlı PZR cihazı kullanılarak rpoS, bifA, migA ve dnaK genlerinin anlatımının stres durumundaki değişimi ölçülmüştür. LightCycler Nano gerçek zamanlı PZR cihazı bulguları ve kapiller sistemin kullanıldığı LightCycler 2.0 gerçek zamanlı PZR cihazı bulguları karşılaştırılarak, bulguların güvenilirliğini test edilmiştir. Yapılan karşılaştırma sonucunda bulguların birbirlerini destekledikleri görülmüştür. Aşağıda klor, pH ve sıcaklık stres koşullarının bu genlerin anlatımı üzerindeki etkilerinin kendi aralarındaki değerlendirmeleri belirtilmiştir.

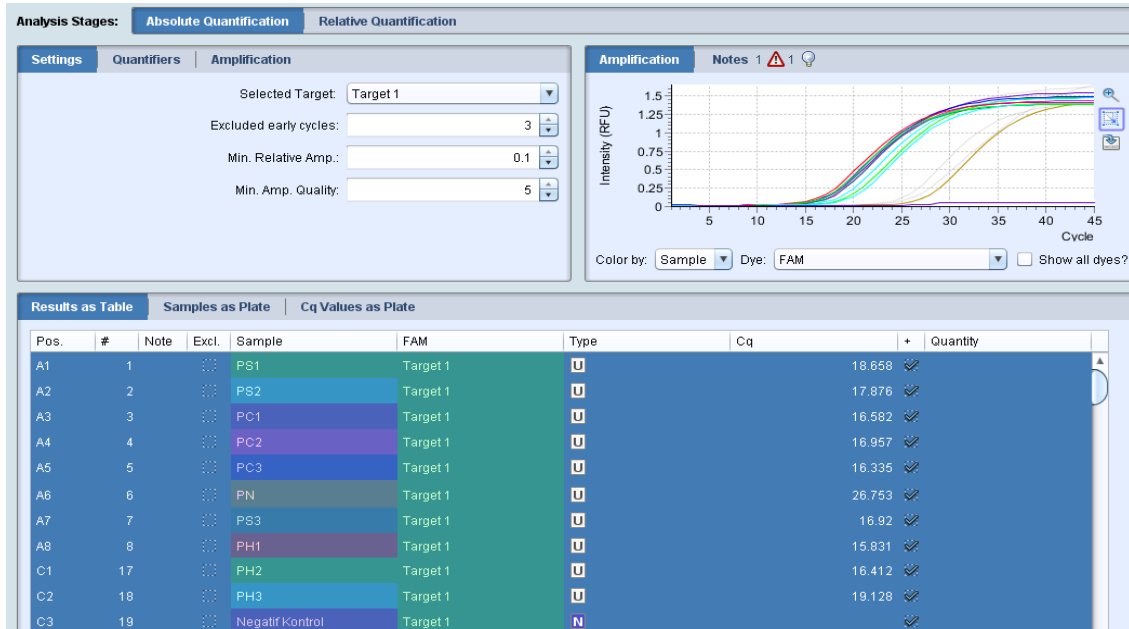
3.1.3.1. Farklı Klor, pH ve Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak rpoS Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.18. LightCycler Nano cihazıyla farklı klor, pH ve sıcaklık değerleri karşısında rpoS geni anlatım seviyesine ait bulgular

Literatürde genel stres cevabında ve biyofilm oluşumunda etkili olduğu belirtilen rpoS geninin klor, pH, sıcaklık stres koşullarındaki anlatım seviyelerine ait bulgular **Şekil 3.18.**'de verilmiştir. PS2'ye ait CP değeri **14.518** olarak ölçülmüştür. Klor stresi durumunda PC2 (14.325) ve PC3 (14.49) örneklerine ait CP değeri PS2 CP değeri ile karşılaştırıldığında, gen anlatımında anlamlı değişiklikler olmadığı görülmüştür. PC1 (13.886) örneğinde ise kontrolden düşük seviyede ölçülen CP değeri, 0.5 mg/l klora maruz bırakılan bakteride gen anlatımının arttığına işaret etmektedir. pH stresi durumunda PH1 (14.041) ve PH2 (14.138) örneklerinde düşük seviyede ölçülen CP değerleri gen anlatımının PS2'den daha yüksek olduğunu, PH3 (16.521) örneklerinde ise CP değerinin PS2'den yüksek oluşu, gen anlatımının azaldığını göstermiştir. PH1 örneğinde, değerin PH2'ye göre düşük seviyede ölçülmesi asidite arttıkça anlatımın da arttığını göstermiştir. Sıcaklık stresi durumunda ise PS2'den yüksek seviyede ölçülen PS1 (16.075) ve PS3 (15.831) örneklerinde, gen anlatımının azaldığı görülmüştür. Ayrıca PN'ye ait CP değeri **24.512** olarak ölçülmüştür. PS2 ile PN değerleri karşılaştırıldığında biyofilm durumunda gen anlatımının arttığı tespit edilmiştir.

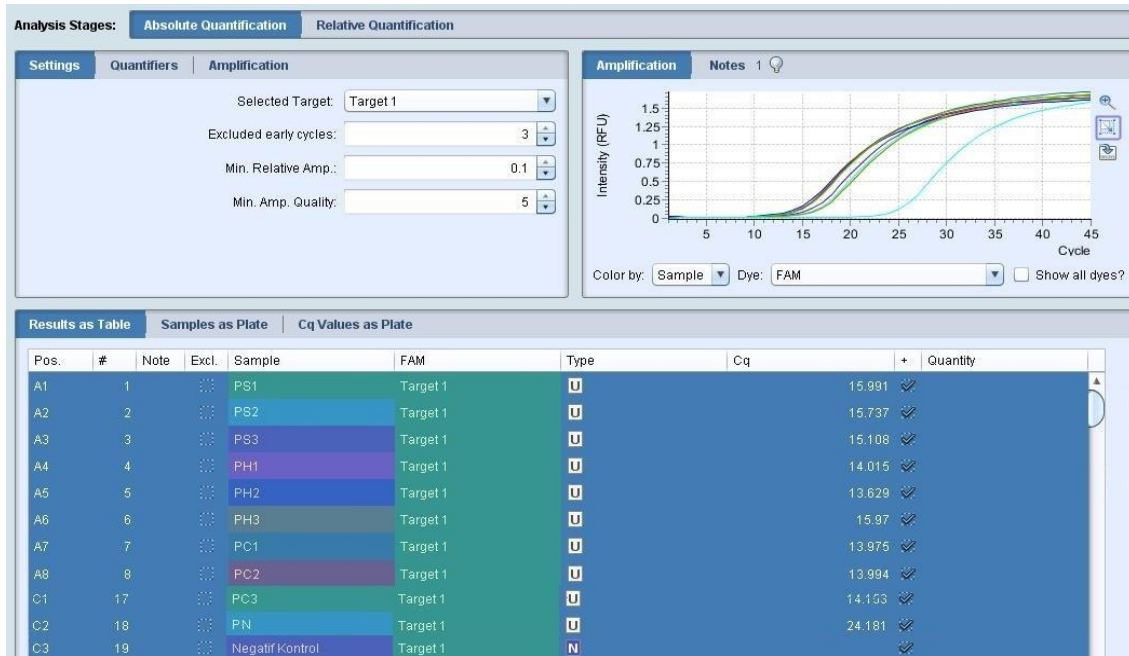
3.1.3.2. Farklı Klor, pH ve Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak bifA Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.19. LightCycler Nano cihazıyla farklı klor, pH ve sıcaklık değerleri karşısında bifA geni anlatım seviyesine ait bulgular

Literatürde membran sentezinde ve biyofilm oluşumunda etkili olduğu belirtilen bifA geninin klor, pH, sıcaklık stres koşullarındaki anlatım seviyelerine ait bulgular **Şekil 3.19.**'da verilmiştir. PS2'ye ait CP değeri **17.876** olarak ölçülmüştür. Klor stresi durumunda PC1 (16.582), PC2 (16.957) ve PC3 (16.335) örneklerine ait CP değeri, PS2'ye ait CP değeri ile karşılaştırıldığında gen anlatımında artış olduğu görülmüştür. pH stresi durumunda PH1 (15.831) ve PH2 (16.412) örneklerinde düşük seviyede ölçülen CP değerleri, gen anlatımının PS2'den daha yüksek olduğunu, PH3 (19.128) örneklerinde ise CP değerinin PS2'den yüksek oluşu gen anlatımının azaldığını göstermiştir. PH1 örneğinde değerin PH2'ye göre düşük seviyede ölçülmesi asidite arttıkça anlatımın da arttığını göstermiştir. Sıcaklık stresi durumunda ise PS2'den yüksek ölçülen PS1 (18.658) örneklerinde gen anlatımının azaldığını, PS3 (16.92) örneğinde PS2'den düşük ölçülen CP değeri ise gen anlatımının arttığını göstermiştir. Ayrıca PN'ye ait CP değeri **26.753** olarak ölçülmüştür. PS2 ile PN değerleri karşılaştırıldığında, gen anlatımının biyofilm durumunda arttığı tespit edilmiştir.

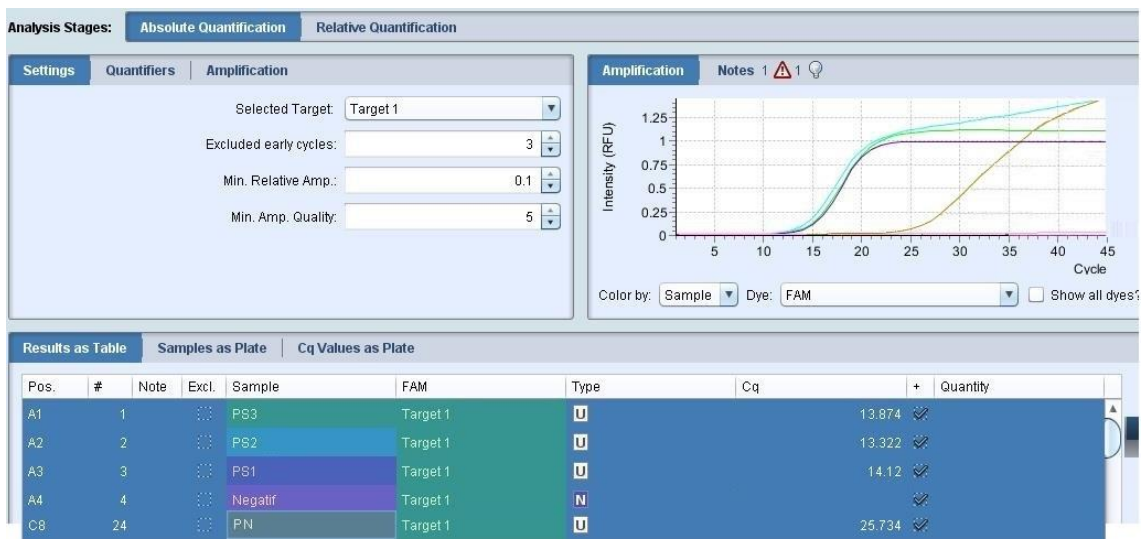
3.1.3.3. Farklı Klor, pH ve Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak migA Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.20. LightCycler Nano cihazıyla farklı klor, pH ve sıcaklık değerleri karşısında migA geni anlatım seviyesine ait bulgular

Literatürde hücre duvarı yapımında ve biyofilm oluşumunda etkili olduğu belirtilen *migA* geninin, klor, pH, sıcaklık stres koşullarındaki anlatım seviyelerine ait bulgular **Şekil 3.20.**'de verilmiştir. PS2'ye ait CP değeri **15.737** olarak ölçülmüştür. Klor stresi durumunda PC1 (13.975), PC2 (13.994) ve PC3 (14.153) örneklerine ait CP değeri PS2'ye ait CP değeri ile karşılaştırıldığında, gen anlatımında artış olduğu görülmüştür. Sırasıyla PC1 ve PC2 örneklerinde CP değerinin daha düşük oluşu düşük seviyede klorun (0.5 mg/l) gen anlatımını daha çok arttırdığını göstermiştir. pH stresi durumunda PH1 (14.015) ve PH2 (13.629) örneklerinde düşük seviyede ölçülen CP değerleri, gen anlatımının PS2'den daha yüksek olduğunu, PH3 (15.97) örneklerinde ise CP değerinin PS2'den yüksek oluşu gen anlatımının azaldığını göstermiştir. PH1 örneğinde değerin PH2'ye göre düşük seviyede ölçülmesi, asidite arttıkça anlatımın da arttığını göstermiştir. Sıcaklık stresi durumunda ise PS2'den yüksek ölçülen PS1 (15.991) örneklerinde gen anlatımının azaldığı, PS3 (15.108) örneğinde PS2 ile benzer seviyede bulunduğu ve gen anlatımında değişiklik olmadığı görülmüştür. Ayrıca PN'ye ait CP değeri, **24.181** olarak ölçülmüştür. PS2 ile PN değerleri karşılaştırıldığında, gen anlatımının biyofilm durumunda arttığı tespit edilmiştir. Yine bu veriler boyama bulgularıyla karşılaştırıldığında, *migA* geninin anlatımındaki artışın biyofilm oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür.

3.1.3.4. Farklı Sıcaklık Değerlerine Yanıt Olarak *dnaK* Gen Anlatım Seviyeleri



Şekil 3.21. LightCycler Nano cihazıyla farklı sıcaklık değerleri karşısında *dnaK* geni

anlatım seviyesine ait bulgular

Literatürde sıcaklık stresinde etkili olduğu belirtilen dnaK geninin, farklı dozlarda sıcaklık stresi koşullarındaki anlatım seviyelerine ait bulgular **Şekil 3.21.**'de belirtilmiştir. PS2'ye ait dnaK geni anlatım seviyesinin CP değeri **13.322** olarak ölçülmüştür. PS1 (14.12) örneğinde 13.322'den yüksek seviyede ölçülen CP değerinin kontrolden yüksek oluşu, gen anlatımının azaldığını göstermektedir. PS3 (13.874) örneğinde ise CP değeri pozitif kontrol seviyesinde bulunmuş ve gen anlatımında belirgin bir değişiklik olmamıştır. PN'ye ait dnaK geni anlatım seviyesinin CP değeri ise **25.734** bulunmuştur. PS2 ile PN değerleri karşılaştırıldığında, gen anlatımının biyofilm durumunda arttığı tespit edilmiştir.

3.1.4. Seçilen Genlerin CP Değerleri ve PZR Karşılaştırmaları İçin İstatistiksel Analiz Bulguları

Genlerin klor, pH ve sıcaklık streslerine ait CP değerlerinin istatistiksel analizleri kendi aralarında yapılmıştır. Korelasyon katsayısı mümkün uçsal değerler olan -1 veya +1 olduğunda, iki değişken arasında çok iyi bir doğrusal bağlantı bulunduğu kabul edilmektedir. **Tablo 3.3., Tablo 3.4. ve Tablo 3.5.** 'te verilen seçilen genlerin CP değerlerinin +1'e olan yakınlığı aralarında doğrusal bağlantı olduğunu göstermiştir. Kapiller sistem ve LightCycler Nano gerçek zamanlı PZR sistemi kullanılan PZR cihazlarıyla tekrarlanan dört genin (rpoS, bifA, migA, dnaK) bulgularının karşılaştırılması student t testi ile yapılmış ve analiz sonuçları $p < 0.05$ ' den büyük bulunmuştur.

Tablo3.3. Klor stresi gen anlatım düzeylerinin Pearson korelasyon katsayısı değerleri

<i>Pearson korelasyon katsayısı (r)</i>						
	rpoS	bifA	migA	katB	soxR	algC
bifA	0,997	-	-	-	-	-
migA	0,998	0,999	-	-	-	-
katB	0,996	0,999	1,000	-	-	-
soxR	0,991	0,996	0,992	0,993	-	-
algC	0,985	0,985	0,983	0,985	0,967	-

Tablo3.4. pH stresi gen anlatım düzeylerinin Pearson korelasyon katsayısı değerleri

<i>Pearson correlation katsayısı (r)</i>					
	rpoS	bifA	migA	soxR	algC
bifA	0,986	-	-	-	-
migA	0,993	0,996	-	-	-
soxR	0,990	0,998	0,997	-	-
algC	0,984	0,993	0,998	0,995	-

Tablo3.5. Sıcaklık stresi gen anlatım düzeylerinin Pearson korelasyon katsayısı değerleri

<i>Pearson korelasyon katsayısı (r)</i>					
	rpoS	bifA	migA	dnaK	algC
bifA	0,992	-	-	-	-
migA	0,998	0,998	-	-	-
dnaK	0,999	0,986	0,994	-	-
algC	0,998	0,991	0,996	0,999	-

3.2.Tartışma

P. aeruginosa'nın yaşadığı ortamlarda maruz kaldığı çeşitli stres durumlarının, QS sistemi tarafından gen ekspresyonu ile kontrol edilen biyofilm oluşumunu, moleküler düzeyde nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda; klor, pH ve sıcaklık streslerine maruz bırakılan *P. aeruginosa* PAO1 suşunun, stres durumunda oluşturduğu yanıtlar incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, biyofilm oluşumuna katılan ve stres yanıtı oluşturan rpoS geninin, membran sentezi ve EPS üretimine katılan bifA geninin, biyofilm oluşumu ve hücre duvarı yapımında görev alan migA geninin, ısı şoku proteini olan dnaK geninin, oksidatif stres cevabına katılan katB ve soxR genlerinin ve alginat sentez operonunda bulunan algC geninin anlatım seviyelerindeki değişimler gerçek zamanlı PZR tekniği ile ölçülerek, stres durumunda ve stressiz koşullarda gen anlatımının nasıl değiştiği tespit edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen bulgular, stres durumunda gen anlatımında değişiklikler meydana geldiğini ortaya koymuştur.

Walker ve ark.'nın [96] 2014 yılında, yeni doğan bebeklerin, *P. aeruginosa* kökenli bakteriyemiden hayatını kaybetmesinin, yeni doğan ünitesi musluklarıyla bağlantısını incelemişlerdir. Su kaynaklı izolatlarının hasta izolatları ile uyumlu olup olmadığını değerlendirdikleri çalışmalarında, musluk filtrelerinden ve ölen bebeklerden izole edilen *P. aeruginosa* biyofilminin aynı kökenden geldiğini belirlemişlerdir.

Amagliani ve ark. [97] tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada ise *P. aeruginosa*'nın rekreasyonel sularda, sıklıkla biyofilm formunda bulunan ve bu sebeple dezenfeksiyon işlemlerine karşı daha dirençli bir fırsatçı patojen olduğu belirtilmiştir. *P. aeruginosa*'nın bu patojenitesi ve biyofilm oluşturma yatkınlığı göz önünde bulundurulduğunda, hem Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından hem de ülkemizde oluşturulan yönetmeliklerde suların dezenfeksiyonunun önemi gözler önüne serilmektedir.

Dünya üzerinde su dezenfeksiyonu için en sık kullanılan yöntem klorlama işlemidir. Ancak, gerek su sistemlerinde, gerekse vücut içinde biyofilm yaptığı bilinen fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*'nın, karşılaştığı klor stresi durumuna ve bu stres durumunun hangi şiddetine biyofilm yanıtı oluşturduğuna dair, sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışma ile su dezenfeksiyonunda sıklıkla kullanılan klor dozlarının, biyofilm ve stres yanıtı oluşumuna katılan genlerin anlatımındaki etkisi incelenmiştir. Tüm bulgular değerlendirildiğinde, klor stresi uygulanan bakteri kültürlerinde, test edilen tüm genler için kontrole göre daha yüksek anlatım olduğu görülmüştür. Boyama bulguları değerlendirildiğinde ise 0.5 mg/l ve 0.7 mg/l klor stresi uygulanmış bakteri kültürlerinde 1 mg/l klor stresi uygulanmış kültüre göre daha fazla biyofilm oluşmuştur. Ancak pozitif kontrol boyama bulgularında, bütün stres koşullarından daha yüksek biyofilm ölçülmüştür. Klor stres koşullarında kullanılacak dozlar belirlenirken, hem boyama optimizasyon bulguları hem de su dezenfeksiyon yönetmeliğinde belirtilen klor konsantrasyon aralığı (0.5 – 1 mg/l) göz önünde bulundurulmuştur [98]. Bu aralık, sudaki bakterilerin ortadan kaldırılması için gerekli miktarları ifade etmektedir. Test edilen kültürlerde de kullandığımız klor miktarlarının kültür içindeki bir kısım bakterinin ölümüne sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle klor stresi ile ilgili boyama bulgularındaki farklılığın, klorun öldürücü etkisinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Klor miktarı arttıkça ölüm oranı artmış ve dolayısıyla biyofilm oluşturacak bakteri sayısı da azalmıştır. 0.5 mg/l konsantrasyonda, bakteri ölümünün daha düşük olması muhtemeldir. Çalışmamızda hayatta kalan bakterilerin bu stres durumunda QS bağlantılı biyofilm oluşturma genlerinin ve stres yanıtı oluşturan genlerin anlatımında artış görülmüştür. 0.5 mg/l'deki gen anlatımının, 1 mg/l'ye oranla biraz daha yüksek olmasının, bu kültürde bakteri ölümünün daha az olmasından kaynaklandığını düşündürmüştür. Bu fikirden yola

ıkararak, eklenen klor dozlarının öldürücü etkisi, kültürlere uygulanan canlılık testleriyle kontrol edilmiş ve sonuç olarak bir kısım bakterinin başlangıç anında öldüğü görülmüştür.

Klor iyonu su ile temasa geçtiğinde hipoklorit (OCl^-) formuna dönüşmekte ve bu durum, hücre içinde çok kuvvetli bir oksidasyona sebep olmaktadır [99]. Wei ve ark. [100] 2012 yılında yapmış oldukları çalışmada, oksidatif streste etkili *katB* genini de kapsayan *OxyR* ailesinin H_2O_2 varlığında anlatımı arttığını ve hatta bu genlerin anlatımının artışının QS mekanizmasını da aktifleştirdiğini belirtmiştir. Çalışmamızda klor stresinin de *katB* geninin anlatımında etkili olduğu görülmüştür. Benzer olarak Romsang ve ark. [101] 2013 yılında, sodyum hipoklorit (NaOCl) ve H_2O_2 streslerine maruz bıraktıkları *P. aeruginosa* PAO1 suşuna ait *mrsA* ve *mrsB* genlerinin oksidatif stres koruması ve bakteriyel virlans için gerekli olduklarını ifade etmişlerdir. Tarafımızdan test edilen *rpoS*, *bifA*, *migA*, *katB*, *soxR* ve *algC* genlerinin tamamının *P. aeruginosa* PAO1 suşunda klor stresi karşında etkili olduğu görülmüştür. Ancak genlerin etkilendiğ dozlar birbirinden farklı ölçülmüştür. *rpoS* ve *algC* geni en fazla 0.5 mg/l klor stresinde, *soxR* geni en fazla 0.7 mg/l klor stresinde, *bifA*, *migA* ve *katB* genleri ise her üç streste yakın değerlerde anlatım yapmıştır. Kim ve ark.'nın [102] 2009 yılında, *Escherichia coli* (*E. coli*) zerine uyguladığı 5 mg/l klorun aktif ve pasif biyofilm üzerinde yarattığı oksidatif stresi inceledikleri çalışmalarında, oksidatif stres geni olan *soxS* geninin pasif biyofilm üzerinde anlatımının arttığı sonucuna varmışlardır. *P. aeruginosa*'da klorun oksidatif stres üzerine etkisini 0.5 mg/l, 0.7 mg/l ve 1 mg/l klor stresi uygulayarak test ettiğimize çalışmamızda ise benzer olarak oksidatif stresle ilgili *soxR* geninin anlatımının arttığı görülmüştür. Bu artışın en fazla 0.7 mg/l klor konsantrasyonuna maruz bırakılmış kültürde olduğu gözlenmiştir.

Mikroorganizmaların çoğalmaları için, ortam pH 'sının optimal sınırlar içinde bulunması gerekmektedir. Minimum ve maksimum pH limitlerine yaklaştığa, çoğalmanın azaldığı veya durduğu literatürde belirtilmektedir [103]. Ortamdaki H^+ ve OH^- konsantrasyonu optimum değerden uzaklaştığa proteinlerin üç boyutlu yapısında değişiklikler olduğu ya da proteinin denatüre olduğu ifade edilmektedir [104]. Van der Waal ve ark.'nın [105] 2011 yılında, yüksek pH'ın (12.1) *P. aeruginosa* ve *Enterococcus faecalis* bakterilerinin, biyofilm oluşumu üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, yüksek pH'nın bakteri sayısının azalmasında çok etkisi olmasa da

biyofilm oluşumunda etkili olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Çalışmamızda, pH 4 ve pH 6 asit stresi durumunda da kontrole göre tüm genlerin anlatımında artış görülmüştür. Bu bulgu, asit stresi durumunda bakteride bulunan biyofilm oluşturma ve stres yanıt genlerinin çalışmasını tetiklediğini ve anlatımın arttığını ortaya çıkarmıştır. Ortamın asit seviyesinin Cl^- iyonunun etkinliğini arttırdığı literatürde belirtilmektedir [106]. Çalışmamızda asit stresi yaratmak için kullanılmış HCl, yapısında klor bulundurmaktadır. HCl'nin bakteriye uygulanmasıyla, ortamda bulunan H^+ miktarı artmış ve bu artışa bağlı olarak Cl^- iyonunun etkinliğini arttırmış olabilir. Artan Cl^- konsantrasyonunun da bakteriyi strese sokarak bakterinin gen anlatımını etkilemiş olması elde ettiğimiz sonucu açıklayabilmektedir.

pH 10 alkali stresi durumunda, tüm genler için anlatımın kontrole göre azaldığı görülmüştür. Biyofilm boyama bulguları, genlerin anlatım seviyeleri ile karşılaştırıldığında, bulguların birbirini desteklediği anlaşılmıştır. Alkali stresi yaratmak için kullanılan KOH'un hızlı bir şekilde oksitlenen çok kuvvetli bir baz olduğu ve bakteride oksidatif stres yaratarak sayısının azalmasına sebep olabileceği literatürde belirtilmektedir [107]. Bu nedenle pH10 stresinde bakteri azalması nedeniyle gen anlatımının düşmesi mümkündür. Stancik ve ark.'nın [108] 2002 yılında gerçekleştirdiği, *E. coli*'nin gen anlatımı üzerine pH'ın etkisini araştırdıkları çalışmalarında, alkali olarak sodyum hidroksit (NaOH) kullanımı durumunda bakterinin ölümüne sebep olduğu, bunun yerine KOH tercih edilmesinin daha iyi olacağı ifade edilmektedir. Çalışmamızda da bu nedenle KOH tercih edilmiştir. Ancak, Van der Waal ve ark. [105] tarafından 2011 yılında, alkali pH yaratmak için kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) kullanıldığı durumlarda Ca^{+2} 'nin biyofilm oluşumunu artırdığı görülmüştür. Tüm bu bulgular, ortamı bazik yapmak için kullanılan kimyasalın, yapısında bulunan iyonun biyofilm oluşumunda etkili olduğunu göstermektedir. Bu sebeple, gerçekleştirdiğimiz çalışmada gen anlatımının ve biyofilm oluşumunun azalmasının K^+ iyonundan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

P. aeruginosa'nın en iyi çoğaldığı sıcaklık 37°C olmasına karşın, $20-42^\circ\text{C}$ aralığında da çoğalabildiği literatürde belirtilmektedir [56]. Solunum yollarında pnömoni, kistik fibrozis, idrar yollarında sepsis, temizlenmemiş küvet ve jakuziler gibi sulu ortamlarda dermatit, yanık durumlarında ve açık yaralarda birçok akut enfeksiyona sebep olan *P. aeruginosa*'nın, çoğunlukla insan vücudunda ve vücut sıcaklığında

yaşayabilmesine rağmen değişen sıcaklık aralıklarında da hastalık ve biyofilm yapabildiği bilinmektedir [28, 29, 44-48]. Bu sebeple *P. aeruginosa*'nın sıcaklık değişimine karşı moleküler düzeyde nasıl bir yanıt oluşturduğu incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucunda, düşük sıcaklık (25°C) değerinde tüm genlerin anlatımının azaldığı, yüksek sıcaklıkta ise (40°C) pozitif kontrol seviyesine benzer seviyede anlatım yaptıkları görülmüştür. Boyama bulgularında, 40°C sıcaklık stresi uygulanmış bakteri kültürlerinde, 25°C sıcaklık stresi uygulanmış kültüre göre daha fazla biyofilm oluşması ve en yüksek biyofilmin ise 37°C'de ölçülmesi gen anlatım bulgularımızı desteklemektedir. Yine literatürde maksimum sıcaklık sınırında yalnız çoğalmada durma meydana gelmediği, aynı zamanda sıcaklığın yüksekliğine bağlı olarak bakteride az veya çok miktarda ölümlerin başladığı, buna karşın minimum sıcaklık sınırında ise sadece çoğalmada duraklamaların olduğu ve enzimsel faaliyetlerinin yavaşladığı ifade edilmektedir [103, 104]. Çalışmamızda kullanılan 25°C sıcaklık stresinin, bakterinin hayatsal faaliyetlerini yavaşlatmış olmasından dolayı gen anlatımında kontrole göre azalma görülmesi mümkündür. Yine çalışmamızda kullanılan 40°C sıcaklık stresinin ise bir miktar bakteriyi öldürmüş olabileceği düşünülmektedir. Ancak hayatta kalan bakterilerin biyofilm yapımına devam etmesinin kontrol seviyesinde gen anlatımı ve biyofilm oluşumunu açıkladığı düşünülmektedir. Bu fikirden yola çıkarak, eklenen yüksek ve düşük sıcaklığın öldürücü etkisi, kültürlerle uygulanan canlılık testleriyle kontrol edilmiş ve sonuç olarak yüksek sıcaklıkta bir kısım bakterinin başlangıç anında öldüğü görülmüştür.

Ortam sıcaklığı optimum değerden yukarı doğru çıktıkça bakterilerin enzim aktivitelerinin yavaşladığı ve proteinlerinin denatüre olduğu, ancak bu denatürasyonun sıcaklığın yüksekliğine göre kısmen veya tamamen geri dönüşebilir olduğu ifade edilmektedir [104]. Maksimum 42°C 'ye kadar çoğalabildiği belirtilen *P. aeruginosa*'ya, 40°C sıcaklık stresi uyguladığımız çalışmamızda, uyguladığımız stres, bakteriye ait enzimleri başlangıçta denatüre etmiş olabilir. Ancak, 40°C sıcaklık *P. aeruginosa*'nın yaşayabileceği maksimum değerden düşük olduğu için denatürasyon işleminin tamamen gerçekleşmediği ve bu yüzden bakterinin biyofilm oluşumunda etkili genlerinin, anlatım yapmaya devam ettiği düşünülmektedir.

İnsan vücudunda hastalık yapan *P. aeruginosa*'nın, hastalık durumunda vücut içerisinde yaşayabileceği maksimum sıcaklık 40°C'dir. Stres için belirlenen sıcaklık

seviyeleri de insan vücudu sıcaklığı aralıkları göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Isı şoku proteinlerinin, bakterilerin yüksek ısıya (42-46°C) maruz kalmasıyla üretimi artan bir grup protein olduğu ifade edilmektedir [109]. Çalışmamızda, yükselen sıcaklığın stres cevabı üzerine etkisini incelemek üzere seçilen genlerden olan dnaK, Hsp70 ısı şoku protein ailesinin bir üyesidir [110]. 40°C'lik test örneğinde, dnaK geninin kontrole göre aşırı artış göstermemesinin, test edilen sıcaklığın ısı şoku protein ailesinin etkinliğinin görüldüğü sıcaklık aralığından düşük derece oluşundan kaynaklanmış olabileceğini düşündürmüştür.

Biyofilm oluşumuna katıldığı ve stres yanıtı oluşturduğu literatürde belirtilen, etkinliği tarafımızca test edilen genlerin, oluşturulan stres koşullarına farklı yanıtlar verdikleri görülmüştür. Yang ve ark.'nın [111] 2000 yılında gerçekleştirdiği çalışmada, migA geninin *P. aeruginosa*'nın meydana getirdiği kistik fibrozis olgularında, glikoziltransferaz enzimini kodlayarak mukus meydana getirdiği, bu genin baskılandığı durumda ise QS sisteminin de etkinliğini kaybettiği ifade edilmektedir. QS sistemi ile bağlantısı belirlenen ve bundan dolayı çalışmamızda, stres karşısındaki etkinliği test edilen migA geninin, sıcaklık, klor ve pH stresleri karşısında anlatım seviyesinde farklılıklar meydana geldiği tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan kültürlerde, biyofilm oluşturmamış kültüre göre gen anlatımının yüksek oluşu, migA geninin biyofilm oluşumu durumunda etkili olabileceğini çalışmamız bulgularıyla da desteklemiştir.

Alternatif sigma faktörü rpoS'nin ise ilk olarak *E. coli*'de durağan fazda besin azlığında aktiflenen, ancak günümüzde sıcaklık, ozmotik ve oksidatif stresin de dahil olduğu pek çok stres durumunda temel düzenleyici stres yanıtı oluşturduğu bildirilmektedir [112]. Landini [113] 2009 yılında, çalışmamıza benzer bir tezi savunarak, birçok stresin biyofilm oluşumu ile alakası olduğunu ve biyofilm oluşumunun bir stres cevabı olarak ortaya çıktığını belirtmiştir. Elde ettiğimiz bulgular da bu tezin geçerliliğini desteklemektedir. Biyofilm ve stres yanıtı oluşumunda etkili genlerin anlatımının, stres durumunda arttığı gözlenmiştir. Bu durum benzer bir çalışmada da ortaya çıkarılmıştır. Ito ve ark. [114] 2008 yılında, rpoS geni üzerinde, geni inaktive edici bir mutasyon durumunda, biyofilm oluşumunun *E. coli*'de engellediğini görmüş ve bu sebeple de biyofilm oluşumunun bir stres cevabı olarak ortaya çıktığını belirtmiştir. *P. aeruginosa*'da rpoS'nin fizyolojik rolü tam olarak bilinmemekle beraber, stres üzerine etkisi olduğu belirtilmektedir [8, 112]. Mukarami

ve ark. [115] 2005 yılında yaptıkları çalışmalarında, mekanizması tam olarak bilinmese bile ısı şokunun, *P. aeruginosa*'nın karpabenemlere karşı toleransı artırmasında genel stres cevabı geni olan rpoS'nin etkisi olduğunu bildirmektedirler. *P. aeruginosa*'ya uygulanan sıcaklık stresinin ve oksidatif stresin rpoS geninin anlatımını nasıl etkilediğini ve genin anlatımının bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğiyle bağlantısını araştırdığımız çalışmamız da, yüksek dozda asidin ve 0,5 mg/l klorun yarattığı oksidatif stresin, rpoS geni anlatımını arttırdığını göstermiştir. Aynı zamanda biyofilm oluşturan kültürlerde, biyofilm oluşturmamış kültüre göre gen anlatımının yüksek oluşu rpoS geninin biyofilm oluşumu durumunda etkili olabileceğini göstermiştir. Tüm bu veriler ışığında yapılan çalışma, *P. aeruginosa*'da mekanizması tam olarak bilinmeyen rpoS geninin, farklı stres durumlarında oluşturduğu yanıtı ve bu streslerin biyofilm oluşumuna etkisini ortaya çıkarmak için önemli bir adımdır. Biyofilm oluşumunda etkili olduğu bilinen diğer bir gen ise bifA genidir. Kuchma ve ark.'nın [116] 2007 yılında yapılan çalışması, bifA geninin, fosfodiesteraz aktivitesinde etkili olduğunu, bifA geni mutasyona uğratıldığında ise *P. aeruginosa*'da polisakkarit üretiminin artışına bağlı olarak biyofilm oluşumunun arttığını ve bifA mutantlarında flagella oluşumunda azalma olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu verilere dayanılarak biyofilm oluşumu ile bağlantısı tespit edilen bifA geninin stres karşısındaki etkinliği çalışmamızda test edilmiş, sıcaklık, klor ve pH stres durumlarında anlatım seviyesinde farklılıklar meydana geldiği gözlenmiştir. Stres koşullarının bakterilerde biyofilm oluşumunu tetiklediği, elde edilen verilerle ortaya çıkarılmıştır. Bu verilere diğer bir kanıt ise algC geninin anlatımında gözlenen artıştır. Çünkü algC, alginat sentezinde görev alan gen ailesinin üyesidir. Kronik akciğer enfeksiyonları sırasında *P. aeruginosa*, eksopolisakkarit alginat üreterek, organizmayı immün yanıtı koruyan ve antibiyotiklere direnci arttıran biyofilmleri oluşturur. Pseudomonal enfeksiyonlarda biyofilm oluşuma katılan Alg operonu, biyofilm oluşumu boyunca, hücre-hücre ve hücre-yüzey etkileşimlerinde önemli rol oynayan ekstraselüler polisakkaritlerin biyosentezinden sorumludur [117]. Wood ve Ohman [118] 2012 yılında yaptıkları çalışmalarında, alg regülonunun, 27 üyesinin, mutant analizlerinin, hücre zarfı homeostasisinde ve stres yanıt sisteminde rol oynadığını ifade etmişlerdir. Edwards ve Saunders [119] ise 2001 yılındaki çalışmalarında, normal ve stres durumlarında büyüyen hücrelerin alginat üretimine katılan genlerinin konsantrasyonlarını karşılaştırmıştır. Alginatın aşırı üretimine yol

açan anahtar gen olan *algD*'nin ekspresyonunda, normal şartlar altında alginat üreten ve üretmeyen suşlar arasında bir farklılık tespit etmişlerdir. Alginat sentezine katılan önemli genlerden olan *algC*'nin, klor, sıcaklık ve pH streslerine maruz bırakılmış kültürlerdeki gen anlatım seviyesinin ölçüldüğü çalışmamızda da benzer olarak anlatım seviyesinde farklılıklar meydana geldiği tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan kültürlerde, biyofilm oluşturmamış kültüre göre gen anlatımının yüksek oluşu, *algC* geninin biyofilm oluşumu durumunda etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Gerçek zamanlı PZR'nin mRNA'yı ölçmek için ve bakteriyel gen ekspresyonunu analiz etmek için uygun bir yöntem olduğu bilinmektedir [117]. Kapiller sistemin kullanıldığı LightCycler 2.0 gerçek zamanlı PZR cihazı bulguları, LightCycler Nano gerçek zamanlı PZR cihazı bulguları ile karşılaştırılarak, bulguların güvenilirliği test edilmiştir. Yapılan karşılaştırma sonucunda, bulguların birbirlerini destekledikleri görülmüştür. Ancak, kapiller sistemde elde edilen bulgular arası farklılıkların, LightCycler Nano gerçek zamanlı PZR sistemine göre daha keskin bulgular vermesi, kapiller sistemin tercih edilesi olduğunu düşündürmüştür.

P. aeruginosa'da QS sistemi tarafından gen ekspresyonu ile kontrol edilen biyofilm oluşumu ve stres yanıtının çeşitli stres durumlarının moleküler düzeyde nasıl etkilendiğini araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda, elde edilen bulgular gen anlatımının stresten etkilendiğini göstermiştir. Ayrıca, biyofilm oluşumunun genlerle kontrol edildiği fikrini desteklemiştir.

BÖLÜM 4

4. SONUÇLAR / CONCLUSIONS

P. aeruginosa'nın meydana getirdiği hastalıkların oranında, virülans faktör çeşitliliğinde ve antibiyotik direncinde artışlar meydana gelmiştir. Bu durum, *P. aeruginosa*'nın sık görülen ve iyileştirilmesi zor, mortalite ve morbiditesi yüksek, enfeksiyonların etkeni olarak belirtilmesine sebep olmuştur. *P. aeruginosa*'nın, hastanelerde görülen enfeksiyonların %10-25'inden sorumlu olduğu belirtilmektedir. Bu enfeksiyonların %60'ından fazlasının da biyofilme bağlı enfeksiyonlar olduğu görülmektedir. Aynı zamanda biyofilm kökenli hastalıklar, hastalığın şiddetini, sıklığını ve tedaviye direnci arttırmaktadır. Tüm bu hastane enfeksiyonlarının yanında, *P. aeruginosa*'nın rekreasyonel sularda da sıklıkla biyofilm formunda bulunduğu ve dezenfeksiyona karşı daha dirençli bir form geliştirerek su kaynaklı hastalıklara da sebep olduğu bilinmektedir.

Dünya çapında suların temizlenmesi ve sudan bulaşan enfeksiyonların önlenmesi amacıyla, genel olarak klor kullanılmaktadır. Fakat klorun, sınırlı bir dezenfeksiyon kapasitesine sahip olduğu ve biyofilm tabakasını ancak normal değerinden 3000 kat daha fazla kullanıldığı takdirde temizlediği literatürde yer almaktadır [120]. Klormama ile biyofilm gibi kuvvetli bir bakteri formunu ortadan kaldırılmanın yetersiz kaldığı durumlarda, ortamdaki klor bakteriyi strese sokmaktadır. Ancak bakterinin bu stres durumuna ve bu stres durumunun hangi şiddetine biyofilm yanıtı oluşturduğuna dair çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Su kaynaklarının dezenfeksiyonu sırasında kullanılacak yöntemler belirlenirken, suyun kalitesi, sıcaklığı, pH aralığı ve mikroorganizma türü dikkate alınmaktadır. Mikroorganizmaların çoğalmaları için, ortam pH aralığının optimal sınırlar içinde bulunması gerekmektedir. Klor, suyun pH değerini düşürmekte ve alkaliliğini azaltmaktadır. Ortamın pH değeri azaldıkça Cl^- iyonunun etkinliğini de arttırmaktadır. Yani ortamda bulunan H^+ ve OH^- iyon konsantrasyonlarındaki değişim, bakterinin dezenfektandan etkilenme derecesini değiştirmektedir ve bu durum biyofilm içinde yaşayan bakteriyi strese sokabilmektedir. Ancak yine aynı şekilde, suların dezenfeksiyonunda mutlaka dikkate alınması gereken parametrelerden olan pH aralığının, bakterinin biyofilm oluşumuna etkisi üzerine çok az çalışma bulunmaktadır.

Sularda meydana getirdiği biyofilm tabakasının ve su kaynaklı hastalıklarının yanında, *P. aeruginosa*'nın başta kistik fibrozis olmak üzere insan vücudunda da hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda vücut içerisinde entegre edilmiş kateterler, protezler üzerinde de bakteri biyofilm meydana getirmektedir. Vücudun bakteri enfeksiyonlarında oluşturduğu ilk yanıt, yüksek ateştir. Ancak yine bu durumlarda biyofilm tabakasını ortadan kaldırmak için vücut bakteriyile savaşırken yüksek sıcaklığın, bakteri üzerinde yarattığı stres önemli bir araştırma konusudur.

Tüm bu bilgiler ışığında, *P. aeruginosa*'da QS sistemi tarafından gen ekspresyonu ile kontrol edilen biyofilm oluşumunun çeşitli stres durumları karşısında, moleküler düzeyde nasıl etkilediğini bilmek önem kazanmaktadır. Çalışmamızda, biyofilm yapımında ve stres durumunda etkili olduğu literatürde belirtilmiş genlerin, stres karşısında oluşturdukları yanıtlar incelenmiştir. Elde edilen bulgular, bakterilerin ortadan kaldırılmasında sıklıkla tercih edilen klorlamanın, yüksek sıcaklığın ve ekstrem pH değerlerinin biyofilm formunu tetiklediğini göstermiştir. Belirtilen dezenfeksiyon yöntemleri, bakterileri ortadan kaldırmada yetersiz kalmasının yanında, çoğalmalarına bile sebep olmaktadır. Dolayısıyla, bakterilerin ortadan kaldırılması için yeni dezenfeksiyon yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Var olan tekniklerin ise bakteriyi strese sokmadan, ek dezenfeksiyon yöntemleriyle beraber uygulanması daha yararlı olabilir. Daha önce de belirtildiği gibi biyofilm formu, yüksek dozda dezenfektan ve antibiyotikler ile muamele edildiğinde ortadan kalkabilen bir bakteri formudur. Bu durum, hem dezenfektan maliyetini artırmakta, hem de yüksek dozda dezenfektan ya da vücuda antibiyotik alınmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla, bakterinin biyofilm mekanizmasını tetikleyen dezenfeksiyon yöntemleri ve vücut için kullanılan antibiyotikler yerine, bakterinin biyofilm oluşumunu sağlayan QS mekanizmasını baskılayıcı inhibitörler ve yöntemler üzerine yoğunlaşmak daha da önem kazanmaktadır.

P. aeruginosa ile yapılan genomik ve proteomik çalışmalar, biyofilm oluşumu ve stres durumunda etkili birçok genin etki mekanizmasının çözülmesine neden olmuştur ve araştırmalara devam edilmektedir. Genlerin etkinliği üzerine yapılan çalışmaların sayısının çok olmasıyla beraber, bu çalışmalar genellikle genleri bloke ederek hangi mekanizmada etki gösterdiği üzerine yapılmaktadır. Ancak, etkinliği belirtilmiş bu genlerin, stres durumu karşısında anlatımının nasıl etkilendiğine dair

Çalışma sayısı azdır. Biyofilm gibi tehlikeli bir form ile mücadele ediliyorsa, eklenen her kimyasalın, bakteride yarattığı etki de ayrıntılı olarak bilinmelidir. Çalışmamızda biyofilmleri ortadan kaldırmada kullanılan üç farklı yöntem ele alınmıştır. Elde edilen bulgular, dezenfeksiyon için kullanılan bu etkenlerin biyofilm oluşumunu pozitif veya negatif yönde etkilediğinin göstermiştir.

KAYNAKLAR:

- [1] Swift S., Throup J.P., Williams P., Salmond G. P., Stewart G. S. (1994) Quorum Sensing: a Population-Density Component in The Determination of Bacterial Phenotype. Trends Biochem Sci, 21, 214-219.
- [2] Arnold J.W., Silvers S. (2000) Comparison of Poultry Processing Equipment Surfaces for Susceptibility to Bacterial Attachment and Biofilm Formation. Poul Sci, 79, 1215-1221.
- [3] Dikici A. (2009) Çevresel Stres Faktörlerine Karşı Bakteriyel Adaptasyonlar ve Mekanizmaları. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 4, 59-68.
- [4] Chowdhury R., Sahu G.K., Das J. (1996) Stress Response in Pathogenic Bacteria. J. Biosci., 21(2), 149-160.
- [5] Aspedon A., Palmer K., Whiteley M. (2006) Microarray Analysis of The Osmotic Stress Response in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal Of Bacteriology, 188, 2721-2725.
- [6] Boor K.J. (2006) Bacterial Stress Responses: What Doesn't Kill Them Can Make Them Stronger. PLoS Biol, 4, e23.
- [7] Zeng X., Tang J., Liu X., Jiang P., (2012) Response of *P. aeruginosa* Gene Expression to Cadmium Stress, Curr Microbiol, 65(6), 799-804.
- [8] Poole K. (2012) Bacterial Stress Responses as Determinants of Antimicrobial Resistance. J Antimicrob Chemother, 20(5), 227-234.
- [9] Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004) Bacterial Biofilms from The Natural Environment to Infectious Diseases. Nat Rev Microbiol, 2, 95-108.
- [10] Mohamed J.A., Huang D.B. (2007) Biofilm Formation by *Enterococci*. J Med Microbiol, 56(12), 1581-1588.
- [11] Song Z., Kong K.F., Wu H., Maricic N., Ramalingam B., Priestap H., Schnepel L., Quirke J.M., Hoiby N., Mathee K. (2010) *Panax ginseng* has Anti-Infective Activity Against Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by Inhibiting Quorum Sensing, a Bacterial Communication Process Critical for Establishing Infection.

Phytomedicine, 17, 1040-1046.

[12] Kievit T.R. (2009) Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Environmental Microbiology, 11(2), 279-288.

[13] Rodrigues-Perez L.R., Peixoto de Freitas A.L., Barth A.L. (2012) Cystic and Non-Cystic Fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* Isolates are not Differentiated by The Quorum-Sensing Signaling and Biofilm Production. Current Microbiology, 64(1), 81-84.

[14] Yousef A.E., Courtney P.D. (2003) Basics of Stress Adaptation and Implications in New-Generation Foods, 3rd Edition, Yousef A.E, Juneja V.K. Editors. CRC Press, New York, USA.

[15] Cirz R.T., Romesberg F.E. (2007) Controlling Mutation: Intervening in Evolution as a Therapeutic Strategy. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol, 42, 341-354.

[16] Foster P.L. (2007) Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol, 42, 373-397.

[17] Rumbaugh K.P., Diggle S.P., (2009) Watters C.M., Ross-Gillespie A., Griffin A.S., West S.A. Quorum Sensing and The Social Evolution of Bacterial Virulence. Current Biology, 19, 341-345.

[18] Donlan R.M., Costerton J.W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clin Microbiol Rev, 15, 167-193.

[19] Fung D.K.C., Chan E.W.C., Chin M.L., Chan R.C.Y. (2010) Delineation of a Bacterial Starvation Stress Response Network which can Mediate Antibiotic Tolerance Development. Antimicrob. Agents Chemother, 54, 1082-1093.

[20] Winrow V.R., Mclean L., Morris C.J., Blake D.R. (1990) The Heat Shock Protein Response and Its Role in Inflammatory Disease. Ann Rheum Dis, 49, 128-132.

[21] Bayrakal V., Baskın H., Bahar İ.H. (2009) Deneysel Mikroçevre Modelleme Çalışması *Pseudomonas aeruginosa* 'nın Farklı Hücre Dizilerinde Çoğunluğu Algılama ve Biyofilm Yanıtları. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 29, 637-642.

- [22] Miller M.B., Bassler B.L. (2001) Quorum Sensing in Bacteria. Annu. Rev. Microbiol, 55, 165-199.
- [23] Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D., Clark D.P. (2011) Brock's Biology of Microorganisms, 13th Edition, Prentice-Hall Int. Ltd, London, UK.
- [24] Federle M.J., Bassler B. (2003) Interspecies Communication in Bacteria. The Journal of Clinical Investigation, 112, 1291-1299.
- [25] Daniels R., Vanderleyden J., Michiels J. (2004) Quorum Sensing and Swarming Migration in Bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 28, 261-289.
- [26] Karaboz İ., Sukatar A., (2004) Bakterilerde Sosyal Davranışlar (Bakterilerde İletişim Mekanizmaları). Orlab Online Mikrobiyoloji Dergisi, 5, 23-32.
- [27] Watnick P., Kolter R. (2000) Biofilm, City of Microbes. J. Bacteriol, 182, 2675-2679.
- [28] Lambert M.L., Suetens C., Savey A., Palomar M., Hiesmayr M., Morales I., Agodi A., Frank U., Mertens K., Schumacher M., Wolkewitz M. (2011) Clinical Outcomes of Health-Care-Associated Infections and Antimicrobial Resistance in Patients Admitted to European Intensive-Care Units: a Cohort Study. Lancet Infect. Dis., 11, 30-38.
- [29] Jones R.N., Stilwell G., Rhomberg P.R., Sader H.S. (2009) Antipseudomonal Activity of Piperacillin/Tazobactam: More Than a Decade of Experience from The SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2007). Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 65, 331-334.
- [30] Sakarya S. (2005) Biyofilm Yapısı ve Enfeksiyon Hastalıklarının Virülans ve Tedavisindeki Rolü. 12.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 16-20 Kasım, Antalya, Türkiye.
- [31] Labbate M., Qeck 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, 692-698.
- [32] Lynch M.J., Swift S., Kirke D.F., Keevil C.W., Dodd C.E., Williams P. (2002) The

Regulation of Biofilm Development by Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila*. Environ Microbiol, 4, 18-28.

[33] Zottola E.A. (2001) Reflections on *Salmonella* and Other “Wee Beasties” in Foods. Food Technology, 55(9), 60-67.

[34] Assanta M.A. (2000) The War Against Invasive Bacteria That Stick to Surfaces. <http://www.frd.gov.ca>

[35] Lewis K. (2001) Riddle of Biofilm Resistance. Antimicrobial Agents Chemother, 45(4), 999-1007.

[36] Patti J.M., Allen B.L., McGavin M.J., Hook M. (1994) MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissue. Annual Review of Microbiology, 48, 585-617.

[37] Whiteley M., Banger M.G., Bumgarner R.E., Parsek M.R., Teitzel G.M., Lory S., Greenberg E.P. (2001) Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilms Nature, 413, 860-864.

[38] Wolz C., Goerke C., Landmann R., Zimmerli W., Fluckiger U. (2002) Transcription of Clumping Factor A in Attached and Unattached *Staphylococcus aureus* In Vitro and During Device-Related Infection. Infect Immun, 70, 2758-2762.

[39] O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R., (2000) Biofilm Formation as Microbial Development. Annu Rev Microbiology, 54, 49-79.

[40] Jefferson K.K., Pier D.B., Goldmann D.A., Pier G.B. (2004) The Teicoplanin-Associated Locus Regulator (Tcar) and The Intercellular Adhesin Locus Regulator (Icar) are Transcriptional Inhibitors of The Ica Locus in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 186, 2449-2456.

[41] Lazar V. (2011) Quorum Sensing in Biofilms - How to Destroy The Bacterial Citadels or Their Cohesion/Power? Anaerobe, 17, 280-285.

[42] Flemming H.C., Wingender J. (2010) The Biofilm Matrix. Nature Reviews-Microbiology, 8, 623-633.

- [43] Çitçi Z. (2005) Kronik Tonsillitte Biyofilmin Rolü. Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, Türkiye.
- [44] Zhanel G.G., Hoban D.J., Schurek K., Karlowsky J.A. (2004) Role of Efflux Mechanisms on Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Antimicrob. Agents, 24, 529-535.
- [45] Gilligan P.H. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In: Mycopathology. Murray P.R, Baron E.J, Pfaller M.A, Tenover F.C, Tenover R.H. eds. 7th ed. Washington DC: Manual of Clinical Microbiology, 1995: 509-19.
- [46] Algun U., Arısoy A., Gündüz T., Özbakkaloğlu B. (2004) The Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Strains to Fluoroquinolone Group of Antibiotics. Indian J Med Microbiol, 22, 112-114.
- [47] Karadenizli A., Kolaylı F., Gündeş S., Ergen K. (2002) *Pseudomonas aeruginosa*'nın Tikarsilin-Klavulanik Aside Duyarlılığının Hastanede Kullanıma Girmeden ve Kullanıma Girdikten Bir Yıl Sonraki Değişiminin Araştırılması. Klimik, 15, 89-91.
- [48] Carmeli Y., Troillet N., Eliopoulos G.M., Samore M.H. (1999) Emergence of Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of Risks Associated with Different Anti Pseudomonal Agents. Antimicrob Agents Chemother, 43, 1379-1382.
- [49] Mauldin P.D., Salgado C.D., Hansen I.S., Durup D.T., Bosso J.A. (2010) Attributable Hospital Cost and Length of Stay Associated with Health Care-Associated Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., 54, 109-115.
- [50] Tumbarello M., Repetto E., Trecarichi E.M., Bernardini C., De Pascale G., Parisini A., Rossi M., Molinari M.P., Spanu T., Viscoli C., Cauda R., Bassetti M. (2011) Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: Risk Factors and Mortality. Epidemiol. Infect, 139, 1740-1749.
- [51] Gül M., Şensoy A., Çetin B., Korkmaz F., Seber E. (2004) Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Seftazidime Duyarlılığın E-Test ve Disk

Difüzyon Yöntemleri ile Araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 34, 33-36.

[52] Çevik Tepeli E. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Biyofilm Yapımının ve Quorum Sensing’de Rol Alan Genlerin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye.

[53] Düzgün D. (2009) Değişik Kaynaklardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Virülans Faktörleri, Biyofilm Formasyonu ve Quorum Sensing Yönünden Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa, Türkiye.

[54] Peabody C., Chung Y., Yen M., Vidal-Ingigliardi D., Pugsley A., Saier M. (2003) Type II Protein Secretion and Its Relationship to Bacterial Type IV Pili and Archaeal Flagella. Microbiology, 149, 3051-3072.

[55] Bilgehan H. (2000) Klinik Mikrobiyoloji, Fakülteler Kitabevi BarışYayınları, İzmir, Türkiye.

[56] Palleroni N. (2003) Prokaryote Taxonomy of The 20th Century and The Impact of Studies on The Genus *Pseudomonas*: A Personal View. Microbiology, 149, 1-7.

[57] Deretic V., Schurr M., Yu H. (1995) *Pseudomonas aeruginosa*, Mucoidy and The Chronic Infection Phenotype in Cystic Fibrosis. Trends Microbiol, 3, 351-356.

[58] Chan J., Hadley J. (2001) The Microbiology of Chronic Rhinosinusitis: Results of A Community Surveillance Study. Ear Nose Throat J, 80, 143-145.

[59] Shannon K.P., French G.L. (2004) Increasing Resistance to Antimicrobial Agents of Gram-Negative Organisms Isolated at A London Teaching Hospital, 1995-2000. J Antimicrob Chemother, 53, 818-825.

[60] Smith R.S., Iglewski B.H. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing as A Potential Antimicrobial Target. J Clin Invest, 112, 1460-1465.

[61] Smith R.S., Iglewski B.H. (2003) *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing Systems and Virulence. Curr Opin Microbiol, 6, 56-60.

[62] Schuster M., Sexton D.J., Diggle S.P., (2013) Greenberg E.P. Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing: From Evolution to Application. Annu. Rev. Microbiol, 67,

43-63.

- [63] Baysse C., Cullinane M., Denervaud V., Burrowes E., Dow J.M., Morrissey J.P., Tam L., Trevors J.T., O'Gara F. (2005) Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology*, 151, 2529-2542.
- [64] Sakuragi Y., Kolter R. (2007) Quorum-Sensing Regulation of The Biofilm Matrix Genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 189, 5383-5386.
- [65] Lee J.H., Lequette Y., Greenberg E.P. (2006) Activity of Purified Qscr, A *Pseudomonas aeruginosa* Orphan Quorum-Sensing Transcription Factor. *Mol. Microbiol*, 59, 602-609.
- [66] Lequette Y., Lee J.H., Ledgham F., Lazdunski A., Greenberg E.P. (2006) A Distinct QscR Regulon in The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Circuit. *J. Bacteriol*, 188, 3365-3370.
- [67] Heeb S., Fletcher M.P., Chhabra S.R., Diggle S.P., Williams P., Camara M. (2011) Quinolones: From Antibiotics to Autoinducers. *FEMS Microbiol. Rev.*, 35, 247-274.
- [68] Rahme L.G., Ausubel F.M., Cao H., Drenkard E., Goumnerov B.C., Lau G.W., Miklos S.M., Plotnikova J., Tan M.W., Tsongalis J., Walendziewicz C.L., Topkins R.G. (2000) Plants and Animals Share Functionally Common Bacterial Virulence Factors. *PNAS*, 97(16), 8815-8882.
- [69] Deep A., Chaudhary U., Gupta V. (2011) Quorum Sensing and Bacterial Pathogenicity: from Molecules to Disease. *J Lab Physicians*, 3(1), 4-11.
- [70] Gera C., Srivastava S. (2006) Quorum-Sensing: The Phenomenon of Microbial Communication. *Curr Sci*, 90(5), 666-676.
- [71] Rasmussen T.B., Givskov M. (2006) Quorum-Sensing Inhibitors as Anti-Pathogenic Drugs. *Inter J Med Microbiol*, 296, 149-161.
- [72] Singh P.K., Schaefer A.L., Parsek M.R., Moninger T.O., Welsh M.J., Greenberg E.P. (2000) Quorum-Sensing Signals Indicate that Cystic Fibrosis Lungs are Infected with Bacterial Biofilms. *Nature*, 407, 762-764.

- [73] Bjarnsholt T., Givskov M. (2007) The Role of Quorum Sensing in The Pathogenicity of The Cunning Aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. Anal Bioanal Chem, 387, 409-414.
- [74] Pier G.B. (2007) *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. A Major Virulence Factor, Initiator of Inflammation and Target for Effective Immunity. Int J Med Microbiol, 297, 277-295.
- [75] Sitkiewicz I., Stockbauer K.E., Musser J.M. (2007) Secreted Bacterial Phospholipase A2 Enzymes. Better Living Through Phospholipolysis. Trends Microbiol, 15, 63-69.
- [76] Woods D.E. (2004) Comparative Genomic Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. Trends Microbiol, 12, 437-439.
- [77] Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J. (2007) Role of Polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. Curr Opin Microbiol, 10, 644-648.
- [78] Jain S., Ohman D.E. (2005) Role of An Alginate Lyase Foralginate Transport in Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 73, 6429-6436.
- [79] Shirtliff M.E., Mader J.T., Camper A.K. (2002) Molecular Interactions in Biofilms. Chem & Biol, 9, 859-871.
- [80] Pearson J.P., Pesci E.C., Iglewski B.H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* Las and Rhl Quorum Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. J Bacteriol, 179, 5756-5767.
- [81] Wagner V. E., Iglewski B.H. (2008) *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. Clin Rev Allerg Immunol, 10, 8079-8090.
- [82] Parsek M.R., Greenberg E.P. (2005) Sociomicrobiology: The Connections Between Quorum Sensing and Biofilms. Trends Microbiol, 13, 27-33.
- [83] Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes During Development as A Biofilm. J Bacteriol, 184, 1140-1154.

- [84] Murakami K., Ono T., Viducic D., Kayamaa S., Moria M., Hirotaa K., Nemotoa K., Miyakea Y. (2006) Role for RpoS Gene of *Pseudomonas aeruginosa* in Antibiotic Tolerance. *FEMS Microbiol*, 242, 161-167.
- [85] Kindrachuk K.N., Fernández L., Bains M., Hancock R.E. (2011) Involvement of An ATP-Dependent Protease, PA0779/AsrA, in Inducing Heat Shock in Response to Tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 55, 1874-1882.
- [86] Kato A., Groisman E.A. (2008) The PhoQ/PhoP Regulatory Network of *Salmonella enterica*. *Adv. Exp. Med. Biol*, 631, 7-21.
- [87] Schaefer A.L., Hanzelka B.L., Parsek M.R., (2000) Greenberg E.P. Detection, Purification, and Structural Elucidation of The Acylhomoserine Lactone Inducer of *Vibrio fischeri* Luminescence and Other Related Molecules. *Methods Enzymol*, 305, 288-301.
- [88] Banin E., Vasil M.L., Greenberg E.P. (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Proc Natl Acad Sci*, 102, 11076-11081.
- [89] Passador L., Cook J.M., Gambello M.J., Rust L., Iglewski B.H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes Requires Cell-To-Cell Communication. *Science*, 260, 1127–1130.
- [90] Shrout J.D., Chopp D.L., Just C.L., Hentzer M., Givskov M., Parsek M.R. (2006) The Impact of Quorum Sensing and Swarming Motility on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation is Nutritionally Conditional. *Mol Microbiol*, 62, 1264-1277.
- [91] Klausen M., Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aaes-Jørgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T. (2003) Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* Wild Type, Flagella and Type IV pili Mutants. *Mol Microbiol*, 48(6), 1511-1524.
- [92] Klausen M., Jørgensen A.A., Molin S., Tolker-Nielsen T. (2003) Involvement of Bacterial Migration in The Development of Complex Multicellular Structures in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Mol Microbiol*, 50(1), 61–68.
- [93] Chambers J.R., Sauer K. (2013) Small RNAs and Their Role in Biofilm

Formation. Trends in Microbiology, 21, 39–49.

[94] Sakarya S. (2005) Biyofilm Yapısı ve İnfeksiyon Hastlıklarının Virölans ve Tedavisindeki Rolü, XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Klimik, 16-20 Kasım, Antalya, Türkiye.

[95] Goo E., Majerczyk C.D., An J.H. Chandler J.R., Seo Y.S., Ham H., Lim J.Y., Kim H., Lee B., Jang M.S., Greenberg E.P., Hwang I. (2012) Bacterial Quorum Sensing, Cooperativity, and Anticipation of Stationary-Phase Stress. PNAS, 109, 19775-19780.

[96] Walker J.T., Jhutti A., Parks S., Willis C., Copley V., Turton J.F., Hoffman P.N., Bennett A.M. (2014) Investigation of Healthcare-Acquired Infections Associated With *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Taps in Neonatal Units in Northern Ireland. Journal of Hospital Infection, 86, 16-23.

[97] Amagliani G., Schiavano G.F., Stocchi V., Bucci G., Brandi G. (2013) Application of Real-Time PCR to *Pseudomonas aeruginosa* Monitoring in A Public Swimming Pool. Microchemical Journal, 110, 656-659.

[98] 28580 (2013) İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, Türkiye.

[99] Külekçi G. (2005) Klor Verici Dezenfektanların Kullanım İlkeleri Hangi Şartlarda, Hangi Amaçlarla Kullanılır? Türevleri Nelerdir? 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 20-24 Nisan, Samsun, Türkiye.

[100] Wei Q., Minh P.N.L., Dötsch A., Hildebrand F., Panmanee W., Elfarash A., Schulz S., Plaisance S., Charlier D., Hassett D., Haussler S., Cornelis P. (2012) Global Regulation of Gene Expression by Oxyr in An Important Human Opportunistic Pathogen. Nucleic Acids Research, 40 (10) , 4320–4333.

[101] Romsang A., Atichartpongkul S., Trinachartvanit W., Vattanaviboon P., Mongkolsuk S. (2013) Gene expression and physiological role of *Pseudomonas aeruginosa* methionine sulfoxide reductases during oxidative stress. American Society for Microbiology

- [102] Kim J., Park H.J., Lee J.H., Hahn J. S., Gud M.B., Yoon J. (2009) Differential Effect of Chlorine on The Oxidative Stres Generation in Dormant and Active Cells Within Colony Biofilm. *Water Research*, 43, 5252–5259.
- [103] Arda M. (2000) Temel Mikrobiyoloji, Genişletilmiş İkinci Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, Türkiye.
- [104] Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2012) Microbiology: An Introduction, 11th edition, Pearson, USA.
- [105] Van der Waal S.V., Van der Sluis L.W.M., Özok A.R., Exterkate R.A.M., Van Marle J., Wesselink P.R., Soet J.J. (2011) The Effects of Hyperosmosis or High ph on A Dual-Species Biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*: An In Vitro Study. *International Endodontic Journal*, 44, 1110–1117.
- [106] Oğur R., Tekbaş Ö.F., Hasde M. (2004) Klorlama Rehberi (İçme ve Kullanma Sularının Klorlanması. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.
- [107] Schultz H., Bauer G., Schachl E., Hagedorn F., Schmittinger P. (2002) Potassium compounds. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, A22, 39-103.
- [108] Stancik L.M., Stancik D.M., Schmidt B., Barnhart D.M., Yoncheva Y.N., Slonczewski J.L. (2002) pH-Dependent Expression of Periplasmic Proteins and Amino Acid Catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184 (15), 4246-4258.
- [109] Öztürk E., Kahveci N., Özlük K., Yılmazlar T. (2009) Isı Şok Proteinleri Heat Shock Proteins. *Ulusal Cerrahi Dergisi*, 25(4), 131-136.
- [110] Kobayashi Y., Ohtsu I., Fujimura M., Fukumori F. (2011) A Mutation in DnaK Causes Stabilization Of The Heat Shock Sigma Factors 32, Accumulation of Heat Shock Proteins and Increase in Toluene-Resistance in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 13(8), 2007–2017.
- [111] Yang H., Matewish M., Loubens I., Storey D.G., Lam J.S., Jin S. (2000) MigA, A Quorum-Responsive Gene of *Pseudomonas aeruginosa*, is Highly Expressed in The Cystic Fibrosis Lung Environment and Modifies Low-Molecular-Mass

Lipopolysaccharide. Microbiology, 146, 2509-2519.

[112] Schuster M., Hawkins A.C. Harwood C.S., Greenberg E.P. (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS Regulon and Its Relationship to Quorum Sensing. Molecular Microbiology, 51(4), 973-985.

[113] Landini P. (2009) Cross-Talk Mechanisms in Biofilm Formation and Responses to Environmental and Physiological Stress in *Escherichia coli*. Research in Microbiology, 160, 259-266.

[114] Ito A., May T., Kawata K., Okabe S. (2008) Significance of RpoS During Maturation of *Escherichia coli* biofilms. Biotechnol. Bioeng., 99, 1462-1471.

[115] Murakami K., Ono T., Viducic D., Kayama S., Mori M., Hirota K., Nemoto K., Miyake Y. (2005) Role for rpoS Gene of *Pseudomonas aeruginosa* in Antibiotic Tolerance. FEMS Microbiol Lett., 242(1), 161-167.

[116] Kuchma S.L., Brothers K.M., Merritt J.H., Liberati N.T., Ausubel F.M., O'Toole G.A. (2007). BifA, A Cyclic-Di-GMP Phosphodiesterase, Inversely Regulates Biofilm Formation and Swarming Motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Journal of Bacteriology, 189(22), 8165-8178.

[117] Wood L.F., Ohman D.E. (2012). Identification of Genes in The σ^{22} Regulon of *Pseudomonas aeruginosa* Required for Cell Envelope Homeostasis in Either the Planktonic or the Sessile Mode of Growth. mBio, 3(3), 1-11.

[118] Sharma G., Rao S., Bansal A., Dang S., Gupta S., Gabrani R. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: Potential Therapeutic Targets. Biologicals, 42, 1-7.

[119] Edwards K.J., Saunders N.A. (2001). Real-Time PCR Used to Measure Stress-Induced Changes in The Expression of The Genes of The Alginate Pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Applied Microbiology, 91, 29-37.

[120] Helke D.M., Somers E.B., Wong A.L. (1992) Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-Nitryl in The Presence of Milk and Individual Milk Components. J.Food. Prot., 56, 479-484.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge KEKEÇ

İletişim Bilgileri

Adres : Meşrutiyet Mah. Akkirman Sok. No:27 D:10
Nişantaşı/Şişli/İST
Telefon : 0542 788 64 72
Mail : ozgekekec@gmail.com
Doğum Tarihi : 21.01.1988
Öğrenim Durumu : Yüksek Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Başlangıç Yılı
Ortaöğretim	Sayısal	Özel Evrim Lisesi	2002
Lisans	Sayısal	Marmara Üniversitesi	2006
Yüksek Lisans	Sayısal	Marmara Üniversitesi	2011

İş Deneyimi

Firma	Pozisyon	Yıl
Ultrasen Sağlık ve Kimya Sanayi Ticaret Özge KEKEÇ	İşletme Sahibi	2012-2013

Projeler ve Ödüller

1. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Teknogirişim Sermaye Desteği Programı, Diş Üzerinde Oluşan Dental Plakın Elektrikli-Ultrasonik Diş Fırçaları Kullanılarak Ortadan Kaldırılması konulu proje ödülü

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Sesal C, Kekeç Ö. Inactivation of Microorganisms *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by Ultrasound, Journal of Ultrasound in Medicine, Ref. No. 13-09014, 2013 (Baskıda)
2. Sesal C, Kekeç Ö. Effects of Pulsed Ultrasound on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Ref. No. TRSTMH-D-13-00304R2, 2014 (Baskıda)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler

Effects of Chlorine and Heat Stress on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Strain's Biofilm Genes, 3rd International Congress of Molecular Biology and Biotechnology, Sarajevo-Bosnia Herzegovina 2014 – Poster sunumu kabul edildi.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

Escherichia coli Türü Bakterinin Sürekli ve Aralıklı Uygulanan Ultrason Kullanılarak Ortadan Kaldırılması, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, Ege Üniversitesi, İzmir. 2012 – Poster Sunumu

